DIANA BENTO DA SILVA SOARES

Efeitos da restrição calórica e dos treinamentos de futebol e corrida na expressão de genes do músculo esquelético em portadores de diabetes mellitus tipo 2: estudo clínico randomizado

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra Maysa Vieira de Sousa

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Soares, Diana Bento da Silva

Efeitos da restrição calórica e dos treinamentos
de futebol e corrida na expressão de genes do
músculo esquelético em portadores de diabetes
mellitus tipo 2 : estudo clínico randomizado / Diana
Bento da Silva Soares. -- São Paulo, 2020.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maysa Vieira de Sousa.

Descritores: 1.Interleucina-15 2.Ubiquitina-
proteína ligases 3.Expressão gênica 4.Proteínas
musculares 5.Sistema musculoesquelético 6.Exercício
físico 7.Diabetes mellitus tipo 2 8.Dieta 9.Futebol
10.Corrida

USP/FM/DBD-169/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maysa Sousa Vieira, que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva, pela atenção e pelo apoio durante toda a minha caminhada e no processo de orientação.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, e à FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por colocar à disposição a área experimental e o laboratório.

À Dra. Aritânia Sousa Santos, pela disponibilidade em me ajudar nos experimentos, doando tanto a sua habilidade técnica como também todo seu conhecimento.

À doutoranda Joyce de Cássia Rosa Jesus e à pós-doutoranda Gabriela Salim de Castro, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela colaboração durante a execução desse estudo.

Ao doutorando João Paulo Silva Nunes, pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao biomédico especialista em imunologia Ricardo Zaniratto da Costa Fernandes, do Instituto do Coração, por doar seu tempo, me ajudando no corte e na diluição das minhas amostras.

A todos os funcionários do laboratório LIM18, Márcia Regina, Márcia, Adriana, Fátima, pela atenção e pelo acolhimento.

A todos os funcionários das secretarias da Endocrinologia, em especial à Cida, pela atenção e pela paciência.

Ao corpo docente do Programa de Endocrinologia, pelas discussões científicas nas reuniões de INTRAMUROS.

Aos meus pais, Sandra e Sérgio, que sempre me apoiaram e deram forças para realizar meus sonhos.

Aos meus irmãos, Rafael e Cecília, e à cunhada Isabela, pelos momentos de descontração, amizade e apoio.

Ao meu marido Edson, por me ajudar, nos momentos mais difíceis, me apoiar e estar sempre presente, me alegrando.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado.

Esta dissertação está de acordo com as normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com a *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Diabetes Mellitus tipo 2.....	1
1.2 Fisiopatologia do DM2.....	3
1.3 Captação de glicose dependente de insulina.....	4
1.4 Captação de glicose independente de insulina.....	6
1.5 Transporte de glicose no músculo – o impacto do treinamento físico.....	8
1.6 Influência da glicose na atrofia muscular.....	10
1.7 Sarcopenia e o impacto do treinamento físico.....	11
1.8 IL-15.....	13
1.9 Genes musculares atrofícos: <i>Ring finger 1</i> (MuRF1) e <i>muscle atrophy F-box</i> (MAFbx/ atrogina-1).....	17
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	19
3. OBJETIVO.....	20
4. MÉTODOS.....	21
4.1 Sujeitos.....	21
4.2 Desenho experimental.....	23
4.3 Procedimentos e programa de intervenção em saúde.....	24
4.4 Programa de intervenção nutricional.....	24
4.5 Programa de treinamento físico.....	25
4.6 Captação máxima de oxigênio e frequência cardíaca máxima.....	26
4.7 Circunferência da cintura.....	27
4.8 Dual energy X-ray absorptiometry (DXA).....	27

4.9 Amostragem e análise de sangue.....	27
4.10 Procedimento de biópsia muscular.....	28
4.11 Corte e Homogeneização do tecido muscular.....	29
4.12 Extração do RNA total de amostras do músculo esquelético.....	29
4.13 Reação de Transcrição Reversa (cDNA).....	30
4.14 Desenho e teste de eficiência dos primers.....	31
4.15 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR).....	33
4.16 Análise estatística.....	34
5.RESULTADOS.....	35
5.1 Caracterização da população.....	35
5.2 Caracterização dos medicamentos.....	35
5.3 Avaliação da composição corporal.....	37
5.4 Avaliação do consumo alimentar.....	39
5.5 Variáveis bioquímicas.....	41
5.6 Expressão gênica no tecido muscular esquelético.....	44
5.7 Correlações das variáveis antropométricas, exames bioquímicos e consumo alimentar.....	49
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÕES.....	61
8. ANEXOS.....	62
9. REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE	
Apêndice 1	
Apêndice 2	
Apêndice 3	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S	18S Ribossomal
Akt	Proteína cinase
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
AS160	Substrato Akt 160kda
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	Enzima adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
bpm	Batimento por minuto
Ca ²⁺	Cálcio ionizado
CaMKs	Cálcio calmodulina cinase
cDNA	DNA complementar
CT	<i>Cycle threshold</i>
DPEC	Dietil pirocarbonato
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
eNOS	Óxido nítrico- sintase endotelial
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FCmax	Frequência cardíaca máxima

FCR	Reserva de frequência cardíaca
FoxO	<i>Forhead box O</i>
G-6-P	Glicose 6-fosfato
GH	Hormônio do crescimento
GLUT-4	Proteína transportadora de glicose 4
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogênio
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIIT	Treino intervalado de alta intensidade
HKII	Hexoquinase II
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGFBP-3	Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina 3
IGF1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-15	Interleucina 15
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corporal
IRS	Substrato do receptor de insulina
Jak3	Janus cinase 3
Kcal	Quilocaloria

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mechanism target of rapamycin kinase</i>
MuRF-1	<i>Muscle ring finger-1</i>
NK	célula natural killer
PDK1	Proteína cinase dependente de fosfoinosítideo-1
PGC- α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator -α</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PIP3	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PKB	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
PPAR α	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
qRT-PCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real
RI	Resistência à insulina
RM	Repetição máxima
RNA	Ácido ribonucleico
r.p.m.	Rotações por minuto
SH2	<i>Src homology 2</i>
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TA	Temperatura ambiente
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta

Thr ¹⁷²

Treonina 172

TNF- α

Fator de necrose tumoral alfa

VLDL

Lipoproteína de muito baixa densidade

VO₂

Volume do oxigênio

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual
$\pm$	Mais ou menos
$=$	Igual
$\%$	Porcentagem
$<$	Menor
$>$	Maior
dL	Decilitro
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
ng	Nanograma
g	Gramma
mg	Miligrama
M	Molar
mM	Milimol
KDa	Kilodaltons
n	Número

h	Hora
kg/m ²	Quilo por metro quadrado
km/h	Quilômetro por hora
s	Segundos
m	Minutos
mm	Milímetros
°C	Graus Celsius
Δ	Delta
~	Aproximadamente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Captação de glicose dependente de insulina.....	5
Figura 2 - Captação de glicose independente de insulina.....	7
Figura 3 - Vias de sinalização da síntese e da degradação do músculo esquelético.....	15
Figura 4 - Desenho experimental.....	23
Figura 5 - Expressão da IL-15 mRNA no músculo esquelético pré e pós-intervenções nos grupos Dieta (D), Dieta + Futebol (DF), Dieta + Corrida (DC),.....	45
Figura 6 - Expressão da atrogina-1 mRNA no músculo esquelético pré e pós-intervenções nos grupos Dieta (D), Dieta + Futebol (DF), Dieta + Corrida (DC),.....	46
Figura 7 - Expressão da MuRF-1 mRNA no músculo esquelético pré e pós-intervenções nos grupos Dieta (D), Dieta + Futebol (DF), Dieta + Corrida (DC),.....	47
Figura 8 - Comparação entre os grupos Dieta (D), Dieta + Futebol (DF), Dieta + Corrida (DC), nos períodos pré e pós intervenção.....	48
Figura 9 - Correlação entre o gene IL-15 e a fração lipídica LDL-c em cada grupo: Dieta (D), Dieta + Futebol (DF) e Dieta + Corrida (DC).....	49
Figura 10 - Correlação entre o gene MuRF-1 e o consumo de proteína nos grupos: Dieta (D), Dieta + Futebol (DF) e Dieta + Corrida (DC).....	50
Figura 11 - Correlação entre o gene atrogina-1 e o consumo de proteína nos grupos: Dieta (D), Dieta + Futebol (DF) e Dieta + Corrida (DC).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e dados laboratoriais dos pacientes	22
Tabela 2 - Sequências dos primers.....	32
Tabela 3 - Número de indivíduos em uso de metformina isolada pré e pós as 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta, Dieta + Futebol e Dieta + Corrida.....	36
Tabela 4 - Número de indivíduos em uso de metformina associada a sulfoniluréia pré e pós as 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta, Dieta + Futebol e Dieta + Corrida.....	36
Tabela 5 - Número de indivíduos em uso de estatina pré e pós as 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta, Dieta + Futebol e Dieta + Corrida.....	36
Tabela 6 - Número de indivíduos em uso de hipotensores pré e pós as 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta, Dieta + Futebol e Dieta + Corrida.....	37
Tabela 7 - Composição corporal pré e pós 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta (D, n=13), Dieta + Futebol (DF, n=13) e Dieta + Corrida (DC, n=13).....	38
Tabela 8 - Composição dos macronutrientes do plano alimentar pré e pós 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta (D, n=13), Dieta + Futebol (DF, n=13) e Dieta + Corrida (DC, n=13).....	40
Tabela 9 - Variáveis bioquímicas pré e pós 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta (D, n=13), Dieta + Futebol (DF, n=13) e Dieta + Corrida (DC, n=13).....	42
Tabela 10 - Expressão dos genes IL-15, atrogina-1 e MuRF-1 no tecido muscular pré e pós 12 semanas de intervenção nos grupos: Dieta (D, n=13), Dieta + Futebol (DF, n=13) e Dieta + Corrida (DC, n=13).....	44

RESUMO

Soares DBS. *Efeitos da restrição calórica e dos treinamentos de futebol e de corrida na expressão de genes do músculo esquelético em portadores de diabetes mellitus tipo 2: estudo clínico randomizado* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2020.

INTRODUÇÃO: Indivíduos portadores de diabetes tipo 2 (DM2) apresentam maior risco de desenvolver doença cardiovascular, fragilidade muscular e sarcopenia. A resistência à insulina aumenta a expressão dos genes atrogina-1 e MuRF-1 inibindo a via de sinalização do crescimento, favorecendo a atrofia muscular. O exercício físico e uma dieta balanceada aumentam a capacidade funcional do músculo esquelético, ativando miocinas como a IL-15, que atua na via de sinalização envolvida na sua remodelação. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de um programa de intervenção nutricional e de exercícios recreativos de 12 semanas na expressão gênica da IL-15, atrogina-1 e MuRF-1 no músculo esquelético de pacientes com DM2. **METODOLOGIA:** Os participantes (n = 39, M / F = 19/20, 60 ± 6,0 anos, IMC 32,9 ± 0,6 kg / m²) foram aleatoriamente alocados em grupos: Dieta (D), Dieta + Futebol (DF) ou Dieta + Corrida (DC). *Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)* e coleta sanguínea foram analisadas antes e após 12 semanas de intervenção. As amostras do músculo vasto lateral foram obtidas por meio de biópsia para análise da expressão gênica por qRT-PCR. **RESULTADOS:** O peso total reduziu em ~4kg nos grupos D e DF, enquanto no DC ~5kg, representando a massa de gordura corporal, a circunferência da cintura diminuiu em ~5cm nos grupos D e DF, e 7,5cm no DC após as 12 semanas de intervenção (P <0,05). Os valores de triglicerídeos, colesterol total e VLDL-C diminuíram nos grupos submetidos ao treinamento físico (p <0,05), enquanto a fração LDL-C esteve inversamente associada à IL-15 no grupo DC (r= -0,60, p<0,05). A expressão no DF dos genes MuRF-1 e atrogin-1 diminuiu em ~40% e 30%, respectivamente, enquanto a expressão do gene IL-15 aumentou em ~ 24% no DC (p <0,05). **CONCLUSÃO:** O treinamento recreativo em conjunto com uma

dieta moderada em calorias teve efeitos positivos na redução da expressão de miocinas associadas à atrofia e no aumento do gene anabólico e anti-inflamatório IL-15. Essas modulações gênicas e as melhorias na composição corporal, nos marcadores de resistência à insulina e no perfil lipídico podem reduzir os riscos de doenças cardiovasculares nos portadores de DM2 após intervenções de treinamentos físicos.

Descritores: Interleucina-15; Ubiquitina-proteína ligases; Expressão gênica; Proteínas musculares; Sistema musculoesquelético; Exercício físico; Diabetes mellitus tipo 2; Dieta; Futebol; Corrida.

ABSTRACT

Soares DBS. *Effects of calorie restriction and recreational soccer and running training on the expression of skeletal muscle genes in type 2 diabetes: a randomised clinical trial* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

INTRODUCTION: Individuals with type 2 diabetes (T2D) are at increased risk of developing cardiovascular disease, muscle frailty and sarcopenia. Insulin resistance increases the expression of atrogin-1 and MuRF-1 genes, and impairs the growth signalling pathway, giving rise to muscle atrophy. Physical exercise and a balanced diet increase the functional capacity of skeletal muscle, in part through myokines such as IL-15, which acts in the signalling pathway involved in the remodelling of muscle. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to evaluate the impact of a 12-week nutritional intervention programme and recreational exercise training on the gene expression of IL-15, atrogin-1 and MuRF-1 in skeletal muscle from T2D patients. **METHODOLOGY:** The participants (n=39, M/F=19/20, 60±6.0 years, BMI 32.9±0.6 kg/m²) were randomly allocated to Diet+Soccer (DS), Diet+Running (DR) or Diet alone (D). *Dual-energy X-ray* and fasting blood testing measurements were performed before and after 12 weeks. Biopsy specimens of vastus lateralis muscle were obtained for analysis of gene expression by qRT-PCR. **RESULTS:** Total body weight was reduced by ~4 kg in groups D and DS, while in DR ~ 5kg, representing body fat mass, waist circumference decreased by ~ 5cm in groups D and DS, and 7.5cm in DR after 12 weeks of intervention (P<0.05), . Triglycerides, total cholesterol and VLDL-c levels decreased in the groups subjected to physical training (p<0.05), while the LDL-C fraction was inversely associated with IL-15 in the DC group (r = -0.60, p <0.05). The DS expression of the MuRF-1 and atrogin-1 genes decreased by ~ 40% and 30%, respectively, whereas IL-15 gene expression was increased by ~24% in DR (p<0.05). **CONCLUSION:** Recreational training in conjunction with a moderate calorie-restricted diet downregulates the expression of atrophy-associated myokines

and increases the expression of the anabolic and anti-inflammatory gene IL-15. These gene modulations and improvements in body composition, insulin resistance markers and lipid profile can contribute to reduce the risks of cardiovascular diseases in patients with T2D after a physical training interventions.

Descriptors: Interleukin-15; Ubiquitin-protein ligases; Gene expression; Muscle proteins; Musculoskeletal system; Exercises; Diabetes mellitus, type 2; Diet; Soccer; Running.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus tipo 2

Com base no relatório da Federação Internacional de Diabetes, existiam, aproximadamente, 463 milhões de pacientes com diabetes em 2019, com previsão de aumento para 700 milhões até 2045 (IDF, 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS) projeta que o diabetes será a sétima principal causa de morte em 2030 (WHO, 2018).

Quase metade de todas as mortes atribuíveis à glicemia elevada ocorre antes dos 70 anos de idade (WHO, 2018). Como o diabetes é uma doença crônica com altos índices de comorbidades, além do impacto na saúde pública, os recursos necessários para o seu controle são onerosos para os pacientes e seus familiares (IDF, 2019).

O diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) é caracterizado por hiperglicemia, hemoglobina glicada (HbA1c) elevada, hiperinsulinemia em jejum e resistência à insulina (RI), além de estar associado ao aumento da gordura corporal, principalmente a visceral (SOUSA et al., 2014).

A obesidade é um fator de risco crítico para o desenvolvimento do DM2, cuja causa primária é a resistência à insulina (RI) causada pela obesidade no tecido adiposo branco, no fígado e no músculo esquelético, combinada com a secreção prejudicada de insulina pelas células β pancreáticas incapaz de superar essa resistência. A RI induzida pela obesidade também está ligada a um amplo conjunto de anormalidades metabólicas como dislipidemia, doenças hepáticas, hipertensão, doença cardíaca coronária e acidente vascular cerebral (LONGO et al., 2019).

O processo de urbanização, incluindo a modificação dos comportamentos alimentares em relação ao consumo de refeições não saudáveis e ao estilo de vida cada vez mais sedentário, e o envelhecimento das populações resultaram em maior ocorrência de obesidade e subsequente aumento no risco de diabetes e suas comorbidades (KRUSTRUP et al., 2018; PERKIN et al., 2018; UMEGAKI, 2016).

Essas condições podem ser evitadas, por meio de acompanhamento regular com equipes multidisciplinares e engajamento em programas de ação em saúde, que incluem atividade física (exercício) e intervenções nutricionais voltadas para mudanças no estilo de vida. Essas mudanças pretendem levar à manutenção da função mitocondrial e sua concentração no músculo esquelético (LITTLE et al., 2010).

O músculo esquelético compreende aproximadamente 40% da massa corporal humana, é responsável pela locomoção, além de ser um dos principais tecidos de absorção da glicose e oxidação de ácidos graxos. Ele consiste no maior conjunto de proteínas em todo o organismo e é sensível a condições que alteram o equilíbrio entre a síntese e a degradação proteica (SOUSA et al., 2017).

O envelhecimento e o estilo de vida sedentário contribuem para o crescimento da obesidade, com consequente inflamação e desenvolvimento de outras comorbidades como DM2. A hipertrofia do tecido adiposo nessa população altera marcadores imunoinflamatórios com a polarização dos macrófagos para o fenótipo M1, ativação de linfócitos T CD8⁺ e produção de interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β). Esse processo contribui para a inflamação que culmina no desenvolvimento da resistência sistêmica à insulina, liberação de ácidos graxos e degradação proteica (LEAL et al, 2018; SOUSA et al., 2017; BOWEN et al., 2015; BASSIL et al., 2013).

A prática de atividade física adequada é crucial para preservar a função muscular durante a vida. As propriedades contráteis das fibras musculares de homens saudáveis com mais de 70 anos de idade são protegidas pela atividade física (caminhada de pelo menos meia hora por dia), em comparação com controles sedentários na mesma faixa etária (PERKIN et al., 2018). A redução da massa muscular afeta a saúde do adulto e tem implicações importantes na qualidade de vida, como ganho de peso e risco para o desenvolvimento de resistência à ação da insulina e DM2 (BASSIL et al., 2013).

Assim, intervenções que favoreçam a perda de peso resultam em melhor qualidade de vida nos idosos, além de diminuir os gastos com saúde pública.

Nesse contexto, o aconselhamento nutricional e a atividade física melhoram a capacidade funcional do músculo, o perfil lipídico e os parâmetros glicêmicos sanguíneos e clínicos, prevenindo a ocorrência de obesidade sarcopênica, fenômeno comum em idosos, que pode predispor ao DM2 (MORI et al., 2018; GUALANO et al., 2012). Além disso, os idosos podem se beneficiar do aumento da biogênese mitocondrial induzida pelo exercício e da defesa antioxidante celular (HOOD et al., 2016).

1.2 Fisiopatologia do DM2

A insulina liga-se aos receptores nas superfícies das células e, como resultado, ocorre uma série de reações envolvidas no metabolismo da glicose no interior da célula. A resistência à insulina está associada à diminuição dessas reações intracelulares, tornando-a menos efetiva na estimulação da captação de glicose pelos tecidos (ALVIM et al., 2015).

A resistência à insulina é inicialmente observada no tecido muscular, no qual a concentração crescente de insulina é necessária para permitir a captação de glicose pelo miócito (ALVIM et al., 2015; TENG and HUANG, 2019).

Os transportadores de glicose-4 (GLUT-4) sofrem translocação para a membrana celular, onde se fundem à membrana e permitem, assim, a entrada da glicose para a célula, sendo removidos e armazenados quando os níveis de insulina diminuem. A insulina exerce os seus principais efeitos biológicos através da ligação a um receptor na superfície celular desencadeando várias reações que levam à ativação de proteínas, substratos e moléculas sinalizadoras, culminando no metabolismo de vários nutrientes e nos efeitos da insulina no crescimento e na proliferação celular (COLBERG et al., 2016).

1.3 Captação de glicose dependente de insulina

Na célula do músculo esquelético o receptor de insulina consiste de duas subunidades α extracelulares (fração de ligação) e duas subunidades β transmembranares (com atividade tirosina cinase intrínseca), unidas por ligações dissulfeto. A ativação do receptor de insulina altera a estrutura da subunidade α , levando à auto fosforilação do domínio tirosina cinase da subunidade β . Este, fosforila vários intermediários proteicos em tirosina, incluindo os substratos dos receptores de insulina (IRS-1, 2, 3, 4) que, fosforilados reconhecem e se ligam a domínios *Src homology 2* (SH2), ativando fosfatidilinositol-3-cinase (PI3-K) (Figura 1).

A PI3-K promove a catálise dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol, resultando em fosfatidilinositol 3- trifosfato (PIP3). O PIP3 fosforila a proteína cinase dependente de fosfoinosítídeo-1 (PDK1), que, por sua vez, ativa a proteína cinase B (PKB, também conhecida como Akt) e a proteína cinase C (PKC) (Figura 1) (ALVIM, 2015).

Após seu recrutamento para a superfície celular, a Akt é ativada, resultando na fosforilação dependente da Akt de muitos substratos. No músculo, finalmente, essas cinases estimulam a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, facilitando a entrada de glicose intracelular (Figura 1). Além da captação de glicose, praticamente todos os efeitos metabólicos da insulina são regulados pela Akt (ALVIM et al., 2015).

Figura 1 - Captação de glicose dependente de insulina. Adaptado de Alvim et al., 2015. A insulina ativa várias proteínas de sinalização intracelular envolvidas no mecanismo de captação de glicose dependente de insulina [substrato do receptor de insulina (IRS), fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), proteína cinase dependente de fosfoinosítideo-1 (PDK1), proteína cinase C (PKC), proteína cinase B (PKB), proteína cinase (Akt) e transportadores de glicose- 4 (GLUT4), fosforilação (P), subunidade α e β do receptor de insulina]

Setas pretas: ativação

Setas vermelhas: captação

1.4 Captação de glicose independente de insulina

A contração muscular que ocorre durante o exercício físico aumenta monofosfato de adenosina (AMP) e ativa a enzima proteína cinase ativada por AMP (AMPK), favorecendo a oxidação de gordura (e a inibição da sua síntese), contribuindo para a translocação do GLUT4 para a membrana celular e para a captação de glicose independente de insulina nos miócitos (ALVIM et al., 2015).

A atividade contrátil muscular altera o estado de energia celular, aumentando a necessidade metabólica do corpo, que desencadeia vias que consomem ATP, com consequente elevação da concentração de subprodutos, como o AMP. A concentração aumentada da AMP ativa a AMPK (Figura 2).

A presença crônica de espécies reativas de oxigênio (EROs) está associada à fisiopatologia de inúmeras doenças, incluindo o diabetes. No músculo esquelético, a produção de EROs pode ser promovida por vários estímulos, incluindo hipóxia, insulina e contração muscular. A formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) estimula a captação de glicose no músculo (Figura 2) (ALVIM et al., 2015).

O *Akt substrate 160kda* (AS160) pela ação da insulina (Figura 1) ou pelo estímulo da contração muscular esquelética durante exercício (Figura 2) regula a translocação de GLUT4. A Akt catalisa a fosforilação do substrato AS160, estimulando a translocação dos GLUT4 das vesículas citoplasmáticas para a superfície da membrana celular e, assim, aumenta o transporte de glicose dependente de insulina para a célula (SWIDERSKA et al., 2018). Stanford e Goodyear (2014) demonstraram que a mutação do domínio de ligação à calmodulina no AS160 inibe significativamente a captação de glicose estimulada pelo exercício, mas não a captação de glicose estimulada pela insulina.

A contração do músculo esquelético também aumenta a concentração de cálcio ionizado (Ca^{2+}) intracelular. Essa sinalização de Ca^{2+} /calmodulina ativa

as proteínas cinases dependentes de Ca^{2+} calmodulina (CaMKs) que participam da translocação do GLUT4 para a membrana celular, contribuindo para a captação de glicose muscular estimulada pelo exercício (Figura 2) (STANFORD e GOODYEAR, 2014).

A bradicinina influencia o metabolismo da glicose por meio de vias dependentes e independentes da insulina. A bradicinina aumenta a fosforilação da tirosina em IRS-1, melhorando a ligação do IRS-1 com a subunidade reguladora PI3K, favorecendo a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática e, assim, aumentando a captação de glicose dependente de insulina (ALVIM et al., 2015). Na ausência de insulina, a bradicinina é gerada pela contração muscular durante o exercício e favorece a translocação do GLUT-4, resultando em níveis mais baixos de glicose durante o exercício, em portadores de DM2 (TAGUCHI et al., 2000).

Figura 2 - Captação de glicose independente de insulina. Adaptado de Alvim et al., 2015. A contração muscular ativa várias proteínas de sinalização que estão envolvidas no mecanismo de sinalização do exercício [proteína cinase ativada por AMP (AMPK), cálcio (Ca^{2+}), bradicinina, substrato Akt de 160 kDa (AS160), espécies reativas de oxigênio (ERO)]

Setas azuis: ativação

Setas vermelhas: captação

1.5 Transporte de glicose no músculo – o impacto do treinamento físico

Depois que a glicose é transportada através do sarcolema, é fosforilada em glicose 6-fosfato (G-6-P) em uma reação catalisada por hexocinase II (HKII). Este é o primeiro passo no metabolismo da glicose pelas vias glicolíticas e oxidativas, responsáveis pela geração de energia durante o exercício ou pela conversão em glicogênio no período pós-exercício (RICHTER e HARGREAVES, 2013).

Durante o exercício supra-máximo, o aumento da glicose intramuscular inibe a hexocinase, limitando a fosforilação e utilização da glicose frente às elevadas concentrações intramusculares de glicose G-6-P, secundárias ao aumento das taxas de glicogénólise muscular (RICHTER e HARGREAVES, 2013).

Da mesma forma, durante os estágios iniciais do exercício, a inibição da HKII mediada por G-6-P limita a captação de glicose e sua utilização. À medida que o exercício continua, há um aumento da captação de glicose e diminuição da concentração intramuscular, e a inibição da hexocinase é aliviada pela menor concentração de G-6-P. Esse mecanismo contribui para o entendimento entre diminuição do glicogênio muscular e aumento progressivo da captação de glicose durante exercícios de intensidade moderada (RICHTER e HARGREAVES, 2013).

Em indivíduos com DM2 realizando exercícios moderados, a utilização da glicose pelos músculos é maior que a produção de glicose hepática, e a glicemia tende a declinar. Entretanto, a insulinemia normalmente diminui, tornando menor o risco de hipoglicemia induzida pelo exercício em quem não faz uso de insulina ou secretagogos de insulina, mesmo com atividade física prolongada. Os efeitos de uma única sessão de exercício aeróbio na ação da insulina variam com a duração, a intensidade e a dieta subsequente. Uma única sessão de exercício pode aumentar a ação da insulina e a tolerância à glicose por 24 a 72 horas (ALVIM et al., 2015).

Durante exercícios aeróbios breves e intensos, as catecolaminas se elevam, aumentando a glicemia. A hiperglicemia pode resultar dessa atividade e persistir por até 2 horas, provavelmente porque as concentrações plasmáticas de catecolamina e a produção de glicose não retornam ao normal imediatamente após a interrupção da atividade (ALVIM et al., 2015).

Meex et al. (2010) examinaram os efeitos de 12 semanas de treinamento físico em homens portadores de diabetes tipo 2, no ciclo ergômetro 3x/semana por 45 minutos (55% do seu VO_2 máximo) e após exercício resistido, 1 hora/semana (75% da contração voluntária máxima). Após 12 semanas de treino, a disfunção mitocondrial observada anteriormente no músculo esquelético foi reduzida, correlacionando com o aumento da captação de glicose estimulada por insulina. Estes dados indicam que o aumento da biogênese mitocondrial com a prática do exercício físico em portadores de diabetes tipo 2 acompanha a melhora da sensibilidade à insulina no músculo esquelético.

A maioria dos estudos que examinaram os efeitos terapêuticos do treinamento crônico em portadores de diabetes tipo 2 concentrou-se no exercício aeróbio de baixa a moderada intensidade, estabelecido como uma estratégia eficaz para melhorar a saúde metabólica desse grupo e reduzir o risco de acidente vascular cerebral (AVC) (MENDES et al., 2019).

A recomendação para indivíduos com DM2 é que realizem no mínimo 150 minutos semanais de exercício aeróbio moderado ou 75 minutos de intensidade vigorosa, sem permanecer mais do que dois dias consecutivos sem atividade. Após uma sessão de exercícios, a captação da glicose permanece aumentada por até 2 horas, por mecanismos independentes da insulina, e por até 48 horas, através de mecanismos dependentes da insulina, sendo, portanto fundamental para o controle do diabetes (DIRETRIZES SBD, 2019; COLBERG et al., 2016).

1.6. Influência da glicose na atrofia muscular

Em resposta ao aumento da concentração de glicose no sangue, nos obesos e nos portadores de DM2, as células que constituem o músculo esquelético apresentam diversas alterações como atrofia das fibras musculares, interrupção e modificação na estruturação das linhas Z e anormalidades morfológicas nas mitocôndrias. Essas alterações também são inerentes ao avanço da idade. Estudos sugerem que a redução da força e do número de células é ocasionada pela atrofia das fibras musculares do tipo I, mas principalmente das fibras de contração rápida (tipo II), que também sofrem redução da área de secção transversal (KRAUSE et al., 2011; LANG et al., 2010). As fibras tipo II são responsáveis por produzir mais força pela atividade da ATPase nas miosinas. Por isso, sua redução pode ocasionar diminuição da velocidade da contração e perda de força muscular (KRAUSE et al., 2011).

Na obesidade e no DM2 também são observadas menores concentrações de adiponectina, hormônio anti-inflamatório que é produzido principalmente pelos adipócitos. A adiponectina diminui a lipogênese e aumenta a oxidação dos ácidos graxos via ativação das vias AMPK e PPAR α nos adipócitos, hepatócitos e miócitos. Ela também diminui a gliconeogênese e aumenta significativamente os substratos do receptor de insulina especificamente no fígado para manter a homeostase da glicose (HEISTON e MALIN, 2019).

No músculo esquelético, a adiponectina aumenta a captação de glicose e a sensibilidade à insulina. Além disso, a adiponectina inibe a produção de EROs nas células endoteliais e contribui para a formação da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), favorecendo o fluxo sanguíneo das microcirculações (HEISTON e MALIN, 2019).

1.7 Sarcopenia e o impacto do treinamento físico

A inatividade física, a baixa ingestão de proteínas, o aumento do tecido adiposo e a perda de massa muscular, associados ao estresse oxidativo, são características comuns de idosos em consequência do estilo de vida inadequado (TARANTINO et al., 2015, HOOD et al., 2016).

A perda do tecido muscular é responsável principalmente pela fragilidade em idosos, caracterizada por perda de peso, fraqueza e marcha lenta, aumento do risco de fratura, imobilidade, declínio funcional e perda de independência. A fragilidade é um estado de alta vulnerabilidade, que leva à incapacidade, à dependência e maior mortalidade, devido à diminuição das reservas físicas nos idosos (CLEASBY et al., 2016).

A fragilidade tem cinco componentes: exaustão, inatividade física, fraqueza muscular, velocidade de marcha lenta e perda de peso. Dois desses componentes, fraqueza muscular e velocidade de marcha lenta, são característicos da sarcopenia, geralmente prevalente em idosos (UMEGAKI, 2016). Perda de peso repentina não intencional, quedas frequentes, incapacidade de realizar atividades da vida diária, hospitalização e presença de doenças crônicas, como DM2, doença cardiovascular, doença pulmonar obstrutiva crônica, artrite reumatoide e câncer, estão associados à sarcopenia (GURD et al., 2011; GUMUCIO e MENDIAS, 2013).

Como exemplo dessas múltiplas alterações funcionais, temos o estudo de Makizako et al. (2018), que avaliou 10.092 homens e mulheres idosos em grupos separados por idades de 65 a 85 anos, por meio de testes de força de preensão manual, do *sit-to-standing*, e da velocidade de caminhada. Foi observada correlação negativa entre o desempenho físico e o envelhecimento entre homens e mulheres idosos. A redução na força da preensão manual foi maior nos homens, enquanto a diminuição da velocidade de caminhada foi mais acentuada nas mulheres. A avaliação dos perfis antropométricos revelou maior índice de massa corporal (IMC) e da massa de gordura corporal, com diminuição da massa muscular em ambos os sexos conforme o avanço da

idade; entretanto, foi mais pronunciado nas mulheres. Essas mudanças sugeriram uma associação direta entre composição corporal e atividades da vida diária nos idosos, como, por exemplo, a mobilidade de caminhadas ou subir escadas.

Os critérios diagnósticos para a sarcopenia foram aprovados em 2010 pelo Grupo de Trabalho Europeu sobre Sarcopenia em Pessoas Idosas. Esse grupo associou a sarcopenia a outras complicações, como caquexia, fragilidade, obesidade e diabetes (TARANTINO et al., 2015).

Apesar de existirem poucos estudos em pacientes com diabetes, a sarcopenia parece ser mais prevalente nesta população. Sabemos que a maioria dos portadores de DM2 é constituída de pessoas de meia idade ou idosos. A presença dessa doença nessa faixa etária associada ao estilo de vida pouco saudável favorece a inflamação, contribuindo para a aceleração do declínio da massa muscular, da redução da capacidade funcional, gerando maior dependência e risco de institucionalização, bem como, aumento da taxa de mortalidade (SOUSA et al., 2019).

Mudanças no estilo de vida por meio de dietas com adequado aporte calórico-proteico e prática regular de exercícios físicos podem diminuir os efeitos deletérios do envelhecimento prevenindo a sarcopenia e a resistência à insulina no músculo esquelético (SOUSA et al., 2019).

No estudo de Sousa et al. (2017), portadores de DM2 submetidos a um programa de treinamento de futebol com duração de 40 minutos por sessão, 3 vezes por semana, durante 3 meses, apresentaram reduções dos valores glicêmicos, da resistência à insulina e dos indicadores de risco cardiovascular. Ademais, o treinamento de futebol aumentou a atividade lipolítica e a relação do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1)/ proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGFBP-3) – marcador indicativo de atenuação do catabolismo muscular.

Com o avançar da idade, ocorre perda progressiva de hormônios anabólicos, como o IGF-1, que apresenta ação semelhante à insulina na síntese proteica, no incremento da massa muscular e na redução da gordura corporal (STILLING et al., 2017).

No músculo esquelético, a via de sinalização celular PI3K/ AKT depende do IGF-1. A fosforilação de IRS1 induzida por IGF1 estimula a via PI3K/Akt, resultando na fosforilação paralela e na ativação da mTORC (EGERMAN e GLASS, 2014).

Durante a resposta da hipertrofia adaptativa induzida pelo exercício, ocorre o controle da transdução e síntese de proteínas, além da ativação e da incorporação de células satélites que facilitam o aumento de miofibrilas recém-formadas. Devido à importância de a síntese de proteínas exceder a degradação, o grau de hipertrofia muscular induzida pelo exercício está fortemente associado ao grau de fosforilação da $p70^{S6K}$. A ativação de $p70^{S6K}$ induzida por contração depende da mTOR, a qual integra estímulos nutricionais e metabólicos para regular o crescimento e a proliferação celular (EGAN e ZIERATH, 2013).

O exercício físico também reduz citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , interleucinas: IL-1 β , IL-6, IL-8 (KAPILEVICH et al., 2017), além de induzir a remodelação do músculo esquelético como resultado da ativação das vias de sinalização que coordenam o aumento na transcrição de genes-alvo, como o *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator - α* (PGC1- α) (SKELLY et al., 2017).

1.8 IL-15

A prática da atividade física favorece citocinas anti-inflamatórias, como é o caso da IL-15. A IL-15 pertence à família das citocinas compostas por 4 hélices, sendo produzida por vários tipos de células, como macrófagos, fibroblastos, miócitos, epiteliais, queratinócitos, astrócitos e células do estroma da medula óssea (YE, 2015).

A expressão da IL-15 é regulada pelo hormônio do crescimento (GH). O receptor da IL-15 é formado por 3 subunidades: α , β e γ . A IL-15 liga-se à subunidade α , ativando as outras duas subunidades, com o potencial de

atenuar a obesidade e aumentar a massa magra e a captação da glicose no músculo esquelético (YE, 2015; GUO et al, 2017).

A IL-15 bloqueia a ação da TNF- α , evitando a morte de células musculares, diminuindo a ação da cascata apoptótica do receptor de TNF- α (YE, 2015). Segundo Sánchez e Vásquez (2013), a indução de produção endógena de IL-15 por meio da atividade física pode auxiliar na diminuição ou na inibição dos efeitos negativos do TNF- α em pacientes com DM2 ou obesidade.

A IL-15 pode ter papel importante no controle da glicemia. Krolopp et al. (2016) observaram maior ativação da via de sinalização Jak3/STAT3 com a IL-15, favorecendo a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática e o aumento da captação de glicose (Figura 3).

Ademais, a ativação dessa via aumenta a transcrição de proteínas, como ilustrado na Figura 3. A ativação da PI3K ativa a Akt, a mTOR e a síntese proteica. O IGF-1 é o maior ativador da hipertrofia muscular, estimulando a PI3K, que recruta a Akt no citosol e ativa o mTOR (Figura 3) (KROLOPP et al., 2016).

Figura 3 - Proteínas na via de sinalização da síntese e da degradação do músculo esquelético. Adaptada de Gumucio e Medias (2013). IL-15: Interleucina 15; IGF-1: Fator de crescimento dependente de insulina; PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinase; JAK3: janus cinase 3; STAT3: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3, TGF-β: fator de transformação de crescimento beta, FOXO: *Forhead box O*, Akt: proteína cinase; mTOR: *Mechanism target of rapamycin kinase*; TNF-α: Fator de necrose tumoral-α; GLUT-4: Proteína transportadora de glicose-4

→ (setas preenchidas): ativação

----- (linha tracejada): bloqueio

Kapilevich et al. (2017) compararam os efeitos de diferentes tipos de treinamento sobre o conteúdo plasmático de citocinas em 4 grupos distintos de homens jovens (18 e 23 anos de idade), sendo atletas de levantamento de peso vs voluntários saudáveis não treinados; atletas de *endurance* vs voluntários não treinados. Foram analisadas as concentrações das citocinas plasmáticas (IL-6, IL-8, IL-15) antes, imediatamente após e aos 30 minutos de recuperação do exercício. Nos atletas de levantamento de peso, as concentrações de IL-15 foram maiores em comparação aos sedentários e atletas de *endurance*. Em ambos os controles, não houve alterações nas

concentrações de IL-15 antes, após e aos 30 minutos de recuperação do exercício. Assim, a IL-15 é mais expressa em atletas, em especial nos praticantes de treinamento resistido. As concentrações das citocinas IL-6 e IL-8 foram maiores no grupo de *endurance*, quando comparado aos demais grupos (controles e de levantamento de peso) (KAPILEVICH et al, 2017).

Rinnov et al. (2014) analisaram as concentrações plasmáticas da IL-15 e, nas amostras de músculo esquelético, o conteúdo proteico e a expressão IL-15 mRNA, pré e pós-intervenção, em voluntários jovens. Foram submetidos ao treinamento crônico em cicloergômetro de 60 a 120 minutos de duração, 5x/semana, durante 12 semanas, a 60% VO₂ máximo (estudo 1). Outro grupo também foi submetido a uma sessão de treino no cicloergômetro, com duração de 3h, a 60% VO₂ máximo (estudo 2). As amostras de sangue e da biópsia do músculo vasto lateral foram coletadas antes da intervenção, imediatamente após o exercício e aos 90 min, 3 h, 6 h e 21 h do período de recuperação. Entre os indivíduos treinados, não houve diferença na expressão do mRNA de IL-15 e dos valores plasmáticos da IL-15 (do estudo 1). No estudo 2, houve redução da expressão da IL-15 mRNA somente após 21h no grupo que realizou treino agudo, sem alteração na concentração ou no plasma.

São poucos estudos na literatura avaliando a expressão da IL-15 no músculo esquelético. Kim et al (2013) observaram aumento significativo da IL-15 (75%) em amostras do músculo sóleo em ratos com DM2, após 12 semanas de corrida em esteira. No músculo gastrocnêmio, não foram observadas alterações na expressão da IL-15 após o treinamento.

Já no estudo de Niemnan et al (2003), a expressão da IL-15 foi analisada em amostras do músculo vasto lateral em jovens maratonistas, não sendo observadas alterações do mRNA IL-15 após sessão de corrida em esteira com duração de 3 h.

A expressão da IL-15 pode ser observada em ambos os tipos de fibras musculares (tipos I e II), com maior prevalência nas fibras do tipo II. Os tipos de fibras musculares estão presentes em proporções diferentes para cada músculo esquelético. Nos músculos vasto lateral e gastrocnêmio, predominam as fibras do tipo II (JOHNSON et al., 1973; MARZETTI et al., 2009). As fibras do tipo I estão mais presentes no músculo sóleo (ZHU et al., 2013).

1.9 Genes musculares atroficos: *Muscle ring finger 1* (MuRF1) e *muscle atrophy F-box* (MAFbx/atrogina-1)

A atrogina-1 é uma importante enzima da via da ubiquitina, ativada na proteólise muscular e na atrofia, causada por uma variedade de doenças e condições. Dentre os mecanismos moleculares envolvidos na atrofia, destacamos a ativação da via de sinalização da miostatina/ fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) e o aumento da expressão da atrogina-1 no músculo esquelético que, particularmente nos idosos, contribui na perda de independência, aumentando o risco de queda (GUMUCIO e MENDIAS, 2013). A MuRF-1 também induz a via da ubiquitina proteassoma, sendo um importante marcador de atrofia muscular. Essas são as principais proteínas ativadas na degradação da massa muscular (PINHEIRO et al., 2017).

A inatividade física reduz a fosforilação do *forkhead box O* (FoxO) e, em sua forma hipofosforilada, o FoxO se transloca para o núcleo e aumenta a expressão de genes de atrofia, como as proteínas ubiquitina ligases (ligase E3) atrogina-1 e MuRF-1. Os FoxO foram os primeiros fatores de transcrição discutidos para regular a transcrição de ambas as ligases E3. Inflamação, sepse, desnervação, administração de corticosteroides e imobilização favorecem a produção dessas ligases E3 e ativam a via ubiquitina proteossoma (UPS) (GUO et al, 2017, WOHLGEMUTH et al, 2011).

Conforme ilustrado na Figura 3, o TGF- β é também um potente indutor de atrofia muscular. A miostatina e o TGF- β são mantidos na forma inativa na matriz extracelular do músculo e, quando ativados, ligam-se aos seus receptores e ativam as cascatas de sinalização da atrofia, ativando o FoxO e os fatores de transcrição que regulam a expressão gênica. Além disso, a sinalização da miostatina pode inibir o eixo IGF-1/PI3K/Akt e reduzir a ativação da mTOR, interferindo na sinalização da via da síntese de proteínas do músculo esquelético (GUMUCIO e MEDIAS, 2013).

O FoxO é um importante fator de transcrição que regula a expressão da Atrogina-1 e da MuRF-1. A ativação da Akt pode também inibir o FOXO de atuar no núcleo, diminuindo sua sinalização e a capacidade das fibras musculares de expressar Atrogina-1 e MuRF-1 (Figura 3) (GUMUCIO e MEDIAS, 2013).

Pugh et al. (2015) avaliaram os efeitos agudos de uma sessão de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) associado ao treino resistido (TR) nas alterações moleculares no músculo esquelético. Participaram do protocolo de exercícios 10 voluntários não treinados, do sexo masculino, que foram submetidos ao TR [4 × 8 extensões de perna, 70% 1 repetição máxima (RM)] e TR seguido de HIIT (10 × 1 min a 90% FCmax). A fosforilação de Akt diminuiu significativamente após as 6 h de recuperação em ambos os treinos ($P < 0,05$). As atividades de fosforilação da mTOR e da PGC-1 α mRNA aumentaram somente após o TR + HIIT. A expressão de miostatina diminuiu em ambos os grupos no período de recuperação (2 e 6 h) ($P < 0,05$). Entretanto, foi observada menor expressão de atrogina-1 e MuRF-1 no TR + HIIT, quando comparado ao TR. Tais achados sugerem que a inclusão do HIIT após treino resistido otimiza outras adaptações funcionais do treinamento, como redução de genes atroficos e o incremento da biogênese das mitocôndrias, contribuindo na transcrição de genes que favorecem o anabolismo muscular.

Ainda faltam investigações que avaliem os efeitos do treinamento físico e da dieta hipocalórica moderada na expressão de IL-15, MuRF-1 e atrogina-1, em idosos portadores de DM2, e o impacto dessa interação na prevenção da perda de massa muscular. Sendo a sarcopenia uma condição comumente observada nessa população, o aumento da capacidade funcional do músculo com o tratamento proposto poderá contribuir na prevenção da perda de massa magra e de outras comorbidades, melhorando o controle da doença e a qualidade de vida desses pacientes.

Assim, nossa proposta foi avaliar a expressão dos genes IL-15, atrogina-1 e MuRF-1 em amostras de músculo esquelético em pacientes com DM2 submetidos a um programa de treinamento físico recreativo, associado à dieta de restrição calórica moderada.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A adiposidade e o DM2 desencadeiam processos inflamatórios que contribuem para a perda de massa muscular e para o desenvolvimento de outras comorbidades como as doenças cardiovasculares. Além disso, o impacto do DM na fragilidade muscular não é completamente conhecido e, múltiplos mecanismos têm sido propostos para a aceleração da sarcopenia, entre eles: aumento do estresse oxidativo, inflamação crônica subclínica, resistência à insulina e ativação da via da atrofia muscular.

Ainda não há na literatura dados sobre os genes musculares atrofícos MuRF-1 e atrogina-1 e do gene anabólico e anti-inflamatório IL-15 em portadores de DM2 após intervenção nutricional e de exercícios físicos.

O esclarecimento destas questões, além de fornecer um melhor entendimento das possíveis contribuições para a sarcopenia, é de extrema relevância na medida em que pode dar origem ao desenvolvimento de intervenções específicas que atenuem o declínio da massa magra, ou até favoreçam o seu ganho, melhorando os desfechos nestes pacientes.

Sabemos que um estilo de vida saudável, com prática regular de atividade física e alimentação equilibrada com moderada restrição calórica, são eficazes para a integridade muscular, redução da inflamação e aumento da lipólise no DM2.

Para melhor adesão à prática da atividade física nessa população, o treinamento recreativo de futebol e de corrida são opções interessantes por serem atividades práticas e baratas, além do lado sociável, despertando maior motivação principalmente em longo prazo.

Assim, poderemos verificar se as intervenções propostas contribuirão na atenuação da atividade das proteínas envolvidas no catabolismo do músculo, melhorando aspectos funcionais importantes na preservação da massa muscular e, conseqüentemente, no controle do DM2 e de suas complicações.

3. OBJETIVO

Avaliar o impacto de um programa de intervenção nutricional e do treinamento recreativo com duração de 12 semanas no perfil de saúde em relação às adaptações corporais, bioquímicas e musculoesqueléticas e, principalmente, na expressão dos genes musculares IL-15, atrogina-1 e MuRF-1 em portadores de Diabetes Mellitus tipo 2.

4. MÉTODOS

O presente trabalho representa um braço de um protocolo abrangente de tratamento que investigou as modulações hormonais, metabólicas e imunológicas de 60 pacientes portadores de diabetes do tipo 2 submetidos a um programa de intervenção nutricional e treinamento físico (ANEXO A, Diagrama 1).

Nesta etapa, foi avaliado o impacto da intervenção proposta no aprimoramento da capacidade funcional, a partir das amostras do músculo esquelético vasto lateral de 39 voluntários portadores de DM2 (ANEXO A, Diagrama 2). Para tanto, utilizamos amostras coletadas previamente e armazenadas em nitrogênio líquido.

4.1 Sujeitos

Este foi um estudo prospectivo clínico controlado, randomizado, de 12 semanas, em pacientes DM2.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPESq – Parecer Nº 127.261) (APÊNDICE 1). Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes de serem submetidos aos procedimentos do estudo.

Participaram do estudo 39 portadores de diabetes do tipo 2, sendo 19 homens e 20 mulheres, com idade média $60 \pm 6,0$ anos, índice de massa corporal (IMC) $33,5 \pm 3,88$ kg/m² e $8,2 \pm 0,8$ anos de duração do diabetes tipo 2. Todas as mulheres estavam na pós-menopausa. Os participantes foram

recrutados em Unidades Básicas de Saúde e no Hospital das Clínicas de São Paulo.

Os critérios de exclusão incluíram tabagismo, complicações do diabetes, como nefropatia, retinopatia e doenças cerebrovasculares e cardiovasculares, IMC > 45kg/m² e uso de insulina.

Desses pacientes, 75,6% reportaram o uso de anti-hipertensivos e 43,5% de estatinas. Todos os pacientes estavam em uso de hipoglicemiantes orais: metformina (39,4%) e combinação de metformina e sulfonilureia (58,4%). Apenas um voluntário fazia uso de sulfonilureia isolada (2,2%) (Tabelas 3 a 6).

Os grupos foram pareados em relação à idade, duração do diabetes, HbA1c e IMC, para os três grupos: Dieta (D); Dieta + Futebol (DF); Dieta + Corrida (DC) (Tabela 1). Não houve diferença significativa quanto aos gêneros para os três grupos ($p > 0,05$).

Tabela 1- Características clínicas e dados laboratoriais dos pacientes

Variáveis	Dieta (D) (n=13)	Dieta + Futebol (DF) (n=13)	Dieta + Corrida (DC) (n=13)	Valor de <i>p</i> entre grupos
Idade (anos)	60,2 ± 7,5	60,5 ± 5,0	59,6 ± 6,9	0,926
IMC (kg/m ²)	33,29 ± 4,0	33,2 ± 3,7	33,8 ± 4,0	0,927
Tempo de DM2 (anos)	7,6 ± 4,4	9,2 ± 7,2	7,4 ± 6,2	0,682
HbA1c (%)	7,62 ± 0,3	7,46 ± 0,4	7,23 ± 0,3	0,816
Glicemia (mg/dL)	172,0 ± 9,9	167,5 ± 13	161 ± 11	0,520
Insulina (μUI/mL)	27,7 ± 5,0	17,6 ± 1,3	22,7 ± 3,1	0,188
HOMA-IR	8,1 ± 3,5	6,5 ± 3,2	8,06 ± 3,8	0,368
VO ₂ máx (mL/kg/min)	22,3 ± 0,6	23,0 ± 1,1	23,4 ± 1,1	0,331

Dados com distribuição normal: expressos como média ± erro padrão.

IMC: Índice de massa corporal; HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Modelo de avaliação de homeostase da resistência à insulina. DM2: Diabetes mellitus tipo 2. VO₂ máx: consumo de oxigênio máximo. *P*: nível de significância do teste ANOVA medidas repetidas ($p < 0,05$).

4.2 Desenho experimental

Todos os voluntários participaram de um programa intensivo de intervenção nutricional e foram alocados aleatoriamente em três grupos: Dieta (D), Dieta + Futebol (DF) e Dieta + Corrida (DC). No grupo Dieta, os participantes não aderiram ao programa de treinamento físico.

Os voluntários inseridos no programa de treinamento físico realizaram 40 minutos de treino supervisionado de futebol ou corrida recreativa três vezes por semana durante 12 semanas (Figura 4).

Acompanhamento nutricional semanal (D, DF, DC)

Figura 4 - Desenho experimental. D: Dieta; DF: Dieta+ Futebol; DC: Dieta+ Corrida; VO_2 : consumo de oxigênio

4.3 Procedimentos e programa de intervenção em saúde

Os participantes foram submetidos à triagem com exame médico e ecocardiografia, seguida de avaliação das medidas antropométricas, da capacidade aeróbia e do perfil bioquímico na admissão do estudo. Além disso, foi aplicada uma anamnese alimentar antes do início do estudo para a prescrição de dietas individuais.

Após estas avaliações, todos os participantes foram inscritos no Programa de Intervenção Nutricional com ou sem treinamento físico (futebol ou corrida). Antes e após três meses de intervenção, foram coletadas amostras de músculo esquelético dos voluntários.

4.4 Programa de intervenção nutricional

Durante os 3 meses de intervenção, todos os participantes receberam aconselhamento nutricional semanal com nutricionistas, estimulando consumo de fibras, verduras, legumes e frutas, além da orientação para a diminuição do consumo de frituras e açúcares. O plano dietético foi calculado individualmente, para proporcionar redução energética de aproximadamente 500 kcal por dia para cada participante, seguindo as diretrizes nutricionais da Sociedade Brasileira de Diabetes da época (SBD, 2012), baseadas no Guia Alimentar da População Brasileira. A dieta prescrita era equilibrada e rica em fibras (mínimo 20g/dia), conforme as diretrizes brasileiras vigentes.

O plano alimentar consistia de 45-60% de carboidratos, 15-20% de proteínas e 20-30% de gordura. O acompanhamento nutricional semanal foi importante para reforçar e apoiar as restrições alimentares, monitorar a ingestão calórica e, se necessário, ajustar a dieta para melhorar a adesão.

Além disso, a cada 2 semanas, todos os participantes eram inscritos no Programa de Educação, que funcionava em grupos de não mais que sete participantes por sessão de 1 h. Este programa educacional incluiu palestras sobre cuidados nutricionais e atividade física e controle da glicemia em pacientes com DM2.

4.5 Programa de treinamento físico

O protocolo de treinamento de futebol ou de corrida foi supervisionado por professor de educação física. Cada sessão de treino teve duração de 40 minutos, com frequência semanal de 3 vezes, por 12 semanas, totalizando 36 dias de treinamento físico.

O treinamento de futebol contemplou 10 minutos de aquecimento (exercícios de coordenação do Guia *eleven plus* e corridas alternadas) e duas sessões de 12 minutos de treinamento específico de futebol, que consistia em jogos de 3x3 a 7x7 participantes, com 3 minutos de recuperação ativa entre as sessões.

As sessões de corrida consistiram de 10 minutos de aquecimento, seguidos por 1 x 12 minutos de exercício intervalado de alta intensidade e 1 x 12 minutos de treinamento contínuo de intensidade moderada na mesma intensidade média do grupo de futebol. Antes de cada sessão de corrida, todos os sujeitos foram submetidos a um aquecimento dinâmico de 10 minutos, incluindo caminhada e velocidade de corrida, que progrediu de 50 a 100m em uma quadra.

O grupo de corrida realizou 3 sessões de 30m dos seguintes exercícios de corrida: *skipping alto e baixo* (corrida parada, elevando o joelho até a altura do quadril (alto) e elevação de 45° (curto)), *anfersen* (corrida parada, elevando o calcanhar até os glúteos, coordenado com o movimento de braço), *dribble* (eleva o calcanhar alternadamente, sem tirar os pés do chão, mais movimento lateral dos braços), *hopserlauf* (eleva pernas e braços alternadamente, dando um pequeno salto a cada elevação) e *kick-out* (corrida jogando os pés alternadamente para frente, como se estivesse chutando, com movimento lateral

dos braços). Após esses exercícios, seguiu-se com 7 a 10 sessões de 70 a 100 m de intervalo de alta intensidade, funcionando a $> 70\%$ da FC_{máx}.

A recuperação ativa sempre foi incentivada nos exercícios de corrida e futebol. O tempo de recuperação entre as sessões de aquecimento e execução foi de 3 minutos.

As sessões de treinamento foram realizadas ao ar livre, em grama natural, ou em ambientes fechados, no caso de dias chuvosos, em quadra de madeira.

A frequência cardíaca dos participantes foi aferida continuamente, durante todas as sessões de treinamento, usando-se cintos de frequência cardíaca (*POLAR Team System, Polar Electro Oy, Kempele, Finlândia*).

Antes de cada sessão de treinamento, a pressão arterial era aferida com o uso de um monitor automático de pressão arterial de pulso (*HEM-629, OMRON, Illinois, EUA*). Antes e depois de cada sessão de treinamento, a taxa de glicose no sangue foi aferida, através de coleta em ponta de dedo com o auxílio de monitor de glicemia (*ACCU-CHEK® Aviva Nano, Roche Diagnostics, Basileia, Suíça*).

4.6 Captação máxima de oxigênio e frequência cardíaca máxima

Antes e após o período de intervenção, o VO_2 máx (mL/min/kg) e a frequência cardíaca máxima (FC_{max}; b.p.m.) foram medidos durante um protocolo padronizado em uma esteira com inclinação fixa de 2%. O teste foi realizado por um analisador metabólico de gases (*CPX / D, Medgraphics, Saint Paul, MN, EUA*). A eficiência cardiopulmonar foi determinada como o valor de pico atingido em 30 segundos.

Inicialmente, os participantes descansavam por 2 minutos e depois se aqueciam por três minutos. O teste começou com velocidade de 2,7 km/h e foram aplicados aumentos à taxa de 1,2 km/h a cada 2 minutos até a exaustão.

4.7 Circunferência da cintura

Usando uma fita métrica, a circunferência da cintura foi determinada no ponto médio mais próximo entre o ponto mais alto da crista ilíaca e a margem inferior da última costela.

4.8 *Dual energy X-ray absorptiometry (DXA)*

A composição corporal dos participantes foi determinada pré e pós-intervenção. A gordura corporal e a massa magra foram avaliadas usando o DXA de corpo total no equipamento *Hologic 4500 QDR (Bedford, MA, EUA)*.

4.9 Amostragem e análise de sangue

Os sujeitos foram instruídos a não realizar nenhuma atividade física intensa por cinco dias antes dos exames de sangue e a manter o uso dos medicamentos antes da coleta.

As amostras de sangue venoso foram coletadas utilizando tubos da *BD Vacutainer® K2 EDTA e SST™ II Advance da Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EUA)*. Para a dosagem da glicemia, foram utilizados tubos contendo EDTA, os quais foram mantidos no gelo até o momento da separação do plasma.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.000x g em centrífuga refrigerada a 4°C, por 20 min.

A concentração plasmática de glicose foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico (glucose oxidase-peroxidase), com um kit comercial (*Glucose Liquiform do Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil*).

A HbA1c foi determinada por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) utilizando kit comercial (*Biorad, CA, EUA*).

Insulina e glucagon foram dosados por radioimunoensaio (*Millipore Corporation, Billerica, MA, USA*). A sensibilidade à insulina foi estimada pelo método de avaliação do modelo de homeostase (HOMA-IR).

O método enzimático-colorimétrico foi aplicado para determinar triglicerídeos, colesterol total e frações HDL, LDL e VLDL (*Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*).

Os níveis de IGF-1 e IGFBP-3 foram determinados pelo método de imunoensaio quimioluminescente, (*Immulite from Siemens, Los Angeles, USA*).

A análise de TNF- α e de IL-6 foi feita pelo método imunoenzimático Kit *R&D Systems (Quantikine® HS ELISA, Minneapolis, USA)*.

4.10 Procedimento de biópsia muscular

O procedimento de biópsia muscular foi realizado no músculo vasto lateral, seguindo a metodologia de Dietrichson (1987). Todas as coletas foram realizadas pelo mesmo operador, antes da intervenção e 3 a 5 dias após a intervenção. Os fragmentos musculares de 100 a 300 miligramas retirados foram fixados com *TissueTek (Qiagen)* em blocos de cortiça e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

Segundo Johson et al (1973), o músculo vasto lateral apresenta os dois tipos de fibras musculares (I e II), com maior predominância das fibras do tipo II.

Dos 60 pacientes participantes do estudo, apenas 39 concordaram em participar do procedimento.

4.11 Corte e homogeneização do tecido muscular

Foi realizado o corte de aproximadamente 15mg do tecido congelado pesado em balança Analítica *Adventurer (OHAUS)*®. Os cortes foram realizados em placa de Petri, com auxílio de bisturi, dentro de um compartimento com gelo seco, evitando, assim, o descongelamento do tecido.

As amostras foram transferidas para tubos *Precellys 2mL free* DNase/RNase, contendo *bead* magnética de cerâmica de 1,4 e 2,8 mm (*Bertin Technologies*, França).

Adicionamos 300µL do tampão de Lise do kit *MirVana™ miRNA Isolation Lysing Binding Buffer* (Thermofisher Scientific, USA), para a homogeneização do tecido no Equipamento *Tridimensional Precellys 24* (*Bertin Technologies*, França), os quais foram processados em três ciclos de 15 segundos, a 6.500 r.p.m., em temperatura refrigerada, à 4º C. Após o procedimento da homogeneização dos tecidos, os mesmos foram transferidos para tubos *Eppendorf* de 1,5mL *free* de nucleases, dando prosseguimento à etapa de extração do RNA total.

4.12 Extração do RNA total de amostras do músculo esquelético

A extração do RNA total foi realizada com kit *mirVana™ miRNA Isolation* (*Thermofisher Scientific- USA*), conforme descrito a seguir.

Adicionamos, em cada tubo *Eppendorf* de 1,5mL, contendo o tecido lisado, o volume de 30µL do *Homogenate Additive* para enriquecimento dos miRNAs. Seguiu-se a etapa de homogeneização e incubação no gelo por 10min. Em seguida, foram adicionados 300 µL da mistura *Acid-Phenol:Chloroform* do kit, vortexado por 60 segundos, seguido por centrifugação (10.000 r.p.m.) em temperatura ambiente (TA) por 10 minutos, para separação das fases. Decorrida esta etapa, a fase aquosa, contendo o RNA, foi removida cuidadosamente, transferida para um novo tubo *Eppendorf*

de 1,5mL e foi adicionado a este tubo o volume de 1,25x de Etanol P.A. (100%).

Sendo assim, o volume de aproximadamente 700 µL, da mistura lisado/Etanol, foi transferido para a coluna específica, seguido por centrifugação a 10.000 r.p.m., em TA, por 15 segundos. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e seguiu-se com as etapas de lavagens. Finalizadas as lavagens, o RNA total, incluindo os miRNA, foram eluídos com 65 µL da solução fornecida pelo kit, aquecida a 95° C.

O grau de pureza do RNA total foi avaliado em *Nanodrop ND 2000* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), e obtivemos a razão $A_{260}/A_{280} = 2,0$

A integridade das amostras foi avaliada no equipamento *Bioanalyzer 2100 Agilent*, (Agilent Technologies Waldbronn, Germany) com o kit *Agilent RNA 6000 Nano Reagents*, apresentando os valores da integridade do RNA (RIN) na faixa de 7,8 a 8,9.

4.13 Reação de Transcrição Reversa (cDNA)

As amostras de RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa, na qual as amostras foram transcritas para cDNA (DNA complementar) em um termociclador (*Veriti™ 60-well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific Inc.*) a 65°C, por 10 minutos, para melhorar a síntese de cDNA caso o RNA estivesse ligado à proteína.

Para a síntese do cDNA, utilizamos o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante.

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado 2µg de RNA total de cada amostra, com volume final de 20µL, que foram processados no termociclador (*Veriti™ 60-well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific Inc.*), com a seguinte ciclagem: I) 10 minutos a 25 °C; II) 120 minutos a 37 °C; III) 5

minutos a 85°C; IV) a 4°C. Após a reação, as amostras de cDNA obtidas foram estocadas em freezer a -20°C, até a realização do experimento.

4.14 Desenho e teste de eficiência dos primers

Os primers foram desenhados utilizando o software *PerlPrimer* (SourceForge.Net) e sintetizados pela *Life Technologies*, Brasil (*ThermoFisher Scientific Inc.*). Para testar a eficiência dos primers, utilizamos diferentes concentrações (100, 200, 400 e 800M).

Para a escolha da melhor concentração das amostras, foi feito um *pool* de diferentes amostras e testadas em curvas seriadas de diluição (5x, 10x, 20x, 40x e 80x diluídas). Para a realização do ensaio de eficiência, utilizamos técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR), usando *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, CA, EUA*) e processada no equipamento *QuantStudio™ 12K Flex Real Time PCR* (*Applied Biosystems, CA, USA- Thermo Fisher Scientific Inc.*), utilizando os primers listados na Tabela 2.

Para um volume final de 10µL, foram utilizados os volumes específicos de cada primer, 2µL do pool de diferentes amostras de cDNA, 5µL de *SYBR Green*, completando com água livre de RNase (DEPC inativa). Cada ponto da curva de diluição foi realizado em duplicata. Como controle negativo (branco), foram usados poços com o mix da reação (SYBR, primers e água DEPC inativa), exceto o cDNA.

Tabela 2 - Sequências dos primers

Gene (espécie)	Sequencia 5' → 3'
IL-15, mRNA Nm_H7096B02 <i>Homo sapiens</i>	Forward primer: TGACTCGCTCACTGCCTTC
	Reverse primer: TGGATTCTCCATCGAGTCCT
TRIM63, mRNA <u>NM_032588.3</u> <i>Homo sapiens</i>	Forward primer: CTTGACTGCCAAGCAACTC
	Reverse primer: TCCTCATCTGTCCCAAAGTC
FBXO32, mRNA <u>NM_001242463.1</u> <i>Homo sapiens</i>	Forward primer: CAGCAGTTACTGCAACAAGG
	Reverse primer: CCCAGGGTGCAATATCCA
GAPDH, mRNA Nm_001289745.2 <i>Homo sapiens</i>	Forward primer: CCTCTGACTTCAACAGCGAC
	Reverse primer: CGTTGTCATACCAGGAAATGAG
18S, mRNA H7020801 <i>Homo sapiens</i>	Forward primer: CCTGCGGCTTAATTTGACTC
	Reverse primer: ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT

IL-15= interleucina 15; TRIM63= MuRF-1; FBXO32= atrogina-1

4.15 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

Para a reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR), foi utilizado o *SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA)* como marcador de fluorescência no equipamento *QuantStudio™ 12K Flex Real Time PCR (Life Technologies)*, que se baseia na detecção em tempo real de produtos da PCR medidos por fluorescência.

Foram utilizados 2 µL de cDNA de cada amostra, 5 µL de *SYBR Green*, os volumes específicos de cada primer e completado com água livre de RNase (DEPC inativa) para o volume final de 10 µL. A reação ocorreu em triplicata, incluindo o controle negativo (branco) por placa, e para normalização utilizamos o gene controle 18S ribossomal RNA, com a seguinte ciclagem: I) 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, II) 95°C por 15 segundos, II) 63°C por 60 segundos e IV) 72°C por 2 minutos.

Os dados foram expressos como um limiar do ciclo (CT, do inglês *Cycle threshold*), que representa uma linha de base de detecção de fluorescência, correspondente à fase exponencial.

Para análise da expressão gênica qRT-PCR, utilizamos o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, descrito por Schmittgen e Livak (2008). Inicialmente, calculou-se o ΔCT (ou limiar do ciclo) de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT do gene controle (18S) dos valores de CT do gene alvo. Para o cálculo do $\Delta\Delta CT$, utilizou-se a fórmula [ΔCT (amostra normalizadora) – ΔCT (amostra alvo)]. Determinado o $\Delta\Delta CT$, aplicamos a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, resultando no valor da variação de expressão do gene alvo em relação ao gene controle.

Inicialmente, foi utilizado o gene controle GAPDH, no entanto, optamos pela escolha do gene 18S que apresentou variabilidade ainda menor entre todos os grupos do estudo.

O gene 18S foi considerado adequado como gene controle para análise de expressão gênica em tecido muscular humano (MARX et al., 2002), e também em tecido muscular de portadores de DM2 (GORDON et al., 2006).

A expressão de 18S não foi alterada antes e depois das intervenções (*threshold cycles*: $14,19 \pm 0,89$ vs. $13,88 \pm 0,77$ $p=0,1217$).

4.16 Análise Estatística

Inicialmente os dados foram comparados com a Curva Normal pelo teste de Distância Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk e classificados quanto à normalidade pela aderência à Curva de Gauss.

As diferenças entre os grupos, quanto à composição corporal, à ingestão alimentar e aos testes bioquímicos, foram avaliadas por análise de variância, com medidas repetidas (RM ANOVA).

Para as análises das expressões gênicas foram utilizados teste t pareado bicaudal, *Two-Way* ANOVA para a comparação entre grupos e Turkey para teste de múltiplas comparações.

Utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson, para dados com distribuição normal.

Para os dados que não apresentaram distribuição normal foram utilizados testes não paramétricos equivalentes.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do *software* Prism versão 8.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). Foi escolhido o nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da população

Dos 39 participantes do estudo, 19 eram homens e 20 mulheres, com idade média de $60 \pm 6,0$ anos, índice de massa corporal (IMC) de $33,5 \pm 3,88$ kg/m² e $8,2 \pm 0,8$ anos de duração do diabetes tipo 2.

Não houve diferença quanto à idade, gênero, IMC, duração do diabetes, VO₂ máx e valores séricos de HbA1c, insulina, HOMA-IR, glicemia nos três grupos (Tabela 1).

5.2 Tratamento medicamentoso

Todos os pacientes faziam uso de hipoglicemiantes orais: metformina isolada, metformina associada à sulfonilureias, e apenas um paciente do grupo futebol utilizava sulfoniluréia isolada. Alguns faziam uso de hipotensores (71,7%) e estatinas (43,5%) (Tabelas 3 a 6).

Após as intervenções, todos os participantes tiveram diminuição ou suspensão de algum medicamento (Tabelas 3 a 6).

Tabela 3- Número de indivíduos em uso de metformina isolada pré e pós as 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta, Dieta + Futebol e Dieta + Corrida

Metformina isolada	Uso Inicial n	Reduziram ou Suspendiram n(%)	p
Dieta	7	1 (14,2)	0,705
Dieta + Futebol	5	2 (40)	
Dieta + Corrida	4	1 (25)	
TOTAL	16	4 (25)	

Valores $P < 0,05$

Tabela 4- Número de indivíduos em uso de metformina associada a sulfoniluréia pré e pós as 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta, Dieta + Futebol e Dieta + Corrida

Sulfonilureia + metformina	Uso Inicial n	Reduziram ou Suspendiram n(%)	p
Dieta	8	7(87,5)	0,436
Dieta + Futebol	7	2 (28,5)	
Dieta + Corrida	7	6 (85,7)	
TOTAL	22	15 (68,2)	

Valores $P < 0,05$

Tabela 5- Número de indivíduos em uso de estatina pré e pós as 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta, Dieta + Futebol e Dieta + Corrida

Estatina	Uso Inicial n	Reduziram ou Suspendiram n(%)	p
Dieta	5	1 (20)	0,632
Dieta + Futebol	8	2 (25)	
Dieta + Corrida	4	0 (0)	
TOTAL	17	3 (17,6)	

Valores $P < 0,05$

Tabela 6- Número de indivíduos em uso de hipotensores pré e pós as 12 semanas de intervenção nos grupos Dieta, Dieta + Futebol e Dieta + Corrida

Hipotensor	Uso Inicial n	Reduziram ou Suspendiram n(%)	p
Dieta	13	4 (30,7)	0,563
Dieta + Futebol	6	2 (33,3)	
Dieta + Corrida	9	6 (66,6)	
TOTAL	28	12 (42,8)	

Valores $P < 0,05$

5.3. Avaliação da composição corporal

A composição corporal dos voluntários antes e após as 12 semanas de intervenção está apresentada na Tabela 7.

As medidas de peso total, IMC e gordura corporal (kg e %) foram reduzidas em todos os grupos após as 12 semanas de tratamento ($p < 0,05$) (Tabela 7). A circunferência da cintura reduziu-se em todos os grupos, sendo de forma mais expressiva entre os participantes de corrida, com diminuição de 7,5cm vs 5,3 e 5,0 cm nos grupos D e DF. Houve perda de massa magra apenas no grupo DC de aproximadamente 1kg.

Tabela 7 - Composição corporal pré e pós 12 semanas de intervenção nos grupos: Dieta (D, n=13), Dieta + Futebol (DF, n=13) e Dieta + Corrida (DC, n=13)

Medidas antropométricas	Dieta (D) (n=13)	Dieta + Futebol (DF) (n=13)	Dieta + Corrida (DC) (n=13)
Peso total (kg)			
Pré	85,5 ± 3,9	91,3 ± 3,5	86,2 ± 4,6
Pós	81,3 ± 3,4*	87,8 ± 3,1*	80,9 ± 3,9*
IMC (kg/m²)			
Pré	33,3 ± 1,2	33,1 ± 1,0	33,8 ± 1,1
Pós	31,4 ± 1,1*	31,4 ± 0,8*	31,2 ± 0,9*
Circunferência cintura (cm)			
Pré	106,5 ± 2,3	109,0 ± 3,1	106,9 ± 2,7
Pós	101,2 ± 2,0*	104,0 ± 2,6*	99,4 ± 2,6*&
Gordura corporal (kg)			
Pré	31,0 ± 2,3	31,7 ± 2,7	29,6 ± 2,0
Pós	28,0 ± 2,0*	28,1 ± 2,2*	25,3 ± 1,6*
Gordura corporal (%)			
Pré	36,2 ± 2,0	34,3 ± 1,6	34,4 ± 1,6
Pós	34,3 ± 1,9*	31,8 ± 2,0*	31,5 ± 1,6*
Massa magra (kg)			
Pré	54,4 ± 3,0	59,6 ± 2,4	56,6 ± 3,3
Pós	53,3 ± 2,6	59,7 ± 2,3	55,5 ± 3,1*

Valores são a média ± erro padrão. IMC: Índice de massa corporal.

* $P < 0.05$ vs pré- intervenção

& $P < 0,05$ comparação entre grupos

5.4 Avaliação do consumo alimentar

Antes e após as 12 semanas de intervenção, os grupos não diferiram no consumo de calorias, macronutrientes e fibras ($p>0,05$).

No entanto, após o acompanhamento nutricional, com plano alimentar calculado e moderadamente restritivo, os voluntários consumiram menos carboidratos e lipídios em todos os grupos ($p<0,05$) e somente no grupo corrida, houve diminuição do consumo de proteínas ($p<0,05$). Em relação ao consumo de fibras, não houve mudança após a intervenção em nenhum grupo (Tabela 8).

Tabela 8 - Composição dos macronutrientes do plano alimentar pré e pós 12 semanas de intervenção nos grupos: Dieta (D, n=13), Dieta + Futebol (DF, n=13) e Dieta + Corrida (DC, n=13)

Composição alimentar	Dieta (D) (n=13)	Dieta + Futebol (DF) (n=13)	Dieta + Corrida (DC) (n=13)
Calorias (kcal/dia)			
Pré	1693,0 ± 93,8	1930,0 ± 177,4	1838,0 ± 143,2
Pós	1421,0 ± 63,1*	1498,0 ± 73,7*	1369,0 ± 106,6*
Calorias (kcal/kg/dia)			
Pré	20,8 ± 1,3	21,2 ± 1,9	21,7 ± 1,3
Pós	18,4 ± 1,3*	17,3 ± 1,0*	17,4 ± 1,4*
Carboidrato (g/dia)			
Pré	195,0 ± 9,5	248,0 ± 23,9	228,0 ± 19,3
Pós	161,0 ± 6,8*	169,0 ± 6,8*	169,0 ± 14,2*
Carboidrato (g/kg/dia)			
Pré	2,3 ± 0,1	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,2
Pós	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1*	2,0 ± 0,2*
Proteína (g/dia)			
Pré	76,7 ± 7,0	87,2 ± 5,7	79,1 ± 7,3
Pós	75,1 ± 6,8	85,4 ± 7,4	64,1 ± 5,6*
Proteína (g/kg/dia)			
Pré	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0
Pós	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,0
Lipídios (g/dia)			
Pré	67,2 ± 5,5	70,6 ± 6,9	67,6 ± 6,8
Pós	52,6 ± 2,5*	55,6 ± 4,3*	48,4 ± 4,2*
Lipídios (g/kg/dia)			
Pré	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0
Pós	0,6 ± 0,0*	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0*
Fibras (g/dia)			
Pré	16,8 ± 1,9	17,1 ± 1,8	18,9 ± 1,8
Pós	17,4 ± 1,0	14,7 ± 1,3	15,2 ± 1,6

Valores são a média ± erro padrão, * $P < 0,05$ vs pré-intervenção

5.5. Variáveis bioquímicas

Os valores de glicose, HbA1c e glucagon reduziram-se após as 12 semanas de tratamento ($p<0,05$), sem diferença entre os três grupos (Tabela 9). As concentrações basais de IGF-1 aumentaram nos grupos D e DC, enquanto as de insulina reduziram somente no grupo que praticou corrida.

Quanto ao perfil lipídico, as concentrações de triglicérides, colesterol total e VLDL se reduziram nos grupos submetidos ao treinamento físico ($p<0,05$). Os valores de colesterol total, VLDL-c e LDL-c também foram menores nestes grupos em relação à dieta. O grupo corrida teve as maiores reduções de VLDL-c. A fração HDL não se alterou em nenhum dos tratamentos ($p>0,05$)

Em relação às citocinas inflamatórias, as concentrações séricas de TNF- α não se alteraram com o tratamento em nenhum grupo ($p>0,05$) e os valores de IL-6 reduziram-se somente no grupo D após 12 semanas ($p<0,05$).

Tabela 9 - Variáveis bioquímicas pré e pós 12 semanas de intervenção nos grupos: Dieta (D, n=13), Dieta + Futebol (DF, n=13) e Dieta + Corrida (DC, n=13)

Variáveis bioquímicas	Dieta (D) (n=13)	Dieta + Futebol (DF) (n=13)	Dieta + Corrida (DC) (n=13)
Glicose (mg/dL)			
Pré	172,0 ± 9,9	167,5 ± 13,0	161,0 ± 11,0
Pós	140,7 ± 4,3*	135,2 ± 7,5*	133,0 ± 6,5*
HbA1c (%)			
Pré	7,6 ± 0,3	7,4 ± 0,4	7,2 ± 0,3
Pós	6,5 ± 0,15*	6,3 ± 0,2*	6,2 ± 0,2*
Insulina (μU/mL)			
Pré	27,7 ± 5,0	17,6 ± 1,3	22,7 ± 3,1
Pós	23,1 ± 3,6	16,1 ± 1,9	17,5 ± 2,3*
Glucagon (pg/mL)			
Pré	126,2 ± 8,0	115,6 ± 8,1	123,2 ± 7,7
Pós	107,1 ± 5,3*	91,3 ± 5,4*	104,4 ± 8,8*
IGF-1 (ng/mL)			
Pré	144,4 ± 14,5	141,7 ± 17,6	159,4 ± 13,2
Pós	175,0 ± 15,5*	149,3 ± 15,6	188,3 ± 14,3*
Triglicérides (mg/dL)			
Pré	150,3 ± 23,0	140 ± 10,1	194,2 ± 21,3
Pós	164,6 ± 20,8	117,1 ± 13,9*	128,7 ± 11,0* ⁺
Colesterol total (mg/dL)			
Pré	181,7 ± 13,3	179,6 ± 9,0	211,4 ± 10,8
Pós	203,0 ± 14,6	163,3 ± 9,5* ⁺	188,4 ± 9,6* ⁺
VLDL-c (mg/dL)			
Pré	29,0 ± 3,8	27,9 ± 2,0	38,8 ± 4,2
Pós	32,9 ± 4,1	23,4 ± 2,8* ⁺	25,6 ± 2,1* ^{&+}

Continua

Tabela 9 – Conclusão: Variáveis bioquímicas pré e pós 12 semanas de intervenção nos grupos: Dieta (D, n=13), Dieta + Futebol (DF, n=13) e Dieta + Corrida (DC, n=13)

Variáveis bioquímicas	Dieta (D) (n=13)	Dieta + Futebol (DF) (n=13)	Dieta + Corrida (DC) (n=13)
LDL-c (mg/dL)			
Pré	106,7 ± 12,7	110,6 ± 9,8	128,7 ± 9,0
Pós	125,8 ± 12,2	96,8 ± 8,3 ⁺	117,3 ± 9,0 ⁺
HDL-c (mg/dL)			
Pré	46,3 ± 2,4	41,0 ± 2,4	45,3 ± 3,7
Pós	44,2 ± 1,8	43,0 ± 3,3	45,4 ± 3,5
TNF-α (pg/mL)			
Pré	2,2 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,1
Pós	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,1 ± 0,1
IL-6 (pg/mL)			
Pré	4,3 ± 0,9	3,1 ± 0,4	2,9 ± 0,3
Pós	2,7 ± 0,4 [*]	4,7 ± 1,3 ⁺	2,4 ± 0,3

Valores são a média ± erro padrão. HbA1c: hemoglobina glicada; IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; VLDL-c: Lipoproteína de muito baixa densidade; LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: Lipoproteína de alta densidade; TNF-α: Fator de necrose tumoral- alpha; IL-6: Interleucina 6.

*P<0,05 vs pré; & P<0,05 vs grupo Dieta +futebol; ⁺ P<0,05 vs grupo Dieta

5.6 Expressão gênica no tecido muscular esquelético

A expressão do gene hipertrófico IL-15 aumentou após as 12 semanas de intervenção somente entre os participantes do grupo corrida ($p < 0,05$) e não se alterou nos demais grupos ($p > 0,05$; tabela 10 e figura 5).

Em relação aos genes atroficos, atrogina-1 e MuRF-1, observou-se menor expressão após as 12 semanas de treinamento somente no grupo futebol ($p < 0,05$) (Tabela 10; figuras 6 e 7).

Na comparação entre grupos, somente a expressão da IL-15 diferiu do grupo DC comparado ao do DF no pós intervenção (Figura 8 A).

Tabela 10 - Expressão dos genes IL-15, atrogina-1 e MuRF-1 no tecido muscular pré e pós 12 semanas de intervenção nos grupos: Dieta (D, n=13), Dieta + Futebol (DF, n=13) e Dieta + Corrida (DC, n=13)

Genes	DIETA (D) (n=13)	Dieta + futebol (DF) (n=13)	Dieta+ corrida (DC) (n=13)
IL-15			
Pré	1,192 $\pm$ 0,21	1,011 $\pm$ 0,18	1,056 $\pm$ 0,12
Pós	1,375 $\pm$ 0,22	0,787 $\pm$ 0,17	1,308 $\pm$ 0,13 ^{*&}
Atrogina-1			
Pré	1,348 $\pm$ 0,32	1,084 $\pm$ 0,14	1,083 $\pm$ 0,12
Pós	1,194 $\pm$ 0,18	0,754 $\pm$ 0,14 [*]	1,037 $\pm$ 0,14
MuRF-1			
Pré	1,287 $\pm$ 0,27	1,175 $\pm$ 0,34	1,078 $\pm$ 0,10
Pós	1,224 $\pm$ 0,22	0,693 $\pm$ 0,12 [*]	1,092 $\pm$ 0,18

Valores são a média $\pm$ erro padrão. ^{*} $p < 0,05$ vs pré; [&] $p < 0,05$ vs pós do grupo Dieta + Futebol. A expressão dos genes-alvo foi comparada com o gene de referência 18S.

A)

B)

C)

Figura 5 - Expressão da IL-15 mRNA no músculo esquelético nos períodos pré e pós intervenção nos grupos (A) Dieta, (B) Dieta + Futebol e (C) Dieta + Corrida. Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão. *** $p < 0,0005$ diferença significativa do pós intervenção comparado ao pré.

Figura 6 - Expressão da Atroquina-1 mRNA no músculo esquelético nos períodos pré e pós intervenção nos grupos (A) Dieta, (B) Dieta + Futebol e (C) Dieta+ Corrida. Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ diferença significativa do pós intervenção comparado ao pré.

A)

B)

C)

Figura 7 - Expressão da MuRF-1 mRNA no músculo esquelético nos períodos pré e pós intervenção nos grupos (A) Dieta, (B) Dieta + Futebol e (C) Dieta + Corrida. Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ diferença significativa do pós intervenção comparado ao pré.

A)

B)

C)

Figura 8- Comparação entre os grupos Dieta (D), Dieta + Futebol (DF), Dieta + Corrida (DC), nos períodos pré e pós intervenção. (A) IL-15, (B) Atrogina-1 e (C) MuRF-1. Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ vs pré- intervenção; # $p < 0,05$: pós intervenção DC vs pós DF.

5.7 Correlações das variáveis antropométricas, exames bioquímicos e consumo alimentar

Realizamos teste de correlações entre as miocinas atrogina-1, MuRF-1 e IL-15 com as variáveis antropométricas, bioquímicas e de consumo alimentar dos grupos Dieta, Dieta + Futebol e Dieta + Corrida (APÊNDICE 2).

Apenas no grupo corrida observamos correlação negativa entre os valores de LDL-c e a expressão da IL-15 ($r = -0,601$, $p < 0,05$) (Figura 9) e, entre o consumo proteico e genes atrofícos (Figuras 10 e 11) ($r = -0,630$ e $r = -0,566$), para atrogina-1 e MuRF-1, respectivamente; $p < 0,05$.

Figura 9 - Correlação entre o gene IL-15 e a fração lipídica LDL-c em cada grupo: Dieta (D), Dieta + Futebol (DF) e Dieta + Corrida (DC). * $P < 0,05$

Figura 10 - Correlação entre o gene MuRF-1 e o consumo de proteína nos grupos: Dieta (D), Dieta + Futebol (DF) e Dieta + Corrida (DC). * $P<0,05$

Figura 11 - Correlação entre o gene atrogin-1 e o consumo de proteína nos grupos: Dieta (D), Dieta + Futebol (DF) e Dieta + Corrida (DC). * $P<0,05$

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisadas as variáveis de composição corporal, consumo alimentar, exames bioquímicos e de expressão gênica de pacientes portadores de diabetes do tipo 2 antes e após um programa de intervenção nutricional associado à prática de treinamento físico recreativo.

Foram observadas reduções significativas nas variáveis de gordura corporal em todos os grupos após 12 semanas de tratamento, resultado da menor ingestão de carboidratos e lipídios, entre os participantes, demonstrando a importância da restrição calórica moderada e da alimentação equilibrada, independentemente da prática de exercícios físicos, na composição corporal.

A massa magra corporal foi mantida nos grupos D e DF, e reduziu apenas 1 Kg entre os participantes de corrida. Krustup et al. (2008) observaram seu aumento de massa magra entre homens jovens praticantes de futebol e manutenção no grupo corrida após 12 semanas de treinamento. Bangsbo et al. (2010) também investigaram o impacto de diferentes tipos de treinamento em mulheres pré-menopausadas, por 16 semanas, observando aumento significativo da massa magra entre as participantes de ambos os grupos (futebol e corrida).

Embora esteja bem estabelecido que a atividade física aumente o conteúdo mitocondrial no músculo, os participantes do nosso estudo apresentam diabetes do tipo 2, doença caracterizada por disfunção na biogênese mitocondrial e redução da síntese de ATP da massa muscular (JORNAYVAZ et al., 2010).

A perda mínima de massa magra no grupo DC, comum em indivíduos submetidos a tratamento para emagrecimento, pode estar associada ao menor consumo de proteína na dieta durante o período de intervenção, embora todos os participantes tenham recebido a mesma orientação nutricional. A orientação nutricional para todos os grupos seguiu a recomendação vigente da época, que foi de 1,0g/kg/dia. No entanto, observamos a redução do consumo entre os

praticantes de corrida de aproximadamente 15g/dia. O consumo adequado de proteína ao longo do treinamento físico é fundamental em idosos, na prevenção da perda de massa muscular (SOUSA et al., 2019).

A quantidade de proteína para adultos e idosos saudáveis é estabelecida de acordo com as recomendações da *Recommended Dietary Allowance* (RDA) e varia entre 0,8 e 1 g/kg/dia. A RDA tem sido usada, na prática nutricional, como meta da ingestão de macronutrientes. No entanto, o conceito de RDA envolve uma quantidade mínima aceitável, podendo não condizer com a real necessidade de proteínas. Assim, é necessário determinar se os melhores resultados para a saúde podem ser alcançados com a oferta de proteínas na dieta maior do que a RDA.

Sabemos que idosos sofrem maior prevalência de doença crônica quando comparados aos mais jovens. Nosso recente trabalho de revisão de literatura utilizou essa evidência, sugerindo maior ingestão de proteínas, entre 1,2 e 1,5g/kg/dia, para idosos. Essa recomendação é apoiada por pesquisas epidemiológicas que mostram uma associação positiva entre maior ingestão de proteínas na dieta e prevenção de doenças metabólicas e crônicas (SOUSA et al., 2019).

É um desafio, na população idosa com restrição calórica, manter a massa magra. Em adultos mais jovens, exercício e restrição calórica, com aporte proteico adequado, estimulam a biogênese mitocondrial do músculo esquelético, enquanto no idoso, devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio e fatores inflamatórios, podem favorecer a perda muscular (WOHLGEMUTH et al., 2011).

O diabetes acelera a redução de massa muscular e da força pela hiperglicemia, resistência à insulina, citocinas inflamatórias e alterações endócrinas. A sinalização reduzida de insulina leva à diminuição da síntese de proteínas e à sua maior degradação, o que pode levar à redução da massa muscular. Assim, resistência à insulina pode aumentar a degradação de proteínas musculares, suprimindo a atividade da via PI3K (MIKI et al., 2017).

O processo de emagrecimento com restrição calórica, mesmo que acompanhado de treinamento físico, pode favorecer a perda de massa magra,

devido à diminuição do aporte energético e proteico, indispensáveis no crescimento muscular.

Com relação aos valores de glicose, HbA1c e glucagon, houve redução em todos os grupos após as 12 semanas. No entanto, observamos resultados mais vantajosos, entre os praticantes de treinamento recreativo, no perfil lipídico, evidenciado pelos menores valores de triglicérides, colesterol total e VLDL-c. A melhora do perfil lipídico foi ainda mais expressiva entre praticantes de corrida, que também reduziram a concentração de insulina e a circunferência da cintura, sugerindo melhora metabólica mais significativa em relação aos demais grupos, D e DF. Sabemos que a redução da obesidade visceral é importante na prevenção da resistência à ação da insulina e da doença cardiovascular (LUKÁCS et al., 2019). O aumento de IGF-1 e de IL-15 pode ter contribuído na melhora da sensibilidade à ação da insulina e na redução da gordura visceral no grupo corrida.

Sabemos que indivíduos com obesidade abdominal apresentam risco aumentado de distúrbios cardiometabólicos devido à gordura visceral. Assim, a redução da circunferência da cintura está associada à diminuição da pressão arterial, da glicemia de jejum, da resistência à insulina e do perfil lipídico (LUKÁCS et al., 2019). Neste estudo, observamos, principalmente entre os praticantes de corrida, redução mais expressiva da circunferência da cintura e, consequentemente, dos valores de insulina e VLDL-c.

Também foram investigados os efeitos da dieta e dos treinamentos recreativos de futebol e corrida em portadores de diabetes do tipo 2 na modulação dos genes atrofícos, atrogina-1 e MuRF-1, e do gene hipertrófico IL-15, presentes no músculo esquelético. As miocinas MuRF-1 e Atrogina -1 participam da degradação proteica, enquanto a IL-15 favorece a remodelação das proteínas musculares.

As expressões médias da atrogina-1 e da MuRF-1 foram semelhantes nos grupos D e DC após as 12 semanas de tratamento, enquanto houve redução significativa da atrogina-1 ($1,084 \pm 0,14$ vs. $0,754 \pm 0,14$) e da MuRF-1 ($1,175 \pm 0,34$ vs. $0,693 \pm 0,12$) entre os praticantes de futebol. O aumento do MuRF-1 mRNA precede o início da perda da massa muscular, sendo validada em estudos de atrofia muscular. Citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α ou

a IL-6 também podem estimular a expressão de MuRF-1 e Atrogina-1, aumentar a ubiquitinação dessas proteínas e, desse modo, acelerar a degradação mediada pelo sistema ubiquitina-proteossoma (SHAARANI et al., 2013).

As duas ligases E3 (MuRF-1 e Atrogina-1) são específicas do músculo esquelético, sendo o MuRF-1 o principal fator regulatório para o sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) (BROOKS et al., 2010). A atrogina-1 é o principal alvo do fator regulador da transcrição de proteínas MyoD e do fator de iniciação eucariótica 3F (eIF-3F), que participa da sinalização mTOR-p70S6k, enquanto MuRF-1 interage com proteínas titina e miosina de cadeias leves 1 e 2 (BORGENVIK et al., 2012).

A menor expressão do MuRF-1 e atrogina-1 após treinamento de futebol sugere atenuação da degradação de proteínas reguladoras envolvidas no anabolismo do músculo, contribuindo na manutenção da massa magra, conforme observamos no presente estudo. Entre os participantes do grupo corrida, notamos a manutenção da expressão desses genes e a perda discreta de massa magra.

A expressão de atrogina-1, na maioria dos estudos, não se altera após treinamento físico. Entretanto, dois estudos apresentaram redução (LIM et al., 2017, BROOKS et al., 2010). O estudo de Lim et al. (2017), após treino de musculação em jovens, e em Brooks et al. (2010) após exercício de resistência “*up and go*” (teste de capacidade de equilíbrio, onde o sujeito levanta-se da cadeira, anda 6 m e volta para a sentar-se novamente), corrobora a modulação gênica observada entre os praticantes de futebol do presente estudo.

Em relação ao MuRF-1, nos estudos de Gielen et al. (2012) e Watson et al. (2013), a expressão foi reduzida após 4 semanas de treinamento aeróbio, em portadores de insuficiência cardíaca, e após 6 meses de caminhada em pacientes renais crônicos (APÊNDICE 3, Tabela 2), corroborando com nossos achados do treinamento de futebol.

Resultados diferentes foram observados quando se avaliou apenas o efeito da atividade física em mulheres jovens saudáveis, com menor propensão à sarcopenia. No estudo de Salanova et al. (2008), o treinamento aeróbio associado à prática de musculação atenuou o catabolismo muscular,

evidenciado pela manutenção das concentrações do MuRF-1 nos músculos vasto lateral e sóleo, conferindo efeito protetor para a atrofia. Em contrapartida, no grupo de mulheres que não praticaram o treinamento físico (controle), foi observado aumento da MuRF-1 no músculo sóleo após 60 dias, sugerindo maior propensão à atrofia.

Nossos resultados de menor expressão de genes atrofícos, entre os portadores de DM2 praticantes de futebol, sugerem que exercícios de intensidade moderada a alta, com múltiplas ações intensas de deslocamentos, explosões, corridas e alguns períodos de picos de frequência cardíaca máxima preditivos do treino de futebol, estimulam efetivamente adaptações músculo-esqueléticas e cardiovasculares, durante treinamento de 3 meses, à semelhança do observado por outros autores em indivíduos não diabéticos (KRUSTRUP et al., 2008; KRUSTRUP et al., 2010b).

Esses autores reportaram que o treinamento recreativo de futebol, entre 40 min e 1 h, na frequência de duas a três vezes por semana, durante 12 a 16 semanas, em homens e mulheres destreinados e sem experiência prévia com futebol, acarretou: melhorias no desempenho de *sprint*, na capacidade máxima de oxigênio (VO_{2max}), na resistência à fadiga, no aumento da massa muscular do quadríceps, em maior capilarização muscular, no aumento da força do músculo e na melhora do equilíbrio postural. Em particular nas mulheres, aumentou a potência e altura do salto elevado (KRUSTRUP et al., 2010b).

Esses autores investigaram previamente os efeitos da prática de futebol e corrida por 12 semanas em homens jovens destreinados, observando aumento da massa magra somente entre os praticantes de futebol e manutenção no grupo corrida (KRUSTRUP et al., 2010a).

Dessa forma, consideramos que todos os benefícios músculo-esqueléticos adquiridos com o treinamento de futebol contribuíram para a menor expressão dos genes atrofícos e favoreceram a manutenção da massa magra, como observado nos portadores de DM2 deste estudo.

Com relação ao grupo dieta, houve manutenção dos valores dos genes atrofícos atrogina-1 e MuRF-1 e aumento das concentrações séricas de IGF-1 após as 12 semanas de tratamento, demonstrando que a adequação da

alimentação pode ser positiva na prevenção da perda de massa magra nas restrições calóricas.

No que se refere à IL-15, as 12 semanas de tratamento em portadores de DM2 aumentaram a expressão dessa miocina hipertrófica somente entre os participantes da corrida (pré $1,056 \pm 0,12$ vs. pós $1,308 \pm 0,13$; $p < 0,05$) (Tabela 10, Fig.5C), sem alterações significativas nos demais grupos (Tabela 10, Fig 5A e 5B).

A IL-15 e seu receptor IL-15R α promovem biogênese mitocondrial, captação de glicose, oxidação de gordura e miogênese (BUSQUETS et al., 2006). Estudos mostram que a estimulação dos miócitos com IL-15 favorece a hipertrofia com acúmulo de cadeias pesadas de miosina e α -actina, indicando efeito anabólico da IL-15, além de diminuir o tecido adiposo, por aumentar a lipólise e reduzir a adipogênese, desempenhando papel importante de adaptação muscular durante o exercício (QUINN et al., 2002; FURMANCZYK e QUINN, 2003).

Rinnov et al. (2014) mostraram que as 12 semanas de treinamento aeróbio aumentaram as concentrações da proteína IL-15 no músculo de homens saudáveis em 40%, quando comparado aos valores pré-treino, com redução da gordura corporal e do IMC. No entanto, as expressões da IL-15 não sofreram alteração após o treinamento crônico, corroborando os dados do presente estudo nos grupos futebol e dieta.

Considerando que o treinamento de futebol e de corrida são considerados aeróbios, eles apresentam suas particularidades, percebidas pelas diferentes expressões das miocinas em questão. O aumento da IL-15 somente no grupo corrida possivelmente ocorreu pelo treinamento aeróbio mais contínuo, com poucas pausas, diferente dos jogos de futebol 3x3 e 7x7, que envolviam saltos, corridas, *sprints* e dribles. Assim, hipotetizamos que a corrida apresentou maior intensidade de treino, corroborando pela perda de 1kg de massa magra e a diferença significativa na redução da circunferência da cintura e do perfil lipídico em comparação com o futebol. Além disso, a associação negativa entre a IL-15 e a fração LDL-c, observada somente no grupo corrida, respalda tais achados.

Assim, o provável aumento de intensidade de treino, associado à menor ingestão de proteína (~15g), entre os participantes de corrida, contribuiu na perda de massa magra. Afinal, idosos precisam de maior aporte proteico a fim de compensar as condições inflamatórias e catabólicas associadas às doenças crônicas, como o diabetes tipo 2, e essa necessidade é aumentada com a prática da atividade física. A correlação negativa entre o consumo de proteína com a expressão dos genes atrogina-1 e MuRF-1, evidenciada somente no grupo corrida, sugere esse incremento nutricional.

Para idosos praticantes de atividade, é recomendada, em níveis individualizados, seguros e tolerados, a maior ingestão de proteína: $\geq 1,2$ g/kg/dia (BAUER et al., 2013). E, no nosso recente estudo de revisão, Sousa et al. (2019), a maioria dos idosos com doenças agudas ou crônicas necessita de maior aporte proteico na dieta, entre 1,2 e 1,5 g/kg/dia.

Em se tratando do portador de diabetes tipo 2, Evert et al. (2019) recomendam a ingestão de 1,0-1,5g/kg/d ou de 15 a 20% do valor calórico total, apesar de não haver uma porcentagem ideal de calorias, carboidratos, proteínas e gorduras específicos para esta população. Portanto, a distribuição dos macronutrientes deve ser baseada na avaliação individualizada, com os atuais padrões, preferências alimentares e metas metabólicas.

Assim, podemos considerar, pelos nossos achados, a possibilidade de que o maior consumo de proteína $>1,2$ g/kg/dia, principalmente nos grupos que praticaram treinamento, contribuiria em melhores resultados de composição corporal e de expressão gênica.

No que diz respeito às citocinas inflamatórias, a IL-6 exerce ação catabólica no músculo esquelético, induzindo a degradação de proteínas e a inibição de mioblastos esqueléticos (DUAN et al., 2017).

Observamos, que portadores de diabetes tipo 2, sob tratamento, com dieta e sem a prática do treinamento físico, reduziram a concentração de IL-6, provavelmente pelo consumo adequado de proteínas, semelhante aos achados de Daly et al. (2014), em idosas ativas, com aporte proteico de aproximadamente 1,15g/kg/dia na dieta. Diferentemente, nos participantes submetidos ao treinamento recreativo, não houve alteração dessa citocina.

Segundo Yargirc et al. (2019), as concentrações da IL-6 podem ser afetadas pela duração e pela intensidade do exercício, pelo tamanho da massa muscular envolvida e pelo consumo alimentar.

Na metanálise de Hall et al. (2019), pacientes com osteoartrite em vigência de dieta hipocalórica apresentaram menores concentrações plasmáticas de IL-6, enquanto naqueles que a associaram treinamento aeróbio ou anaeróbio, não houve alteração – semelhantemente aos resultados deste estudo.

O aumento da ingestão de proteínas pode afetar indiretamente os músculos, pela redução da inflamação mediada por aumento no IGF-1 sérico (STILLING et al., 2017), sendo um mecanismo sugerido para os achados do grupo dieta deste estudo.

No que tange à preservação dos músculos, deve-se ter atenção aos medicamentos, que podem desempenhar papel importante no desenvolvimento da sarcopenia. Muitos medicamentos, utilizados pelos portadores de DM2 podem interagir com mecanismos que alteram o equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas, com repercussões prejudiciais ou benéficas sobre a massa e a força musculares (CAMPINS et al., 2017).

No músculo, a ativação da AMPK pela metformina promove a utilização de glicose. O aumento da atividade da AMPK é associado à maior translocação do transportador GLUT4 para a membrana plasmática, ao aumento da atividade da hexoquinase e do conteúdo de glicogênio nas células musculares. Além disso, ocorre aumento da oxidação de ácidos graxos (ROVARIS et al., 2010).

A metformina também parece alterar o metabolismo lipídico, diminuindo os triglicérides plasmáticos e os ácidos graxos livres. A metformina melhora as funções endoteliais, provoca discreta redução da pressão arterial (tanto sistólica quanto diastólica) e reduz o peso de indivíduos com diabetes ou resistência periférica à insulina (LONG et al., 2017)

Outro medicamento utilizado por muitos portadores de diabetes, que pode influenciar o catabolismo dos músculos, é a estatina. Esse fármaco é utilizado para reduzir o colesterol e diminuir o risco cardiovascular. Embora sejam tolerados, os efeitos colaterais musculares são bastante comuns e podem afetar até 29% dos pacientes (CAMPINS et al., 2017).

Segundo Di STASI et al., 2010, a atividade da via da ubiquitina proteassoma pode ser alterada em vigência de estatina e exercício tendo portanto, o potencial de favorecer a degradação de proteínas musculares. No entanto os mecanismos exatos dos efeitos adversos das estatinas nos músculos esqueléticos não foram totalmente elucidados.

Por fim, a despeito das miocinas do presente estudo, após levantamento bibliográfico na base de dados PubMed, somente com ensaios clínicos e treinamento físico crônico utilizando os descritores IL-15 e sua nomenclatura MGC9721 e exercício, obtivemos como resultado apenas 1 artigo. Com os descritores MuRF-1 e suas nomenclaturas, IRF, RNF28, SMRZ, TRIM63 e exercício, foram encontrados 6 artigos. Enquanto que, com a atrogina-1 e as suas nomenclaturas, MAFbx, FBXO32 e exercício, foram encontrados 8 artigos (APÊNDICE 3).

Desses, não foi encontrado nenhum estudo avaliando portadores de diabetes mellitus do tipo 2, grupo que caracteriza estilo de vida sedentário, e estado inflamatório e, por isso, apresenta risco elevado de perda de massa muscular e sarcopenia.

Os resultados dessa pesquisa bibliográfica são condizentes com nossos achados, pois, do total de 14 estudos, as expressões de atrogina- 1 e MuRF-1 não se alteraram em 10 deles após o treinamento, enquanto, nos outros 4, houve redução de ambos os genes atroficos após as intervenções com exercício (APÊNDICE 3, Tabela 1 e 2).

Com relação à revisão bibliográfica de treinamento físico crônico e a expressão da IL-15, foi encontrado somente um estudo em humanos. No estudo, Rinnov et al. (2014) observaram a manutenção da expressão gênica da IL-15 em jovens ativos, que praticaram treinamento crônico de até 2 horas, 5x/semana, durante 12 semanas, e aumento somente após 21h do treino agudo. Entretanto, houve o aumento da concentração proteica somente após o treinamento crônico (APÊNDICE 3, Tabela 3).

Sabaratham et al. (2018) avaliaram o efeito agudo de 60 min de ciclismo na expressão da IL-15 em homens portadores de diabetes tipo 2. Não houve efeito imediato do exercício na expressão gênica, mas redução após 3 horas de recuperação. A regulação da IL-15 pode depender do tipo de exercício

(aeróbio ou resistido), do período de treinamento (agudo ou crônico), do condicionamento físico dos indivíduos, da condição patológica e do momento da coleta da biópsia muscular após treinamento.

Limitações do estudo

Embora todos os grupos tenham recebido orientações nutricionais semelhantes, com acompanhamento nutricional semanal durante todo o tratamento, entre os participantes da corrida houve redução da ingestão de proteínas observada ao término da intervenção.

Estudos futuros

Para dar sequência à investigação, pretendemos analisar as concentrações das proteínas atrogina-1, MuRF-1 e IL-15. Assim como as análises dos microRNAs que participam das vias anabólicas e anti-inflamatórias: miR-1, miR-133, miR-24, miR-26, miR-181, miR-206, miR-486, miR-128a, miR-27a/b, miR-378, miR-23a, miR434-3p (ZHANG et al., 2018; WANG et al., 2018. FREIRE et al., 2019). E também miR-130b, miR-21, miR-212, miR-672, miR-223, miR-222, miR-221, miR-203, miR-132, miR-511, miR-146b, miR-1949, miR-326, miR-29b, let-7, que atuam na regulação de genes atroficos (LI et al., 2017; WANG et al., 2018).

7. CONCLUSÕES

Concluimos que o treinamento recreativo associado à dieta de restrição calórica moderada previne o aumento da expressão das miocinas atroficas atrogina-1 e MuRF-1 e pode favorecer a expressão do gene anabólico e anti-inflamatório IL-15, contribuindo na ativação de vias de controle glicêmico e de síntese proteica em portadores de diabetes tipo 2, facilitando o controle da doença – evidenciado pela melhora do perfil lipídico – pela perda de gordura corporal e prevenção de comorbidades.

Os achados deste estudo podem contribuir para a compreensão dos fatores que desencadeiam a perda da massa magra, como o consumo inadequado de proteína, e para o desenvolvimento de estratégias para combater a sarcopenia e prevenir o DM2.

.

8. ANEXO

Métodos

Tamanho da amostra

O presente estudo é um ensaio clínico controlado randomizado para variáveis de confusão. O desfecho primário foi a mudança na variação de gordura corporal entre os três grupos analisados.

Esperando uma queda mínima de 3,5 na taxa de gordura corporal entre os grupos com um desvio padrão médio das amostras de 2,15, estimou-se que cada grupo tivesse pelo menos 9 pacientes para um risco $\alpha \leq 5\%$, para o erro 1, e risco $\beta \leq 20\%$, para o erro 2.

Randomização

Os pacientes foram recrutados com base nos critérios de inclusão clínica e alocados aos grupos de acordo com seu perfil de saúde e condição, para poder participar de um programa de treinamento esportivo. Todas essas etapas foram desenvolvidas por um médico e a randomização é mostrada no Diagrama1.

Neste estudo, avaliamos os efeitos da dieta e do treinamento recreativo na melhoria da capacidade funcional em amostras do músculo esquelético do vasto lateral de 39 voluntários que concordaram em participar desse procedimento. Este estudo foi um braço de um protocolo de tratamento abrangente que investigou as modulações hormonais, metabólicas e imunológicas de 60 pacientes com diabetes tipo 2 submetidos a um programa de intervenção nutricional isolado e associado ao treinamento esportivo recreativo (SOUSA et al, 2019, 2017, 2014).

Os 39 voluntários participaram de um programa intensivo de intervenção nutricional e foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Dieta (D), Dieta + Futebol (DF) e Dieta + Corrida (DC). No grupo da dieta, os participantes não aderiram ao programa de treinamento físico.

Diagrama 1

Diagrama 2

Diagrama de Fluxo CONSORT ilustrando a triagem do paciente, a alocação do tratamento e o acompanhamento. D: Dieta, DF: Dieta + Futebol, DC: Dieta + Corrida. Conforme Moher et al., 2010.

--> Participantes que consentiram participar das alterações funcionais do músculo esquelético.

9. REFERÊNCIAS

- Alvim RO, Cheuhen MR, Machado SR, Sousa AGP, Santos PCJL. General aspects of muscle glucose uptake. *An Acad Bras Cienc.* 2015; 87(1): 351–368.
- Bangsbo J, Nielsen JJ, Mohr M, Randers MB, Krstrup BR, Brito J, Krstrup P. Performance enhancements and muscular adaptations of a 16-week recreational football intervention for untrained women. *Scand J Med Sci Sports.* 2010; 20 Suppl 1:24-30.
- Bassil MS, Gougeon R. Muscle protein anabolism in type 2 diabetes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2013;16(1):83-88.
- Bauer J, Biolo G, Cederholm T, Cesari M, Cruz-Jentoft AJ, Morley JE et al. Evidence-Based Recommendations for Optimal Dietary Protein Intake in Older People: A Position Paper From the PROT-AGE Study Group. *J Am Med Dir Assoc.* 2013;14(8):542-59
- Borgenvik M, Apró W, Blomstrand E. Intake of branched-chain amino acids influences the levels of MAFbx Mrna and MuRF-1 total protein in resting and exercising human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 302(5): E510–E52.
- Bowen TS, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.* 2015; 6(3): 197–207.
- Brooks NE, Cadena SM, Vannier E, Cloutier G, Carambula S, Myburgh KH, Roubenoff R, Castaneda C. Effects of resistance exercise combined with essential amino acid supplementation and energy deficit on markers of skeletal muscle atrophy and regeneration during bed rest and active recovery. *Muscle Nerve.* 2010; 42(6):927-35.

Busquets S, Figueras M, Almendro V, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Interleukin-15 increases glucose uptake in skeletal muscle. An antidiabetogenic effect of the cytokine. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760(11): 1613–1617.

Campins L, Camps M, Riera A, Pleguezuelos E, Yebenes JC, Serra-Prat M. Oral Drugs Related with Muscle Wasting and Sarcopenia. A Review. *Pharmacology*. 2017; 99(1-2), 1–8.

Cleasby ME, Jamieson P M, Atherton P J. Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities. *J of Endocr*. 2016; 229(2):67-81.

Colberg SR, Sigal RJ, Yardley JE, Riddell MC, Dunstan DW, Dempsey PC, Horton ES, Castorino K, Tate DF. Physical Activity/Exercise and Diabetes: A Position Statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2016; 39(11):2065- 2079.

Daly RM, O'Connell S, Mundell NM, Grimes CA, Dunstan DW, Nowson CA. Protein-enriched Diet, With the Use of Lean Red Meat, Combined With Progressive Resistance Training Enhances Lean Tissue Mass and Muscle Strength and Reduces Circulating IL-6 Concentrations in Elderly Women: A Cluster Randomized Controlled Trial. *Am J Clin Nutr*, 2014; 99 (4): 899-910.

Dietrichson P, Coakley J, Smith PE, Griffiths RD, Helliwell TR, Edwards RH. Conchotome and needle percutaneous biopsy of skeletal muscle. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1987; 50(11): 1461–1467.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2012-2013/Sociedade Brasileira de Diabetes ; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2012.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020/ Sociedade Brasileira de Diabetes ; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2019.

Di Stasi SL, MacLeod TD, Winters JD, Binder-Macleod SA. Effects of Statins on Skeletal Muscle: A Perspective for Physical Therapists. *Phys Ther.* 2010; 90(10): 1530–1542.

Duan Y, Li F, Wang W, Guo Q, Wen C, Li Y, Yin Y Interleukin-15 in obesity and metabolic dysfunction: current understanding and future perspectives. *Obes Rev.* 2017; 18(10):1147-1158.

Egan B, Zierath JR. Exercise Metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism.* 2013; 17(2): 162-184.

Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014;49(1):59-68.

Evert AB, Dennison M, Gardner CD, Garvey WT, Lau KHK, Macleod J, Mitri J. Nutrition Therapy for Adults With Diabetes or Prediabetes: A Consensus Report. *Diabetes Care.* 2019; 42(5):731–754.

Freire PP, Fernandez GJ, Cury SS, de Moraes D, Oliveira JS, de Oliveira, G, Carvalho RF. The Pathway to Cancer Cachexia: MicroRNA-Regulated Networks in Muscle Wasting Based on Integrative Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1962.

Furmanczyk PS, Quinn LS. Interleukin-15 increases myosin accretion in human skeletal myogenic cultures. *Cell Biol Int.* 2003;27(10):845-851.

Gielen S, Sandri M, Kozarez I, Kratzsch J, Teupser D, Thiery J, Erbs S, Mangner N, Lenk K, Hambrecht R, Schuler G, Adams V. Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized

Leipzig Exercise Intervention in Chronic Heart Failure and Aging catabolism study. *Circulation*. 2012; 125(22): 2716-27.

Gualano B, De Salles PV, Roschel H, Artioli GG, Neves MJr, de Sá Pinto AL, da Silva ME, Cunha MR, Otaduy MC, Leite Cda C, Ferreira JC, Pereira RM, Brum PC, Bonfá E, Lancha AHJ. Creatine in type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(5):770-778.

Gumucio JP, Mendias CL. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. *Endocrine*. 2013;43(1):12-21.

Guo B, Zhang ZK, Liang C. Molecular communication from skeletal muscle to bone: a review for muscle-derived myokines regulating bone metabolism. *Calcif Tissue Int*. 2017;100(2):184-192.

Gurd BJ, Yoshida Y, McFarlan JT, Holloway GP, Moyes CD, Heigenhauser GJ, Spriet L, Bonen A. Nuclear SIRT1 activity, but not protein content, regulates mitochondrial biogenesis in rat and human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;301(1):R67-R75.

Hall M, Castelein B, Wittoek R, Calders P, Van Ginckel A. Diet-induced weight loss alone or combined with exercise in overweight or obese people with knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2019; 48 (5): 765-777.

Heiston EM & Malin SK Impact of Exercise on Inflammatory Mediators of Metabolic and Vascular Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1134:271-294.

Höllriegel R, Beck EB, Linke A, Adams V, Möbius-Winkler S, Mangner N, Sandri M, Gielen S, Gutberlet M, Hambrecht R, Schuler G, Erbs S. Anabolic effects of exercise training in patients with advanced chronic heart failure

(NYHA IIIb): impact on ubiquitin-protein ligases expression and skeletal muscle size. *Int J Cardiol.* 2013; 167(3): 975-80.

Hood DA, Tryon LD, Carter HN, Kim Y, Chen CC. Unravelling the mechanisms regulating muscle mitochondrial biogenesis. *Biochem J.* 2016;473(15):2295-2314.

Hulmi JJ, Kovanen V, Selänne H, Kraemer WJ, Häkkinen K, Mero AA. Acute and long-term effects of resistance exercise with or without protein ingestion on muscle hypertrophy and gene expression. *Amino Acids.* 2009; 37(2): 297-308.

International Diabetes Federation (IDF) 2017 [citado 05 maio 2020]. Disponível em: <https://www.idf.org/our-activities/epidemiology-research.html>.

Johnson MA, Polgar Weightman JD. Data on the distribution of fiber types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J Neurol Sci.* 1973;18(1):111-129.

Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays. Biochem.* 2010; 26 (8): 1255-1260.

Kapilevich L V, Anastasia A N, Kabachkova M. Dynamic and static exercises differentially affect plasma cytokine content in elite endurance- and strength-trained athletes and untrained volunteers. *Front Physiol.* 2017; 8: 35.

Kim TN, Park MS, Yang SJ, Yoo HJ, Kang HJ, Song W, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Prevalence and Determinant Factors of Sarcopenia in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2013; 33(7):1497–1499.

Krause MP, Riddell MC, Hawke TJ. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatric Diabetes* 2011; 12(4): 345–364.

Krolopp J E, Thornton S M, Abbott M J. IL-15 activates the Jak3/STAT3 signaling pathway to mediate glucose uptake in skeletal muscle cells. *Front Physiol* 2016; 7: 626.

Krustrup P, Hansen PR, Andersen LJ, Jakobsen MD, Sundstrup E, Randers MB, Christiansen L, Helge EW, Pedersen MT, Søgaard P, Dvorak AJ, Aagaard P, Bangsbo J. Long-term musculoskeletal and cardiac health effects of recreational football and running for premenopausal women. *Scand J Med Sci Sports* 2010; 20 (1): 58–71.

Krustrup P, Helge EW, Hansen PR, Aagaard P, Hagman M, Randers MB, de Sousa M, Mohr M. Effects of recreational football on women's fitness and health adaptations and mechanisms. *Eur J Appl Physiol*. 2018;118(1):11-32.

Krustrup P, Nielsen JJ, Krustrup BR, Christensen JF, Pedersen H, Randers MB, Bangsbo J. Recreational soccer is an effective health-promoting activity for untrained men. *Br J Sports Med*. 2009;43(11):825-831.

Krustrup, P., Dvorak, J., Junge, A., & Bangsbo, J. Executive summary: The health and fitness benefits of regular participation in small-sided football games. *Scand J Med Sci Sports*. 2010;20 Suppl 1:132-135.

Lang T, Streeper T, Cawthon P, Baldwin K, Taaffe DR, Harris TB. Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. *Osteoporos Int*. 2010; 21(4): 543–559.

Leal LG, Lopes MA, Batista ML. Physical Exercise-Induced Myokines and Muscle-Adipose Tissue Crosstalk: A Review of Current Knowledge and the Implications for Health and Metabolic Diseases. *Front Physiol.* 2018;9:1307.

Li J. miR-29b contributes to multiple types of muscle atrophy. *Nat Commun.* 2017;8:15201.

Lim NJ, Shin JH, Kim HJ, Lim Y, Kim JY, Lee WJ, Han SJ, Kwon O. A combination of Korean mistletoe extract and resistance exercise retarded the decline in muscle mass and strength in the elderly: A randomized controlled trial. *Exp Gerontol.* 2017; 87(Pt A):48-56.

Little JP, Safdar A, Wilkin GP, Tamopolsky MA, Gibala MJ. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J Physiol.* 2010; 588(6):1011-22.

Long DE, Peck BD, Martz JL, Tuggle SC, Bush H M, McGwin G, Peterson CA. Metformin to Augment Strength Training Effective Response in Seniors (MASTERS): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2017; 18(1): 192.

Longo M, Zatterate F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, Beguinot F, Mielelnt C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *J Mol Sci.* 2019; 20(9): 2358.

Lukács A, Horváth E, Máté Z, Szabó A, Virág K, Papp M, Sándor J, Ádány R, Paulik E. Abdominal obesity increases metabolic risk factors in non-obese adults: a Hungarian cross-sectional study. *BMC Public Health.* 2019; 19(1):1533.

Makizako H. Age-dependent changes in physical performance and body composition in community-dwelling Japanese older adults. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*.2017 [acesso 08 Out. 2018]. Disponível em: www.wileyonlinelibrary.com.

Marzetti E, Carter CS, Wohlgemuth SE. Changes in IL-15 expression and death-receptor apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle with aging and life-long calorie restriction. *Mech Ageing Dev*. 2009; 130(4): 272–280.

Meex RCR, Schrauwen-Hinderling VB, Moonen-Kornips E, Schaart G, Mensink M, Phielix E, van de Weijer T, Sels JP, Schrauwen P, Matthijs K.C. Hesselink. Restoration of Muscle Mitochondrial Function and Metabolic Flexibility in Type 2 Diabetes by Exercise Training Is Paralleled by Increased Myocellular Fat Storage and Improved Insulin Sensitivity. *Diabetes*. 2010;59(3):572-579.

Mendes R, Sousa N, Themudo-Barata JL, Reis VM. High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training in Middle-Aged and Older Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Crossover Trial of the Acute Effects of Treadmill Walking on Glycemic Control. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(21):4163.

Miki A, Hashimoto Y, Matsumoto S, Ushigome E, Fukuda T, Sennmaru T et al. Especially Vegetable Protein Intake, Is Associated with Higher Skeletal Muscle Mass in Elderly Patients with Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res*. 2017;2017:7985728.

Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gotzsche PC, Devereaux PJ, Altman DG. CONSORT 2010 Explanation and Elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ*. 2010;340:c869.

Mori H, Tokuda Y. Effect of whey protein supplementation after resistance exercise on muscle mass and physical function of healthy elderly women: A randomized controlled trial. *Geriatr Gerontol Int*. 2018;18(9):1398-1404.

Niemnan D. C., Davis J. M., Henson D. A., Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. *J Appl Physiol (1985)*. 2003;94(5):1917-1925.

Perkin OJ, McGuigan PM, Thompson D, Stokes KA. Habitual physical activity levels do not predict leg strength and power in healthy, active older adults. *PLoS One*. 2018;13(7):e0200089.

Pinheiro DCM, Erbereli BT, Benato DG. Electrical stimulation delays reinnervation in denervated rat muscle. 2017 Muscle Nerve.. 2017; 56(6): E108-E118.

Pugh J K, Faulkner S H, Jackson A P, King J A . Acute molecular responses to concurrent resistance and high-intensity interval exercise in untrained skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2015;3(4):e12364.

Quinn LS, Anderson BG, Drivdahl RH, Alvarez B, Argiles JM. Overexpression of interleukin-15 induces skeletal muscle hypertrophy in vitro: implications for treatment of muscle wasting disorders. *Exp Cell Res*. 2002;280(1):55-63.

Richter EA and Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. 2013;93(3):993-1017.

Rinnov A, Yfanti C, Nielsen S. Endurance training enhances skeletal muscle interleukin-15 in human male subjects. *Endocrine*. 2014;45(2):271-278.

Rovaris DR, Grohe R, Santos B, Perassolo MS, Andrade FM. Metformin and type 2 diabetes mellitus: past, present and pharmacogenetics. *Rev HCPA*. 2010; 30(4): 382-390.

Sabaratnam R, Andreas JT, Pedersen JM, Kristensen A H, Jørgen FP, Wojtaszewski KH. Intact regulation of muscle expression and circulating levels of myokines in response to exercise in patients with type 2 diabetes *Physiol Rep*. 2018; 6 (12): e13723.

Salanova M, Schiffl G, Püttmann B, Schoser BG, Blottner D. Molecular biomarkers monitoring human skeletal muscle fibres and microvasculature following long-term bed rest with and without countermeasures. *J Anat*. 2008; 212(3):306-18.

Sánchez RJ, Vásquez NA. IL-15 that a regulator of TNF- α in patients with diabetes mellitus type 2. *Med Hypotheses*. 2013;80(6):776-777.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3(6):1101-1108.

Shaarani SR, O'Hare C, Quinn A, Moyna N, Moran R, O'Byrne JM. Effect of prehabilitation on the outcome of anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*. 2013; 41(9):2117-27.

Skelly LE Effect of sex on the acute skeletal muscle response to sprint interval exercise. *Exp Physiol*. 2017;102(3):354-365.

Sousa MV, Fukui R, Krstrup P, Dagogo-Jack S, Rossi da Silva ME. Combination of Recreational Soccer and Caloric Restricted Diet Reduces Markers of Protein Catabolism and Cardiovascular Risk in Patients with Type 2 Diabetes. *J Nutr Health Aging*. 2017;21(2):180-186.

Sousa MV, Fukui R, Krstrup P, Pereira RMR, Silva PRS, Rodrigues AC. Positive effects of football on fitness, lipid profile, and insulin resistance in Brazilian patients with type 2 diabetes. *Scand J Med Sci Sports*. 2014; 24 (Suppl. 1): 57–65.

Sousa MV, Soares DBS, Caraca ER, Cardoso R. Dietary protein and exercise for preservation of lean mass and perspectives on type 2 diabetes prevention. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(12):992-1004.

Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. *Adv Physiol Educ*. 2014;38(4):308-314.

Stilling F, Wallenius S, Michaelsson K. High insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) is associated with low relative muscle mass in older women. *Metabolism*. 2017;73:36-42.

Świdarska E, Strycharz J, Wróblewski A, Szemraj J, Drzewoski J, Śliwińska A. A Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. *Glucose Transport* 2018. IntechOpen

Taguchi T, Kishikawa H, Motoshima H, Sakai K, Nishiyama T, Yoshizato, K. Involvement of bradykinin in acute exercise-induced increase of glucose uptake and GLUT-4 translocation in skeletal muscle: Studies in normal and diabetic humans and rats. *Metabolism*. 2000; 49(7): 920–930.

Tarantino U, Piccirilli E, Fantini M. Sarcopenia and fragility fractures: molecular and clinical evidence of the bone-muscle interaction. *J Bone Joint Surg Am*. 2015;97(5):429-437.

Teng S and Huang P. The effect of type 2 diabetes mellitus and obesity on muscle progenitor cell function. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):103.

Trappe TA, Standley RA, Jemiolo B, Carroll CC, Trappe SW. Prostaglandin and myokine involvement in the cyclooxygenase-inhibiting drug enhancement of skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013; 304(3):R198-205.

Umegaki, H. Sarcopenia and frailty in older patients with diabetes mellitus. *Geriatr Gerontol Int.* 2016;16(3):293-299

Wang J, Yang LZ, Zhang JS, Gong JX, Wang YH, Zhang CL, Fang XT. Effects of microRNAs on skeletal muscle development. *Gene.* 2018;668:107-113.

Watson EL, Kosmadakis GC, Smith AC, Viana JL, Brown JR, Molyneux K, Pawluczyk IZ, Mulheran M, Bishop NC, Shirreffs S, Maughan RJ, Owen PJ, John SG, McIntyre CW, Feehally J, Bevington A. Combined walking exercise and alkali therapy in patients with CKD4-5 regulates intramuscular free amino acid pools and ubiquitin E3 ligase expression. *Eur J Appl Physiol.* 2013; 113(8):2111-24.

Wohlgemuth SE, Lees HA, Marzetti E, Manini TM, Aranda JM, Daniels MJ, Pahor M, Perri MG, Leeuwenburgh C, Anton SD. An exploratory analysis of the effects of a weight loss plus exercise program on cellular quality control mechanisms in older overweight women. *Rejuvenation Res.* 2011; 14(3):315-24.

World Health Organization (WHO) 2018 [citado 05 maio 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.

Yargic MP, Torgutalp S, Akin S, Babayeva N, Torgutalp M, Demirel AH *Acute long-distance trail running increases serum IL-6, IL-15, and Hsp72 levels. Appl Physiol Nutr Metab.* 2019;44(6):627-631.

Ye J. Beneficial metabolic activities of inflammatory cytokine interleukin15 in obesity and type 2 diabetes. *Front Med* 2015; 9(2): 139–145.

Zhang S, Chen N. Regulatory role of microRNAs in muscle atrophy during exercise intervention. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (2): 405.

Zhu S, Nagashima M, Khan MAS. Lack of caspase-3 attenuates immobilization-induced muscle atrophy and loss of tension generation along with mitigation of apoptosis and inflammation. *Muscle Nerve.* 2013; 47(5): 711–721.

APÊNDICE 1

Programa de Pós-Graduação de Endocrinologia

Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – PAM – 8º
andar bloco 03 I Clínica Médica São Paulo – SP – Brasil
e-mail:cpgendoc.ichc@hc.fm.usp.br – Fone: 11 -2661-7694

Carta de Declaração do Termo Livre e Esclarecido

Venho informar que esse estudo de mestrado da aluna Diana Bento da Silva Soares é um braço do projeto "Futebol e saúde: impacto da nutrição e da prática de futebol em pacientes com diabetes tipo 2" que recebeu aprovação na data 03/10/2012 por este Comitê (CAPPEsq – Parecer Nº 127.26).

Todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de serem submetidos aos procedimentos do estudo. A parte experimental já foi concluída e neste estudo serão analisadas as amostras de tecido muscular desses participantes por meio das técnicas de Western Blott e PCR- array.

Dra. Maysa de Sousa Vieira
Pesquisadora principal do projeto

Dra. Maysa Vieira de Sousa
Nutricionista
CRM-5 12290

APÊNDICE 2

Tabela 1. Correlação entre medidas antropométricas e os genes Atrogina-1, MuRF-1, IL-15 nos grupos Dieta, Dieta+Futebol e Dieta+Corrida

	Dieta (D) (n=13)	Dieta+ futebol (DF) (n=13)	Dieta+ corrida (DC) (n=13)	Atrogina-1			MuRF-1			IL-15		
				r	r	r	r	r	r	r	r	r
				p	p	p	p	p	p	p	p	p
				(D)	(DF)	(DC)	(D)	(DF)	(DC)	(D)	(DF)	(DC)
Peso total (kg)												
pré	85,5 ± 3,9	91,3 ± 3,5	86,2 ± 4,6	-0,041	0,003	-0,547	-0,233	-0,146	-0,302	0,034	-0,433	-0,018
pós	81,3 ± 3,4	87,8 ± 3,1	80,9 ± 3,9	0,894	0,990	0,052	0,443	0,634	0,315	0,912	0,138	0,951
IMC (kg/m²)												
pré	33,3 ± 1,2	33,1 ± 1,0	33,8 ± 1,1	0,611	0,236	-0,158	-0,004	-0,273	0,033	0,033	-0,531	-0,383
pós	31,4 ±1,1	31,4 ± 0,8	31,2 ±0,9	0,013*	0,436	0,069	0,988	0,366	0,302	0,914	0,06	0,195
Circunferência cintura (cm)												
pré	106,5±2,3	109,0 ±3,1	106,9 ±2,7	-0,062	0,534	-0,318	-0,232	-0,013	0,266	0,266	0,025	-0,288
pós	101,2±2,0	104,0±2,6	99,4±2,6	0,847	0,059	0,289	0,443	0,966	0,264	0,378	0,935	0,339

Continua

Conclusão: Tabela 1. Correlação entre medidas antropométricas e os genes Atrogina-1, MuRF-1, IL-15 nos grupos Dieta, Dieta+Futebol e Dieta+Corrida

				Atrogina-1			MuRF-1			IL-15		
	Dieta	Dieta+	Dieta+	r	r	r	r	r	r	r	r	r
	(D)	futebol	corrida	p	p	p	p	p	p	p	p	p
	(n=13)	(DF)	(DC)	(D)	(DF)	(DC)	(D)	(DF)	(DC)	(D)	(DF)	(DC)
		(n=13)	(n=13)									
Gordura corporal (kg)												
pré	31,0 ± 2,3	31,7 ± 2,7	29,6 ± 2,0	0,138	-0,000	-0,547	0,008	-0,126	-0,334	0,021	-0,367	-0,160
pós	28,0 ±2.0	28,1 ± 2,2	25,3 ±1,6	0,652	0,999	0,053	0,978	0,680	0,264	0,945	0,217	0,601
Gordura corporal (%)												
pré	36,2±2,02	34,3 ±1,66	34,4 ±1,66	0,492	-0,003	-0,371	0,310	-0,125	-0,170	-0,347	-0,277	-0,052
pós	34,3 ±1,9	31,8±2,06*	31,5±1,66	0,103	0,991	0,211	0,302	0,681	0,577	0,244	0,359	0,864
Massa magra (kg)												
pré	52,2 ± 2,8	57,2 ± 3,0	54,4 ± 3,2	-0,237	0,007	-0,029	0,397	-0,075	-0,097	0,072	-0,240	-0,358
pós	51,0 ± 2,5	57,2 ± 2,3	53,3 ± 2,3	0,434	0,979	0,924	0,178	0,805	0,750	0,813	0,429	0,229

*p<0,05

Tabela 2. Correlação entre exames bioquímicos e os genes Atrogina-1, MuRF-1, IL-15 nos grupos Dieta, Dieta+Futebol e Dieta+Corrida.

	Deita (D) (n=13)	Dieta+futebol (DF) (n=13)	Dieta+corrida (DC) (n=13)	Atrogina-1				MuRF-1			IL-15		
				r	r	r	r	r	r	r	r	r	
				p (D)	p (DF)	p (DC)	p (D)	p (DF)	p (DC)	p (D)	p (DF)	p (DC)	
Glicose (mg/dl)													
pré	172,0 ± 9,9	167,5±13,0	161,0 ±11,0	0,462	0,506	0,154	0,304	-0,250	0,117	0,276	-0,429	0,305	
pós	140,7 ± 4,3*	135,2 ±7,5*	133,0 ±6,5*	0,111	0,070	0,612	0,309	0,405	0,703	0,357	0,143	0,309	
HbA1c (%)													
pré	7,6 ± 0,3	7,4 ± 0,4	7,2 ± 0,3	0,541	0,467	0,007	0,274	-0,251	0,115	0,343	-0,426	0,308	
pós	6,5 ± 0,1*	6,3 ± 0,2*	6,2 ± 0,2*	0,058	0,108	0,979	0,363	0,403	0,708	0,250	0,147	0,699	
Insulina (microU/mL)													
pré	27,7 ± 5,0	17,6 ± 1,3	22,7 ± 3,1	-0,291	0,005	0,066	-0,274	0,598	-0,439	0,362	0,831	0,481	
pós	23,1 ± 3,6	16,1 ± 1,9	17,5 ± 2,3*	0,334	0,984	0,830	0,363	0,003*	0,135	0,224	0,004*	0,095	

Continua

Continuação: Tabela 2. Correlação entre exames bioquímicos e os genes Atrogina-1, MuRF-1, IL-15 nos grupos Dieta, Dieta+Futebol e Dieta+Corrida.

				Atrogina-1				MuRF-1			IL-15	
	Deita	Dieta+futebol	Dieta+corrida	r	r	r	r	r	r	r	r	r
	(D)	(DF)	(DC)	p	p	p	p	p	p	p	p	p
	(n=13)	(n=13)	(n=13)	(D)	(DF)	(DC)	(D)	(DF)	(DC)	(D)	(DF)	(DC)
IGF-1 (ng/mL)												
pré												
pós	144,4 ± 14,5	141,7±17,6	159,4 ± 13,2	0,458	0,121	0,343	0,442	-0,354	0,433	-0,005	-0,069	-0,174
	175,0±15,5*	149,3±15,6	188,3 ± 14,3*	0,117	0,692	0,249	0,132	0,235	0,138	0,992	0,821	0,568
Triglicérides (mg/dl)												
pré	150,3 ± 23,0	140 ±10,1	194,2 ± 21,3	0,154	0,427	-0,031	0,032	-0,270	0,024	-0,225	0,384	0,132
pós	164,6 ± 20,8	117,1±13,9*	128,7 ± 11*‡	0,613	0,145	0,919	0,920	0,371	0,935	0,457	0,195	0,666
Colesterol total (mg/dl)												
pré	181,7 ± 13,3	179,6 ± 9,0	211,4 ± 10,8	0,071	0,141	0,164	-0,008	-0,196	-0,181	-0,371	-0,043	0,351
pós	203,0 ± 14,6	163,3±9,5* ‡	188,4 ± 9,6* ‡	0,816	0,645	0,591	0,981	0,520	0,553	0,209	0,888	0,239
VLDL-c (mg/dl)												
pré	29,0 ± 3,8	27,9 ± 2,0	38,8 ± 4,2	0,118	0,417	-0,032	0,047	-0,288	-0,022	-0,002	-0,412	0,146
pós	32,9 ± 4,1	23,4±2,8* ‡	25,6 ± 2,1* & ‡	0,550	0,155	0,917	0,339	0,878	0,942	0,993	0,161	0,633

Continua

Conclusão: Tabela 2. Correlação entre exames bioquímicos e os genes Atrogina-1, MuRF-1, IL-15 nos grupos Dieta, Dieta+Futebol e Dieta+Corrida.

	Deita (D) (n=13)	Dieta+futebol (DF) (n=13)	Dieta+corrida (DC) (n=13)	Atrogina-1				MuRF-1			IL-15		
				r	r	r	r	r	r	r	r	r	
				p (D)	p (DF)	p (DC)	p (D)	p (DF)	p (DC)	p (D)	p (DF)	p (DC)	
LDL-c (mg/dl)													
pré	106,7 ± 12,7	110,6 ± 9,8	128,7 ± 9,0	0,137	0,126	-0,098	0,120	-0,092	-0,295	0,450	0,142	-0,601	
pós	125,8 ± 12,2	96,8 ± 8,3 [‡]	117,3 ± 9,0 [‡]	0,656	0,681	0,750	0,696	0,764	0,327	0,124	0,641	0,029*	
HDL-c (mg/dl)													
pré	46,3 ± 2,4	41,0 ± 2,4	45,3 ± 3,7	-0,168	-0,299	0,358	-0,180	-0,172	0,269	0,183	-0,314	-0,045	
pós	44,2 ± 1,8	43,0 ± 3,3	45,4 ± 3,5	0,582	0,321	0,228	0,555	0,572	0,374	0,549	0,294	0,881	
TNF-α (pg/mL)													
pré	2,2 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,1	-0,333	0,248	0,165	-0,078	0,129	-0,119	-0,542	0,311	-0,151	
pós	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,1 ± 0,1	0,266	0,413	0,589	0,799	0,674	0,698	0,055	0,301	0,622	
IL-6 (pg/mL)													
pré	4,3 ± 0,9	3,1 ± 0,4	2,9 ± 0,3	0,076	0,565	0,232	0,379	-0,109	0,457	-0,241	0,120	0,508	
pós	2,7 ± 0,4*	4,7 ± 1,3 [‡]	2,4 ± 0,3	0,806	0,040*	0,445	0,202	0,723	0,116	0,425	0,696	0,076	

*p<0,05

Tabela 3. Correlação entre o consumo alimentar e os genes atrogina-1, MuRF-1, IL-15 grupos Dieta, Dieta+Futebol e Dieta+Corrida.

	Atrogina-1			MuRF-1			IL-15		
	r	r	r	r	r	r	r	r	r
	p	p	p	p	p	p	p	p	p
	(D)	(DF)	(DC)	(D)	(DF)	(DC)	(D)	(DF)	(DC)
Proteína (g)	0,265	0,497	-0,630	-0,118	0,397	-0,566	0,063	0,031	-0,020
	0,404	0,083	0,020*	0,741	0,178	0,043*	0,838	0,918	0,946
Carboidrato (g)	0,302	0,202	0,170	0,340	-0,452	0,310	0,340	-0,286	0,365
	0,339	0,507	0,577	0,254	0,120	0,301	0,254	0,342	0,219
Lipídios (g)	0,118	0,357	-0,585	-0,127	-0,083	-0,599	0,414	-0,201	0,203
	0,713	0,230	0,035*	0,677	0,786	0,030*	0,158	0,510	0,504
Caloria (kcal)	0,025	0,250	-0,457	-0,146	-0,068	-0,420	0,216	-0,036	0,172
	0,935	0,409	0,115	0,632	0,823	0,152	0,476	0,906	0,574

*p<0,05

APÊNDICE 3

Tabela 1. Pesquisa bibliográfica de ensaios clínicos com descritores atrogina-1, FBXO32, MAFBX, exercício.

Treinamento	Referência	População	Número de participantes (N)/ média de idade (anos)	Intervenção	Resultados Atrogina-1
Crônico	Gielen et al., 2012	Pacientes com insuficiência cardíaca crônica(ICC) e controles saudáveis	<i>Pacientes ICC exercício:</i> N= 30 (n= 15; média de idade= 46 / n= 15; média de idade = 72) <i>Pacientes ICC sem exercício:</i> N= 30 (n= 15; média de idade = 46 / n= 15; média de idade= 72) <i>Saudáveis com exercício:</i> N= 30 (n= 15; média idade= 50 / n=15; média idade= 72) <i>Saudáveis sem exercício:</i> N= 30 (n= 15; média idade= 50 / n=15; média idade= 72)	Protocolo de exercício: 20 min treinamento aeróbio cicloergômetro, 4x/semana durante 4 semanas vs. Controle: grupo inativo recebeu atendimento clínico habitual de seus médicos	Após treinamento: Pacientes ICC: ↔MAFbx proteína ↔MAFbx mRNA Controle saudáveis: ↔MAFbx proteína ↔MAFbx mRNA
Crônico	Wohlgemuth et al., 2011	Mulheres sedentárias com sobrepeso - IMC >29kg/m ²	N= 13; média idade= 66 Grupo exercício: n= 6; Grupo controle: n=7	Grupo exercício (programa de perda de peso: redução de 500 - 1.000kcal / dia na ingestão de energia, associado a 150 min /semana de treino aeróbio + treinamento resistido 45 min / semana) por 6 meses vs. O grupo controle mantém seus padrões usuais de alimentação e atividade física	Grupo exercício: ↔ MAFbx mRNA Grupo controle: ↔ MAFbx mRNA

Continua

Continuação: Tabela 1. Pesquisa bibliográfica de ensaios clínicos com descritores atrogina-1, FBXO32, MAFBX, exercício.

Treinamento	Referência	População	Número de participantes (N)/ média de idade (anos)	Intervenção	Resultados Atrogina-1
Crônico	Höllerriegel et al., 2013	Pacientes homens com insuficiência cardíaca crônica severa	N=34/ média idade=60 Grupo exercício: n= 17 Grupo controle: n=17	Protocolo de exercícios: Primeiras 3 semanas, 3 a 6x/dia por 5 a 20 minutos em bicicleta ergométrica, 20 a 30 minutos / dia 7x/semana por 9 semanas. vs. O grupo controle mantém seus padrões usuais de alimentação e atividade física	Grupo exercício: ↔Atrogina-1 proteína ↔Atrogina-1 mRNA Grupo controle: ↔Atrogina-1 proteína ↔Atrogina-1 mRNA
Crônico	Lim et al., 2017	Idosos saudáveis	N=54 Média idade=63a Grupo Placebo: n=18 Grupo de dose baixa KME* (1g/d): n= 18 Grupo de dose alta KME (2g/d): n=18	Protocolo de exercício :. treinamento de aeróbio 3x / semana por 12 semanas KME: extrato de erva coreano	Grupo de dose alta KME: ↓Atrogina-1 mRNA Grupos de dose baixa KME: ↓Atrogina-1 mRNA Grupo placebo: ↔ Atrogina-1 mRNA

Continua

Continuação: Tabela 1. Pesquisa bibliográfica de ensaios clínicos com descritores atrogin-1, FBXO32, MAFBX, exercício.

Treinamento	Referência	População	Número de participantes (N)/ média de idade (anos)	Intervenção	Resultados Atrogina-1
Crônico	Brooks et al., 2010	Homens saudáveis	N=31 Idade=31-55 Grupo AA* : n=7 Grupo RT*: n=12 Grupo AART*: n=12	Protocolo de exercício: Todos os participantes foram submetidos ao repouso no leito em decúbito dorsal por 28 dias. Os exercícios aeróbios foram realizados na posição horizontal 1 hora/dia, 6x/semana, durante 28 dias e recuperação ativa (14 dias), 15 a 30 minutos de exercício em esteira na Frequência cardíaca máxima de 60–85% Grupo AA: suplementação aminoácidos essenciais; Grupo TR: treinamento aeróbio com suplementação de AA fornecida 3 horas após o exercício; Grupo AATR: treinamento aeróbio com suplementação de AA fornecido 5 minutos antes do exercício	28 dias: Grupo AA: ↓ MAFbx mRNA Grupo RT: ↓ MAFbx mRNA Grupo AART: ↔ MAFbx mRNA 14 dias de recuperação: Grupos AA, RT, AART: ↔ MAFbx mRNA

Continua

Continuação: Tabela 1. Pesquisa bibliográfica de ensaios clínicos com descritores atrogin-1, FBXO32, MAFBX, exercício.

Treinamento	Referência	População	Número de participantes (N)/ média de idade (anos)	Intervenção	Resultados Atrogina-1
Crônico	Hulmi et al., 2009	Homens jovens saudáveis	N=31/ média idade=26 Grupos Whey protein: n=11 Grupo placebo: n= 10 Grupo controle: n= 10	Protocolo de Exercício: Durante o período de 21 semanas de treinamento resistido, foram realizados dois exercícios de leg press com repetição de peso corporal total 2x/semana. Foi necessário um mínimo de 2 dias de descanso entre as duas sessões por semana. O número de séries de cada exercício durante o treino aumentou (de 2–3 para 3–5) e o número de repetições em cada série diminuiu (15–20 para 5–6) durante o período de 21 semanas. Grupo whey protein: treinaram e consumiram 15g whey protein isolado Grupo placebo: treinaram e consumiram bebida colorida Grupo controle: sem TR, mas continuaram sua atividade habitual, como corrida, natação ou jogos de bola	1h, 48h, 21 semanas: Grupo Whey protein: ↔ MAFbx mRNA Grupo placebo: ↔ MAFbx mRNA Grupo controle: ↔ MAFbx mRNA

Continua

Conclusão: Tabela 1. Pesquisa bibliográfica de ensaios clínicos com descritores atrogina-1, FBXO32, MAFBX, exercício.

Treinamento	Referência	População	Número de participantes (N)/ média de idade (anos)	Intervenção	Resultados Atrogina-1
Crônico	Shaarani et al., 2013	Pacientes com ruptura do ligamento cruzado anterior	N= 14; idade= 18-45 Grupo Exercício n= 7; Grupo Controle n= 7	Protocolo de exercício: 4x/ semana, 2 sessões de musculação supervisionadas, intercaladas com 2 sessões em casa durante 6 semanas no período pré-operatório, e no pós-operatório uma sessão de fisioterapia padrão foi realizado, melhorando a simetria e o padrão da marcha. Controle: Os indivíduos mantiveram seu exercício ou qualquer atividade normal da vida diária antes da reconstrução do ligamento cruzado anterior. A biópsia foi realizada 6 semanas no pré-operatório (basal), pré-operatório e 6 semanas no pós-operatório nos dois grupos.	Grupos exercício e grupos controle: 6 semanas pré-operatório: ↔ atrogina-1 mRNA Pré-operatório: ↔ atrogina-1 mRNA 12 semanas pós-operatório: ↔ atrogina-1 mRNA
Crônico	Trappe et al., 2012	Adultos	N=36/ media idade= 64 Grupos: Acetaminofeno (4,0 g/dia): N=11 Ibuprofeno (1,2 g/dia): N=13 Placebo: N=12	Protocolo de exercício: 3x/ semana, durante 12 semanas, treinamento progressivo com exercícios aeróbios	Grupos acetaminofeno e ibuprofeno: ↔ atrogina-1 mRNA Group placebo: ↔ atrogina-1 mRNA

*KME: extrato de erva coreano, AA: aminoácido essencial.

Tabela 2. Pesquisa bibliográfica de ensaios clínicos com descritores Murf-1, RNF28, SMRZ, TRIM63, exercício.

Treinamento	Referência	População	Número de participantes (N)/ média de idade (anos)	Intervenção	Resultados Murf-1
Crônico	Watson et al., 2013	Pacientes com doença renal crônica estágio 4 ou 5 que não recebem terapia renal substitutiva	N= 26; Grupo Exercício n= 15/ média idade= 62; Grupo Controle n= 11 / média idade= 58	Protocolo de exercício: 30 min caminhada rápida, 5x / semana por 6 meses Grupos: Exercício + bicarbonato oral n= 9 Exercício+ adição de bicarbonato n=6 Controle + bicarbonato oral n= 8 Controle + adição de bicarbonato n= 3	Grupo Exercício + adição de bicarbonato: ↓ Murf1 mRNA Demais grupos: ↔ Murf1 mRNA
Crônico	Wohlgemuth et al., 2011	Mulheres sedentárias com sobrepeso - IMC >29kg/m ²	N= 13; media idade= 66 Grupo exercício: n= 6; Grupo controle: n=7/	Grupo exercício (programa de perda de peso: redução de 500 - 1.000kcal / dia na ingestão de energia, associado a 150 min /semana de treino aeróbio + treinamento resistido 45 min / semana) por 6 meses vs. O grupo controle mantém seus padrões usuais de alimentação e atividade física	Grupo exercício: ↔Murf1 mRNA Grupo controle: ↔Murf1 mRNA

Continua

Continuação: Tabela 2. Pesquisa bibliográfica de ensaios clínicos com descritores Murf-1, RNF28, SMRZ, TRIM63, exercício.

Treinamento	Referência	População	Número de participantes (N)/ média de idade (anos)	Intervenção	Resultados Murf-1
Crônico	Salanova et al., 2008	Mulheres saudáveis	N= 16; média idade= 34 Grupo Exercício n= 8; Grupo Controle n= 8 /	Grupo exercícios (grupo de exercícios para repouso na cama) Protocolo de exercício: treinamento muscular resistido e aeróbio combinado, 50 min, durante 60 dias vs. Grupo controle (grupo somente para repouso sem treinamento)	Músculo vasto lateral Grupos exercícios e controle: ↔ Murf1 proteína Músculo sóleo Grupo Exercício: ↔Murf1 proteína Grupo Controle: ↑Murf1 proteína
Crônico	Gielen et al., 2012	Pacientes com insuficiência cardíaca crônica(ICC) e controles saudáveis	<i>Pacientes ICC com exercício:</i> N= 30 (n= 15; média de idade= 46 / n= 15; média de idade = 72) <i>Pacientes ICC sem exercício:</i> N= 30 (n= 15; média de idade = 46 / n= 15; média de idade= 72) <i>Saudáveis com exercício:</i> N= 30 (n= 15; média idade= 50 / n=15; média idade= 72) <i>Saudáveis sem exercício:</i> N= 30 (n= 15;média idade= 50 / n=15;média idade= 72)	Protocolo de exercício: 20 min treinamento aeróbio cicloergômetro, 4x/semana durante 4 semanas vs. Controle: grupo inativo recebeu atendimento clínico habitual de seus médicos	Após treinamento: Pacientes ICC: ↓ Murf1 mRNA, em ambos grupos de idade. ↓ Murf proteína, em ambos grupos de idade Saudáveis: ↓ Murf1 mRNA, somente no jovens ↔ Murf proteína, em todas as idades

Continua

Conclusão: Tabela 2. Pesquisa bibliográfica de ensaios clínicos com descritores Murf-1, RNF28, SMRZ, TRIM63, exercício.

Treinamento	Referência	População	Número de participantes (N)/ média de idade (anos)	Intervenção	Resultados Murf-1
Crônico	Shaarani et al., 2013	Pacientes com ruptura do ligamento cruzado anterior	N= 14; idade= 18-45 Grupo Exercício n= 7; Grupo Controle n= 7 /	Protocolo de exercício: 4x/ semana, 2 sessões de musculação supervisionadas, intercaladas com 2 sessões em casa durante 6 semanas no período pré-operatório, e no pós-operatório uma sessão de fisioterapia padrão, melhorando a simetria e o padrão da marcha. Controle: Os indivíduos mantiveram seu exercício ou qualquer atividade normal da vida diária antes da reconstrução do ligamento cruzado anterior. A biópsia foi realizada 6 semanas no pré-operatório (basal), pré-operatório e 6 semanas no pós-operatório nos dois grupos.	6 semanas pré-op x pré-op x 12 semanas pós-op: Grupo Exercício: ↔ Murf-1 mRNA Grupo controle: ↔ Murf-1 mRNA
Crônico	Trappe et al., 2012	Adultos	N=36/ média idade= 64 Grupos: Acetaminofeno (4.0 g/dia): N=11 Ibuprofeno (1.2 g/dia): N=13 Placebo: N=12	Protocolo de exercício: 3x/ semana, durante 12 semanas, treinamento progressivo com exercícios aeróbios	Groups acetaminofeno e ibuprofeno: ↔ Murf1 mRNA Grupo placebo: ↑ Murf1 mRNA

Tabela 3. Pesquisa bibliográfica de ensaios clínicos com descritores IL-15, MGC9721, exercício.

Treinamento	Referência	População	Número de participantes (N)/ média de idade (anos)	Intervenção	Resultados IL-15
Crônico	Rinnov et al., 2014	Homens jovens saudáveis fisicamente ativos	Estudo 1: n = 15 Grupo treinado: N=10/ média idade=30,5 Grupo controle: N=5/ média idade=25,2 Estudo 2: n = 15 Grupo exercício: N=8/ média idade=27 Grupo repouso: N=7/ média idade=24,4	Estudo 1: Protocolo do exercício: Exercício em cicloergômetro: 5x / semana variando de 60 a 120min por 12 semanas Estudo 2: Protocolo de exercício: 3h de ciclismo a aproximadamente 60% do VO₂máx, seguido de 6h de recuperação	Estudo 1: Grupo treinado: ↔IL15 mRNA ↑IL15 proteína Grupo controle: ↔IL15 mRNA ↔IL15 proteína Estudo 2: Pós: 1,5h; 3h;h 6h: Grupo exercício: ↔IL15 mRNA ↔IL15 proteína Pós: 21h ↓IL15 mRNA Grupo repouso: ↔IL15 mRNA