

Guilherme Alves de Lima

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

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

Área de Concentração: Fisiologia
Humana.

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan
Fabres Machado.

Versão Original

São Paulo
2011

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

1.1 Captação de glicose

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

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

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

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

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

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

1.2 Contração muscular

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

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

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

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

O processo de contração muscular promove também a hidrólise de ATP em ADP + Pi para produzir energia, com isso diminui a concentração de ATP e aumenta a concentração de 5'AMP. Este fenômeno leva à ativação da proteína AMPK (Proteína cinase ativada por 5'AMP). Esta cinase é ativada pelo 5'AMP, não apenas por mecanismos alostéricos (CORTON; GILLESPIE; HARDIE, 1994), mas também pela fosforilação de uma cinase anterior, a AMPKK, que também é ativada pelo 5'AMP (HAWLEY et al., 1996). A AMPK é um complexo heterotrimétrico que apresenta três subunidades, uma catalítica (α) e outras duas não catalíticas (β e γ) (HARDIE; CARLING, 1997). Cada subunidade apresenta duas ou mais isoformas (KEMP et al., 1999). No músculo esquelético, o complexo é formado pelas isoformas α_2 , β_1 e γ_1 ou γ_3 (MAHLAPUU et al., 2004). A subunidade β atua como um esqueleto que mantém as subunidades α e γ ligadas a ela, a subunidade γ tem sido proposta como ligante de 5'AMP. Mutações da subunidade γ podem acarretar problemas no metabolismo de glicogênio (ARAD et al., 2002; CHEUNG et al., 2000). A contração muscular promove a ativação da subunidade α_2 , que quando ativada, fosforila uma série de proteínas-alvo no citoplasma, além de migrar para o núcleo da célula, podendo assim estar envolvida com transcrição de genes-alvo (SALT et al., 1998).

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Controle do diabetes mellitus tipo 2

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

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

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

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

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

1.4 Expressão gênica do GLUT4

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

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

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

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

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

1.5 Fatores transcricionais que atuam na expressão do GLUT4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Os TRs (receptores de hormônio tireoidiano) são proteínas codificadas por dois genes distintos, do TR α e do TR β , e que apresentam múltiplas isoformas (α 1, α 2, β 1, β 2, β 3). As isoformas α 1, α 2 e β 1 estão presentes em todos os tecidos. No tecido muscular esquelético as isoformas α 1 e β 1 são mais abundantes (WILLIAMS, 1995). Normalmente, mesmo na ausência de hormônios, os TRs estão ligados ao seu elemento responsivo na forma de monômeros, homodímeros e principalmente na forma de heterodímeros (com preferência pela dimerização com o receptor de retinóides RXR) (BARRA et al., 2004).

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

Um conjunto de 3 elementos responsivos (sítio de ligação do MEF2, E-Box e TRE) forma uma grande região de 82 pares de bases denominada GLUT4 *enhancer*. No gene SLC2A4 de ratos, o GLUT4 *enhancer* está localizado entre os pares de base -502/-420. Sabe-se que a co-ativação de MEF2A, MyoD (liga no E-Box) e TR α 1 é capaz de ativar a expressão do gene do GLUT4 atuando nesta região *enhancer* (SANTALUCIA et al., 2001).

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

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

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

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

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O presente trabalho é o primeiro a investigar os problemas na ativação do gene SLC2A4 em resposta a contração muscular, causados pelo diabetes mellitus.

Nossos resultados podem ser assim resumidos:

- Em músculo sóleo de ratos o estímulo contrátil “in vitro” supra-máximo promove o aumento da expressão do gene SLC2A4.
- As proteínas ativadas pela contração muscular, AMPK e CAMKII, aumentam a expressão do gene SLC2A4, alterando atividade transcricional relacionada à região *enhancer* do promotor do GLUT4.
- A mutação de qualquer um dos 3 domínios da região *enhancer* (MEF2, E-Box e TRE) leva a uma drástica redução da expressão basal do SLC2A4, mostrando que os 3 domínios são de extrema importância para a expressão deste gene.
- A mutação do sítio de ligação do MEF2 abole totalmente as respostas positivas causadas pela AMPK e principalmente pela CAMKII.
- Estimuladas pelo estímulo contrátil, a AMPK e a CAMKII estão diretamente relacionadas ao aumento de ligação dos fatores transcricionais GEF e MEF2D no promotor do gene SLC2A4.
- A contração muscular “in vitro” promove o aumento da atividade de ligação de fatores transcricionais nos sítio de ligação do MEF2, no E-Box, no Domínio 1 e no TRE, assim como o aumento da atividade da enzima AMPK.
- O estado diabético promove um déficit na expressão do mRNA e da proteína GLUT4, que se correlaciona: com diminuição da atividade de ligação da proteína MEF2 ao promotor do GLUT4; com a diminuição da expressão do mRNA de MEF2A, MEF2D, α 2AMPK, CAMKII e do p300; e com o deficiência na ativação da AMPK e na ativação dos fatores transcricionais MEF2D, GEF e TR α 1 .
- Apesar de aumento de expressão e de atividade de ligação no estado diabético, o HIF-1 α não deve estar ativando transcrição do SLC2A4 por diminuição da expressão do seu co-ativador p300 nesse estado.
- O tratamento com insulina recupera os níveis basais de GLUT4, e a capacidade do tecido muscular em responder positivamente à atividade contrátil. Recupera também a atividade de ligação dos fatores MEF2, GEF e TR α 1 pela atividade contrátil.

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

Com base nos resultados obtidos conclui-se que em músculo sóleo de ratos diabéticos a contração muscular não aumenta a expressão do gene SLC2A4, o que envolve redução na atividade dos fatores transcricionais MEF2D, GEF e TR α 1. Em células C2C12, a AMPK e a CAMKII aumentam a transcrição do SLC2A4, o que depende das regiões de ligação do MEF2D e do TR α 1. No diabetes, a contração muscular não aumenta a atividade da AMPK, reforçando a participação do MEF2D e TR α 1 na perda do efeito da contração sobre o gene SLC2A4.

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

REFERÊNCIAS*

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 29, p. S43–S48, 2006. Suppl. 1.
- ANDREWS, N. C.; FALLER, D. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-Binding proteins for limiting numbers of mammalian cells. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 19, p. 2499, 1991.
- ARAD, M.; BENSON, D. W.; ATAYDE, A. R. P.; McKENNA, W. J.; SPARKS, E. A.; KANTER, R. J.; McGARRY, K.; SEIDMAN, J. D.; SEIDMAN, C. E. Constitutively active AMP Kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. **J. Clin. Invest**, v. 109, p. 357-362, 2002.
- ARNOLD, M. A., KIM, Y.; CZUBRYT, M. P.; PHAN, D.; MCANALLY, J.; QI, X.; SHELTON, J. M.; RICHARDSON, J. A.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. **Dev. Cell.**, v. 12, p. 377-389, 2007.
- ASSUNÇÃO, M. C. F.; SANTOS, I. S.; COSTA, J. S. D. Avaliação do processo da atenção médica: adequação do tratamento de pacientes com diabetes mellitus, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p. 205-211, 2002.
- BARNES, P. J.; KARIN, M. NF Kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, p. 1066-1071, 1997.
- BARRA, G. B.; VELASCO, L. F. R.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A. M.; MOURA, F. N.; DIAS, F. M. G.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R. C. J.; SIMEONI, R. A.; NEVER, F. A. R. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 48, n.1, p. 23-38, 2004.
- BLACK, B. L.; OLSON, E. N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 14, p. 167-196, 1998.
- BLAU, H. M.; PAVLATH, G. K.; HARDEMAN, E. C.; CHIU, C. P.; SILBERSTEIN, L.; WEBSTER, S. G.; MILLER, S. C.; WEBSTER, C. Plasticity of the differentiated state. **Science**, v. 15, n. 4727, p. 758-766, 1985.
- BLOCK, N. E.; MENICK, D. R.; ROBINSON, K. A.; BUSE, M. G. Effect of denervation on the expression of two glucose transport isoforms in rat hindlimb muscle. **J. Clin. Invest.**, v. 88, n.5, p. 1546-1552, 1991.
- BRAUN, A. P.; SCHULMAN, H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 417–445, 1995.

<p>* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração: Rio de Janeiro, 2002</p>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DOWELL, P.; COOKE, D. W. Olf –1/ Ear1B cell factor is a regulator of GLUT4 gene expression in 3t3-L1 Adipocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 1712-1718, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle: effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory activity in skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 242, p. 2278-2282, 1976.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LIU, M. L.; OLSON, A. L.; EDGINGTON, N. P.; MOYE-ROWLEY, W. S.; PESSIN, J. E. Mef 2 binding site is essential for c12 myotubes –specific expression of the rat GLUT4/Muscle-adipose facilitative glucose transport gene. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28514-28521, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ROYER, C.; LACHER, J.; CROUZOUOLON, G.; ROUX, J. C.; PEYRONNET, J.; MAMET, J.; PEQUIBNOT, J. M.; DALMAZ, Y. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of GLUT3 and GLUT4 transporters, hypoxia inducible factor I and

thyroid hormone receptors in developing rat brain. **Brain Research**, v. 856, p. 119-128, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TERADA, S.; MURAOKA, I.; TABATA, I. Changes in $\{Ca^{2+}\}$ induced by several glucose transport-enhancing stimuli in rat epitrochlearis muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 94, p. 1813-1820, 2003.

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

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

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

TOMBES, R. M.; FAISON, M. O.; TURBEVILLE, J. M. Organization and evolution of multifunctional Ca²⁺/CAM-dependent protein kinase genes. **Gene**, v. 322, p. 17-31, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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