



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

EFEITO DE DOIS PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO FÍSICO
NO COMPORTAMENTO DA PROTEÍNA CLUSTERINA EM
CAMUNDONGOS OBESOS

CHADI PELLEGRINI ANARUMA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do doutoramento em Ciências da Motricidade (Biodinâmica da Motricidade Humana).

Rio Claro – SP
2020

**EFEITO DE DOIS PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO FÍSICO
NO COMPORTAMENTO DA PROTEÍNA CLUSTERINA EM
CAMUNDONGOS OBESOS**

CHADI PELLEGRINI ANARUMA

ORIENTADOR: PROF. DR. LEANDRO PEREIRA DE MOURA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do doutoramento em Ciências da Motricidade (Biodinâmica da Motricidade Humana).

Rio Claro – SP

2020

A533e Anaruma, Chadi Pellegrini
Efeito de dois protocolos de exercício físico no
comportamento da proteína Clusterina em camundongos
obesos / Chadi Pellegrini Anaruma. -- Rio Claro, 2020
49 f.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Leandro Pereira de Moura

1. Educação física. 2. Exercício físico. 3. Obesidade. 4.
Resistência à insulina. 5. Clusterina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

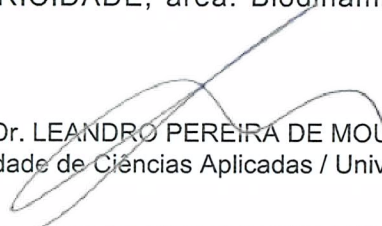
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO DE DOIS PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO FÍSICO NO METABOLISMO DA CLUSTERINA EM CAMUNDONGOS OBESOS

AUTOR: CHADI PELLEGRINI ANARUMA

ORIENTADOR: LEANDRO PEREIRA DE MOURA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE, área: Biotônica da Motricidade Humana pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LEANDRO PEREIRA DE MOURA

Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas - Limeira / SP

Prof. Dr. CARLOS KIYOSHI KATASHIMA

Laboratório de Biologia Molecular do Exercício - Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas - Limeira / SP

Prof. Dr. FERNANDO MOREIRA SIMABUCO

Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas - Limeira / SP

Prof. Dr. JULIO WILSON DOS SANTOS

Departamento de Educação Física / UNESP - Faculdade de Ciências de Bauru/ SP

Profa. Dra. LUCIELE GUERRA MINUZZI

Pós Doutorando do Departamento de Educação Física / UNESP - Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - SP

Rio Claro, 11 de setembro de 2020

Auxílio Financeiro

FAPESP

Bolsa doutorado regular no país: processo nº2016/14388-9

Bolsa BEPE: processo nº2018/15461-7

Auxílio regular: processo nº2015/07199-2

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais, Carlos e Silvana e a meus irmãos, Cahuê e Mahal, que estiveram comigo durante toda minha vida e sempre me apoiaram.

À pessoa que esteve sempre ao meu lado, Daniela, me incentivando e dedicando-se ao meu bem estar, me dando alegrias e momentos inesquecíveis.

Aos meus amigos que contribuíram aos momentos de alegria e influenciaram para que me tornasse quem estou me tornando.

Aos amigos de laboratório que participaram e compartilharam ideias e saberes, momentos felizes e tristes, sabendo que estávamos crescendo juntos.

A FCA-UNICAMP e UNESP, bem como seus funcionários pela estrutura e suporte.

Aos professores, Rodrigo Pauli, Eduardo Ropelle e Dennys Cintra, pelas discussões e ensinamentos durante à realização desse trabalho.

Em especial ao Prof. Dr. Leandro Pereira de Moura, pela paciência, compreensão, ensinamentos e por acreditar e abrir as portas para meu crescimento e desenvolvimento pessoal e profissional.

Por fim, às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fomento da pesquisa através das bolsa doutorado regular no país (processo nº 2016/14388-9), bolsa estágio pesquisa no exterior (processo nº 2018/15461-7) e auxílio regular (processo nº 2015/07199-2), bem como a CAPES, pelo apoio financeiro e condições para o desenvolvimento desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Introdução: Recentemente relacionada com a sinalização da insulina, a proteína clusterina (CLU) pode ser encontrada em diversos tecidos e também livre em soro. Sabe-se que o exercício físico desempenha um papel positivo na sinalização da insulina. Entretanto, os efeitos do exercício sobre os níveis de CLU permanecem desconhecidos. **Objetivos:** Investigar o efeito do treinamento de curta duração na homeostase glicêmica e níveis musculares de CLU em camundongos obesos e avaliar se os efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da insulina são compartilhados com a via da CLU. **Métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética sob o nº 4773-1/2018. Camundongos Swiss foram divididos em quatro grupos: controle sedentário (CTS, n=24); alimentado com dieta padrão; obeso sedentário (OBS, n=24), obeso submetido ao treinamento aeróbico em esteira (OBA, n=12) e; obeso treinamento de força em escada (OBF, n=12); alimentados com dieta hiperlipídica (60% Kcal de gordura), por 14 semanas. O OBA foi submetido a uma hora de exercício em esteira a 75% da P_{máx} por 7 dias consecutivos. O OBF foi submetido a vinte escaladas em escada a 75% da MVCC por 7 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados e o tecido muscular esquelético foi extraído para análises de conteúdo proteico e RNA mensageiro. Dados representam média±E.P.M.. As comparações entre grupos foram feitas utilizando teste de análise de variância de uma via seguida de pós teste de Tukey. Coeficientes de correlação foram calculados usando teste de Spearman. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** Os animais obesos apresentaram desarranjo na homeostase glicêmica e na sensibilidade à insulina quando comparados ao grupo CTS, o que foi melhorado pelo treinamento de curta duração (TCD) em esteira. Os níveis de insulina séricas estavam elevados no grupo OBS quando comparados ao grupo CTS, assim como o índice HOMA-IR, o TCD foi eficaz em melhorar ambos os parâmetros. O TCD melhorou a sinalização da insulina no grupo OBA comparados com CTS e OBS. A DHL foi não foi capaz de aumentar os níveis de CLU muscular, entretanto, o TCD elevou os níveis de CLU em 143% vs CTS e 121% vs OBS. O estímulo com insulina elevou os níveis de CLU musculares em 37% no grupo OBS comparado ao CTS e o TCD reduziu seus valores significativamente. A expressão gênica de CLU aumentou 172% e 114% em tecido muscular do grupo OBA, quando comparado com CTS e OBS, respectivamente. Os níveis proteicos de CLU muscular se correlacionaram positivamente os parâmetros fisiológicos, dentre eles, a glicemia de jejum ($r=0,60$; $p=0,04$), insulina sérica ($r=0,70$; $p=0,01$) e HOMA-IR ($r=0,72$; $p=0,007$). A homeostase glicêmica também foi melhorada pelo TCD em escada. A glicemia de jejum apresentou aumento no grupo OBS quando comparado ao CTS, assim como na insulina sérica. O TCD em escada foi eficaz em reduzir ambos parâmetros, entretanto, não foi capaz de alterar o índice HOMA-IR. Durante o ipITT, o grupo OBF apresentou redução na AUC e melhora de 62% no kITT quando estimulados com insulina. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis proteicos e gênicos de CLU muscular, porém, o TCD foi capaz de aumentar os níveis de LRP2 no músculo esquelético desses animais. **Conclusão:** De acordo com os dados, concluímos que a proteína CLU tem um papel na homeostase glicêmica ao se correlacionar com diversos parâmetros fisiológicos e sofrer alterações causadas pelo estímulo com insulina. Ademais, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar o efeito do TCD nos níveis de CLU musculares, assim como o TCD tem a capacidade de melhorar o quadro de resistência à insulina sem alterações na massa corporal e, por fim, somente o treinamento em esteira foi capaz de modular os níveis proteicos e gênicos de CLU muscular.

Palavras-chave: Obesidade, Diabetes, Resistência à Insulina, Clusterina, Treinamento Físico.

ABSTRACT

Introduction: Recently related to insulin signaling, clusterin (CLU) protein can be found in several tissues as well in serum. It is known that physical exercise plays a positive role in insulin pathway. However, till the date, is unknown the effect of exercise in CLU levels. **Objective:** We investigated the effect of short-term training in glucose homeostasis and muscular CLU levels in obese mice. **Methods:** Study protocol was approved by ethics committee n° 4773-1/201. Swiss mice were divided into four groups: CTS (n=12): fed with chow diet and; OBS (n=12), OBA (n=12) and OBF (n=12): fed with high fat diet (60% Kcal fat), for 14 weeks. The OBA group underwent one-hour treadmill aerobic exercise at 75% Pmax for seven consecutive days. The OBF group underwent 20 climbing on stairs at 75% MVCC for seven consecutive days. Mice were euthanized and skeletal muscle (gastrocnemius) was excised for protein content and RNAm analyses. Data are presented as mean±S.E.M.. Comparisons between groups were done using ANOVA one-way followed by Tukey post hoc test. Correlation coefficients were calculated using Pearson or Spearman's test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. **Results:** Obese mice presented worsened glucose homeostasis and insulin signaling compared with CTS, which was improved by the short-term training (STT) in treadmill. Serum insulin levels were increased in OBS compared with CTS as well as HOMA-IR, STT was efficient in improving both parameters. STT improved insulin signaling in OBA compared with CTS and OBS. The HFD was not able to increase CLU skeletal muscle levels, however the STT increased CLU levels in 143% vs CTS and 121% vs OBS. Insulin stimulus increased CLU. Insulin increased CLU levels by 37% in OBS compared with CTS and STT reduced its levels significantly. CLU gene expression increased 172% and 114% in OBA skeletal muscle compared with CTS and OBS, respectively. CLU protein levels positively correlated with physiologic parameters, among than, fasting blood glucose ($r=0.60$; $p=0.04$), serum insulin ($r=0.70$; $p=0.01$) and HOMA-IR (0.72 ; $p=0.007$). Glucose homeostasis was also improved by the STT in stairs. Fasting blood glucose levels were increased in OBS compared with CTS as well as serum insulin. STT was efficient in improving both parameters, but no changes were found in HOMA-IR. During the ipITT, the group OBF presented reduction in AUC and blood glucose decay improved by 62% when insulin-stimulated. No differences were found in muscle CLU protein content and gene expression between groups, however, the STT was able to increase LRP2 protein levels in skeletal muscle. **Conclusion:** According to data presented, we concluded that clusterin plays an important role on glucose homeostasis due to its correlation with several physiologic parameters as well as be modulated by insulin stimulus. Additionally, we are the first study about the effect of STT in skeletal muscle CLU levels and here we showed that STT improved insulin signaling in obese mice skeletal muscle but only the treadmill STT was able to modulated CLU protein and mRNA levels in obese mice skeletal muscle regardless of body weight changes.

Keywords: Obesity; Clusterin; Insulin Resistance; Physical Exercise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema ilustrativo dos objetivos propostos.....	18
Figura 2: Desenho experimental.....	21
Figura 3: Parâmetros antropométricos e fisiológicos dos grupos experimentais durante ipTTI.....	25
Figura 4: Quadro de fosforilação das proteínas relacionadas a sinalização da insulina, crescimento e sobrevivência celular em gastrocnêmio dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira.....	26
Figura 5: Efeito da insulina e do TCD no conteúdo proteico de CLU nos grupos experimentais.....	27
Figura 6: Expressão gênica de CLU em músculo esquelético dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira.....	28
Figura 7: Gráficos de correlação entre os níveis proteicos de CLU muscular e parâmetros antropométricos e fisiológicos dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira.....	29
Figura 8: Parâmetros antropométricos e fisiológicos dos grupos experimentais durante ipTTI.....	31
Figura 9: Efeito do TCD em escada no conteúdo proteico de CLU e seu receptor LRP2 nos grupos experimentais.....	31
Figure 10: Expressão gênica de CLU em músculo esquelético dos grupos experimentais submetidos ao exercício em escada.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas padrão ou hiperlipídica dos grupos experimentais.....	19
Tabela 2: Lista de primers dos genes de interesse.....	23

LISTA DE ABREVIACÕES

Adapt.- Adaptação

AIN - American Institute of Nutrition

AKT - Proteína quinase B

AMP – Monofosfato de adenosina

AMPK - Proteína quinase ativada por AMP

ApoA-1 - Apolipoproteína A-1

ApoJ – Apolipoproteína J

AS160 – Substrato de AKT de 160 kDa

AUC – Área sob a curva

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA - Comissão de Ética no Uso Animal

CLU – Clusterina

cm – Centímetros

CTS – Controle sedentário

D - Dias

dL – Decilitro

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

ECL - Reagente de quimioluminescência

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

E.P.M. - Erro padrão da média

ERK1/2 – Proteína quinase regulada por sinal extracelular

Fig. – Figura

FOXO1 - *Forkhead box protein O1*

g – Grama

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GLUT-4 - Transportadores de glicose 4

GMP - Monofosfato de guanosina

GS - Glicogênio sintase

GSK3 β – Glicogênio sintase quinase 3 β

G6Pase - Glicose 6 fosfatase

H - Horas

DHL – Dieta hiperlipídica

HOMA-IR - Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance

IB – Immunoblot

ipITT – Teste de tolerância à insulina intraperitoneal

IR – Receptor de insulina

IRS - Substrato do receptor de insulina

JAK2 – Janus quinase 2

Kcal – Quilocalorias

kDa – Quilodalton

Kg – Quilograma

kITT - Taxa constante de captação da glicose plasmática

LRP – Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade

m – Metros

M – Metionina

MAC - Complexo de ataque a membrana

mg – Miligramas

min – Minutos

mL – Mililitros

mM – MiliMolar

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MVCC – Máxima carga de carregamento voluntário

NaCl – Cloreto de sódio

ng – Nanograma

N.U. – Unidades normalizadas

OBA – Obeso treinado em esteira

OBf – Obeso treinado em escada

OBS – Obeso sedentário

P - Fosforilado

PEPCK - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PGC-1 α - Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase

PKC - Proteína quinase C

P_{máx} – Potência máxima

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PVC - Polyvinyl Chloride

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo

q.s.p. – Quantidade suficiente para

rpm – Rotações por minuto

seg – Segundos

SH2 - Homologia a Src 2

SH3 - Src-homologo 3

STAT-3 - Proteína transdutora de sinal e ativador de transcrição 3

TCD – Treinamento de curta duração

T - Tempo

U – Unidades

μg – Micrograma

μL – Microlitro

vs - Versus

X - Qualquer aminoácido

Y – Tirosina

°C – Graus Celsius

- número

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Sinalização da insulina	11
2.2	Sinalizações da insulina no músculo esquelético	12
2.3	O papel da clusterina na sinalização da insulina	12
2.4	Efeitos do exercício físico sobre a sensibilidade à insulina no músculo esquelético	14
3	JUSTIFICATIVA	15
4	OBJETIVOS	16
4.1	Objetivo Geral	16
4.2	Objetivos específicos	16
5	MATERIAIS E MÉTODOS	19
5.1	Caracterização do modelo experimental	19
5.2	Composição da dieta hiperlipídica	19
5.3	Teste de carga incremental para determinação da potência máxima (P _{máx}) e protocolo de treinamento em esteira	20
5.4	Teste de carga incremental para determinação máxima carga de carregamento voluntário (MVCC) e protocolo de treinamento em escada	20
5.5	Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)	21
5.6	Eutanásia dos animais	22
5.7	Homogeneização e determinação do conteúdo de proteínas totais	22
5.8	Anticorpos utilizados nos experimentos	22
5.9	Quantificação dos níveis séricos de insulina de jejum	23
5.10	Extração tecidual e quantificação do mRNA	23
5.11	Análise estatística	24
6	RESULTADOS	24

6.1	Efeito do TCD aeróbio nos parâmetros antropométricos e fisiológicos em camundongos obesos	24
6.2	Efeito do TCD em esteira na sinalização da insulina e nos níveis proteicos e gênicos de CLU e seu receptor LRP2 em músculo esquelético dos animais submetidos ao protocolo experimental	26
6.3	Correlação entre conteúdo proteico de CLU muscular e parâmetros antropométricos e fisiológicos dos animais dos grupos experimentais	29
6.4	Efeito do TCD em escada nos parâmetros antropométricos e fisiológicos em camundongos obesos	30
6.5	Efeito do TCD em escada na sinalização da insulina e nos níveis proteicos e gênicos de CLU e seu receptor LRP2 em músculo esquelético dos animais submetidos ao protocolo experimental	32
6.6	Efeito do TCD em escada na sinalização da insulina e nos níveis proteicos e gênicos de CLU e seu receptor LRP2 em músculo esquelético dos animais submetidos ao protocolo experimental	33
6.7	Correlação entre conteúdo proteico de CLU muscular e parâmetros antropométricos e fisiológicos dos animais dos grupos experimentais	35
7	RESUMO DOS RESULTADOS	36
8	DISCUSSÃO	37
9	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
	ANEXO – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA	49

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença de prevalência acentuada em todo o mundo. Esta condição é definida como um estado de elevada massa corporal adiposa, capaz de induzir consequências adversas à saúde (Hossain, Kavar, & El Nahas, 2007). Dados apontam que a obesidade é responsável por cerca de 18% das mortes de pessoas entre 40-85 anos de idade (Masters et al., 2013). Seu impacto na saúde é devido sua relação com a resistência à insulina e o desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas não transmissíveis como as cardiovasculares, alguns tipos de câncer e o diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) (Masters et al., 2013).

Em 2013, 8,3% da população mundial (382 milhões de pessoas) foram diagnosticadas como diabéticas e nos anos de 2012 e 2013, 1.5-5.1 milhões de pessoas foram a óbito em decorrência desta doença, colocando-a como a 8ª causa de morte no mundo sendo que até o ano de 2035 é esperado que 592 milhões de pessoas tenham falecido devido a hiperglicemia crônica (Tao, Shi, & Zhao, 2015). Portanto, compreender as causas e os fatores determinantes de seu crescente número torna-se imprescindível na busca de soluções para retardar ou reverter a progressão desta alarmante realidade epidemiológica. Nesse sentido, diversos estudos têm sido realizados buscando identificar novas moléculas com ações regulatórias sobre a via de sinalização da insulina e consequentemente na homeostase da glicose.

Em 1988 Murphy e colaboradores mostraram que a apolipoproteína J (ApoJ), também conhecida como clusterina (CLU), estava incorporada no soro de humanos (Murphy, Kirszbaum, Walker, & d'Apice, 1988). A partir disso, experimentos foram realizados na tentativa de esclarecer seu papel no metabolismo. Vários autores mostraram sua participação na inflamação, neurogênese, apoptose e em diversas doenças como câncer, miocardite, Alzheimer, obesidade, entre outras (Bertrand, Poirier, Oda, Finch, & Pasinetti, 1995; Mclaughlin et al., 2000; Oberbach et al., 2011; Wang, Zeng, Liu, Zhang, & Ni, 2014; Won et al., 2014; Xue et al., 2015; Zhang et al., 2005). Recentemente, Kwon e colaboradores mostraram que animais obesos resistentes à insulina apresentam aumento dos níveis séricos de CLU, entretanto, animais obesos nocautes para o gene da CLU manifestaram resistência à insulina mais severa quando comparado ao seu controle obeso, sugerindo a importante participação desta glicoproteína na transdução do sinal da insulina (Kwon et al., 2014).

Sabe-se que o exercício físico tanto moderado como intenso atua como uma importante ferramenta na prevenção e tratamento da diabetes mellitus decorrente da obesidade por colaborar com a sinalização da insulina no músculo esquelético, aumentando a captação de glicose (Oliveira et al., 2014; Pauli et al., 2014). Entretanto, os efeitos regulatórios do exercício físico sobre a CLU não são conhecidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sinalização da insulina

A insulina é um hormônio anabólico com efeitos metabólicos múltiplos (Saltiel & Kahn, 2001). Para que haja compreensão sobre como ocorrem os fenômenos desempenhados pela ação deste hormônio, é importante o pleno entendimento dos eventos que ocorrem imediatamente após o início da sinalização mediada pela insulina. O receptor de insulina (IR) pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que apresentam atividade tirosina quinase intrínseca, ou seja, após a conexão da insulina com seu receptor, este sofre auto fosforilação em múltiplos resíduos de tirosina (Saltiel & Kahn, 2001; White, 1998). De forma geral, isto culmina com a ativação da função quinase do receptor, o qual propaga este sinal, fosforilando seus substratos intracelulares. Uma vez ativado, o IR fosforila vários substratos proteicos em tirosina. Quatro destes pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS (IRS- 1/2/3/4). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2), dentre as quais se destaca a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (Saltiel & Kahn, 2001; White, 1998). Com base em análise sequencial, existem 22 tirosinas potenciais para a fosforilação do IRS-1. Nove destas possuem uma de duas sequências repetitivas: YMXM ou YXXM, em que Y é tirosina, M é metionina e X é qualquer outro aminoácido. Seguindo-se à estimulação da insulina, estas tirosinas, como outras tirosinas potenciais na molécula de IRS-1, são rapidamente fosforiladas, resultando em uma ligação do IRS-1 com proteínas específicas.

O IRS-1 e o IRS-2 são considerados os principais substratos, e são os mais bem estudados até o momento. Sabe-se hoje que o IRS-1 e o IRS-2 fosforilados se associam à enzima PI3K, ativando-a. A ativação da proteína PI3K desencadeia a ativação de outras proteínas importantes, como a proteína quinase B, também conhecida como AKT. A ativação da via PI3K/AKT está relacionada à promoção dos efeitos metabólicos da insulina tecido-específica (captação de glicose, glicogênese e inibição da gliconeogênese) (Saltiel & Kahn, 2001). Dentre

os tecidos alvos da insulina destaca-se o tecido muscular, no qual, a insulina participa do influxo de glicose, síntese de glicogênio e síntese proteica.

2.2 Sinalizações da insulina no músculo esquelético

O músculo esquelético tem fundamental importância na homeostase glicêmica do organismo, sendo este tecido responsável por 80% de toda captação de glicose estimulada por insulina no organismo (Patti & Corvera, 2010). Por isso, qualquer redução na capacidade da insulina em estimular a captação de glicose neste tecido é relevante no controle da glicemia corporal total. A captação de glicose em músculo esquelético de pacientes diabéticos se mostra reduzida em comparação com os controles saudáveis. Tal fato indica que prejuízo na deposição de glicose no músculo contribui com o baixo controle da glicemia nos pacientes com diabetes. Adicionalmente, pacientes obesos e diabéticos apresentam menor ação da insulina no músculo com alterações sendo observadas na cascata de sinalização da insulina. Esses indivíduos apresentam menor fosforilação em tirosina do substrato do IRS-1 e na atividade da PI3K no músculo esquelético (Laurie J Goodyear et al., 1995; Zierath, Krook, & Wallberg-henriksson, 1998). Isso explica em parte o prejuízo na entrada de glicose estimulada por insulina no tecido muscular. Estas alterações na via de sinalização da insulina estão relacionadas a condições metabólicas como aumento dos níveis de ácidos graxos circulantes e da deposição de gordura intracelular com indução de inflamação nos tecidos periféricos (ex. músculo esquelético) de indivíduos com DM2. Tem sido demonstrado em humanos e animais que o excesso de gordura corporal está associado com inflamação de baixo grau e citocinas produzidas pelos adipócitos e infiltrado de macrófagos que alteram a capacidade de transdução do sinal da insulina, diminuindo a captação de glicose (Lumeng & Saltiel, 2011; Pagel-langenickel, Bao, Pang, & Sack, 2010).

2.3 O papel da clusterina na sinalização da insulina

Em 1988, Murphy e colaboradores descreveram uma proteína encontrada no soro de humanos, esta proteína composta por 23 aminoácidos consiste de duas cadeias, alfa (34-36kDa) e beta (36-39kDa) ligadas por pontes de dissulfeto a qual deram o nome de clusterina ou apolipoproteína J (Murphy et al., 1988). Sua oscilação ao longo do dia ainda não é conhecida, mas sabe-se que sua concentração é relativamente alta no cérebro, ovário, testículos e fígado, e baixa no coração, baço, pulmão e mamas. Esta apolipoproteína se difere de outras em seu peso molecular, estrutura de subunidade e carga elétrica (de Silva, Harmony, Stuart, Gil, & Robbins,

1990). Além disso, a CLU pode atuar no sistema imune. Ela é uma proteína reguladora do complemento em que inibe a perpetuação das cascatas de ativação do complemento, inibindo a formação do Complexo de ataque a membrana (MAC) (Jenne, Lowin, Peitsch, Bottchers, & Schmitzg, 1991). Ainda, esta glicoproteína atua na programação de morte celular e em conjunto com apolipoproteína A-1 (apoA-I) promove a inibição do MAC (Jenne et al., 1991).

A CLU é conhecida por participar de processos fisiológicos, como transporte de lipídeos, maturação de esperma, apoptose, processo inflamatório, aterosclerose e de não fisiológicos como câncer e DM2 (Rizzi, Caccamo, Belloni, & Bettuzzi, 2009; Trougakos & Gonos, 2002; Watari et al., 2008). Indivíduos diabéticos apresentam aumento nos níveis séricos de CLU (Kujiraoka et al., 2006) e recentemente, Kwon e colaboradores (Kwon et al., 2014) mostraram que animais obesos nocaute para CLU apresentam maior resistência à insulina frente aos seus controles obesos, sugerindo que a CLU pode desempenhar um papel protetor contra a progressão da resistência à insulina através da redução do estresse oxidativo e inflamação, independente do volume do tecido adiposo (Kwon et al., 2014). Recentemente, alguns estudos mostraram que a administração central de CLU ativa a via da proteína transdutora de sinal e ativador de transcrição 3 (do inglês: *signal transducers and activators of transcription 3* ou STAT-3) desenvolvendo anorexia e redução da massa corporal e o contrário é encontrado quando a CLU é inibida no hipotálamo, os autores descrevem este mecanismo sendo mediado pelo receptor da CLU, denominada proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 2 (do inglês: *low-density lipoprotein receptor-related protein-2* ou LRP2) que se liga no receptor de leptina após sua associação com CLU, subsequente a associação física entre receptor de leptina e LRP2 ocorre a internalização dos receptores e assim aumento da fosforilação da Janus quinase 2 (JAK2) e STAT3 (Byun et al., 2014; Gil et al., 2013)

Sabe-se que a CLU regula a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos (Kwon et al., 2014), mas o mecanismo pelo qual a CLU e seu receptor LRP2 se comunicam com a via de sinalização da insulina ainda não foi descrito na literatura. O LRP2, ou megalina é um dos principais receptores da CLU e faz parte de uma família de receptores transmembrana (LRP1-3-4-5 e 6) com similaridades para os receptores de lipoproteínas de baixa densidade (Kounnas et al., 1995). O LRP2 é um longo receptor transmembrânico (~600 kDa) e sua parte intracelular é constituída por vários domínios funcionais, dentre eles vários Src-homologo 3 (SH3) e um SH2. Os domínios Src-homologo são responsáveis por várias sinalizações intracelular, mais precisamente em fosforilações em tirosina. Uma vez fosforilado, o domínio SH2 possui um sítio de reconhecimento para o IRS-1, para a subunidade 85 da PI3K e outros sítios para

reconhecimento da proteína quinase C (PKC) e Monofosfato de adenosina/ Monofosfato de guanosina (AMP/GMP) cíclico (Glasheen, Backer, White, & Dk-, 2015; Hjalml et al., 1996; Myers et al., 1994), evidenciando assim um possível elo de comunicação (cross-talk) entre as vias da insulina e CLU.

2.4 Efeitos do exercício físico sobre à sensibilidade à insulina no músculo esquelético

O exercício físico regular favorece o controle metabólico em indivíduos diabéticos, sendo um importante componente do tratamento ao DM2 (Colberg et al., 2010). Em humanos e modelos animais de experimentação, o treinamento aeróbio aumenta a captação de glicose estimulada por insulina (Aronson, Fielding, & Goodyear, 1997; Frøsig et al., 1997) e reduz a secreção de insulina em resposta aos níveis glicêmicos (Hellenius, Berglund, & Faire, 1995), contribuindo com isso com a homeostase da glicose. Os efeitos positivos do exercício físico tanto agudo quanto crônico foram confirmados em experimento com uso da técnica do clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico em roedores, onde foi observado aumento na captação de glicose nos grupos exercitados comparado aos seus pares inativos no mesmo período (Berger, Hagg, & Ruderman, 1975). Diversos mecanismos podem aumentar a captação de glicose em resposta ao exercício físico, incluindo o aumento no fluxo sanguíneo, aumento na ligação da insulina ao seu receptor de membrana IR, aumento na atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), entre outros (Aronson et al., 1997; Berger et al., 1975; L. J. Goodyear, Hirshman, & Horton, 1991; Holloszy & Booth, 1976).

Na condição de repouso, o principal evento relacionado à captação de glicose envolve a ligação da insulina ao seu receptor e subsequente auto-fosforilação, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular. Estudos que procuraram investigar o efeito do exercício físico sobre a sinalização da insulina, demonstraram aumento na fosforilação do IRS-1 e IRS-2 e aumento da atividade da PI3K no músculo após 5 dias de treinamento em roedores (Chibalin et al., 1999). Tal efeito positivo foi evidenciado também por Wojtaszewski e colaboradores em 2005, que encontraram aumento na captação de glicose e na atividade da proteína glicogênio síntase em resposta ao exercício físico em jovens (Wojtaszewski et al., 2005). Neste estudo, não foi encontrado mudanças nas proteínas proximais da via de sinalização da insulina. Estudo realizado por Luciano e colaboradores em 2002, através de um protocolo de exercício aeróbio de natação para ratos magros não encontrou diferença na fosforilação em tirosina da subunidade β do receptor de insulina entre animais treinados e controles sedentários. Mas, foi demonstrado

aumento na fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) quando estimulado com insulina (Luciano et al., 2002). No entanto, estudos prévios em nosso laboratório foram observados que animais obesos estimulados com insulina apresentam significativa diminuição da fosforilação em tirosina do receptor de insulina e do IRS-1 muscular, e este aspecto foi restaurado com o exercício físico. Assim, existem evidências de que o exercício físico é capaz de regular positivamente a via de sinalização da insulina.

Após o exercício físico, para o retorno da homeostase e para adaptação ao estresse sofrido, o organismo dispõe de mecanismos para que a captação de glicose continue aumentada, tanto nas células musculares, como hepáticas: 1- há um aumento da atividade da enzima glicogênio sintase (GS) muscular e hepática, para que os estoques de glicogênio sejam restaurados e até mesmo, aumentados em relação ao conteúdo existentes pré-exercício (supercompensação) e 2- há uma diminuição da gliconeogênese, principalmente pós prandial, devido ao aumento da fosforilação e extrusão nuclear da proteína para caixa de forquilha O1 (do inglês: Forkhead box protein O1 ou FOXO1, redução da atividade da coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 α) e das enzimas gliconeogênicas fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose 6 fosfatase (G6Pase).

Assim sendo, está claro na literatura que o exercício físico atua na sinalização da insulina e também há evidências de que a CLU participa desta via de sinalização. Porém, até o presente momento ainda não se sabe se os benefícios decorrentes do exercício físico na homeostase da glicose estão relacionados com o metabolismo da CLU e, se sim, como esta mecanística ocorre. Portanto, se faz necessário compreender o processo pelo qual o exercício físico pode modular o metabolismo da CLU e por fim, tentar desvendar como ocorre o cross-talk entre as vias de sinalização da insulina com a via da CLU.

3 JUSTIFICATIVA

Sabendo que não há nenhum método totalmente eficaz para o tratamento da obesidade e DM2, nesse sentido, identificar novas moléculas e seus mecanismos de ação e regulação é imprescindível para melhor compreensão e futuras intervenções terapêuticas para essas doenças. Recém-relacionada com a resistência à insulina, a CLU pode ser considerada uma proteína chave na homeostase da glicose. Na presente pesquisa investigamos o efeito de diferentes tipos de exercício físico, tanto de resistência quanto resistido, na modulação da expressão da CLU, de participação crucial sobre a via molecular da insulina e na homeostase

da glicose no tecido muscular. Acreditamos que este mecanismo se inicie com a ligação da CLU em seu receptor de membrana (LRP2), posteriormente ocorrendo a ativação de proteínas envolvidas na sinalização da insulina, como IR, IRS-1 e AKT e, portanto, ocorrendo maior atividade da via de sinalização da insulina em tecidos periféricos. O presente projeto de pesquisa teve como objetivo realizar pesquisas experimentais envolvendo camundongos magros sedentários e obesos, sendo o grupo obesos sedentário ou submetidos a diferentes protocolos de exercício físico (esteira ou escada) com conseguinte avaliação de seus efeitos na expressão da CLU, bem como na via de sinalização da insulina. Assim, as etapas a seguir que compuseram o presente projeto são: 1- Elucidar o papel da obesidade nos níveis proteicos de CLU e sua expressão gênica, bem como na sinalização da insulina; 2- Avaliar o efeito do exercício físico de curta duração em esteira nos níveis proteicos e de mRNA de CLU, bem como na sinalização da insulina e por fim, 3- Avaliar o efeito do exercício físico de curta duração em escada nos níveis proteicos e de mRNA de CLU, assim como na sinalização da insulina.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do treinamento físico (resistência e resistido) de curta duração na expressão da CLU muscular e sua relação com a sinalização da insulina muscular em roedores magros e obesos resistentes à insulina.

4.2 Objetivos específicos

Objetivo 1: Sabe-se que a ingestão de dietas com alto conteúdo lipídico colaboram para o desenvolvimento da resistência à insulina na condição de obesidade. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o papel da obesidade sobre a expressão da CLU e seus efeitos na via de sinalização da insulina em animais obesos.

Meta I: Avaliar as características fenotípicas (massa corporal, glicemia de jejum, tolerância à insulina, insulinemia de jejum, índice HOMA-IR) de animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DHL).

Meta II: Analisar a fosforilação de enzimas chaves envolvidas com a via de sinalização da insulina (IR, IRS1, AKT, AS160, GSK3 β e ERK1/2) em tecido muscular de animais com obesidade induzida por DHL.

Meta III: Analisar os níveis proteicos de CLU e seu receptor LRP2 em tecido muscular de animais submetidos a DHL. Analisar os efeitos da insulina nos níveis proteicos de CLU em tecido muscular de animais com obesidade induzida por DHL.

Meta IV: Analisar os níveis de expressão gênica de CLU e seu receptor LRP2 através da quantificação do transcrito de mRNA do gene da CLU em tecido muscular de animais com obesidade induzida por DHL.

Objetivo 2: Sabe-se que a prática de exercício físico de resistência colabora na atenuação da resistência à insulina na condição de obesidade. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o papel do exercício físico de curta duração e moderada intensidade em esteira sobre a expressão da CLU e seus efeitos na via de sinalização da insulina em animais obesos.

Meta I: Avaliar as características fenotípicas (massa corporal, glicemia de jejum, tolerância à insulina, insulinemia de jejum, índice HOMA-IR) de animais obesos submetidos ao treinamento de curta duração em esteira.

Meta II: Analisar a fosforilação de enzimas chaves envolvidas com a via de sinalização da insulina (IR, IRS1, AKT, AS160, GSK3 β e ERK1/2) em tecido muscular de animais obesos submetidos ao treinamento de curta duração em esteira.

Meta III: Analisar os níveis proteicos de CLU e seu receptor LRP2 em tecido muscular de animais submetidos a DHL. Analisar os efeitos da insulina nos níveis proteicos de CLU em tecido muscular de animais obesos submetidos ao treinamento de curta duração em esteira.

Meta IV: Analisar os níveis de transcrição gênica de CLU e seu receptor LRP2 através da quantificação do mRNA em tecido muscular de animais obesos submetidos ao treinamento de curta duração em esteira.

Objetivo 3: Sabe-se que a prática de exercício físico resistido colabora na atenuação da resistência à insulina na condição de obesidade. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o papel do exercício físico de curta duração de escalada em escada sobre a expressão da CLU e seus efeitos na via de sinalização da insulina em animais obesos.

Meta I: Avaliar as características fenotípicas (massa corporal, glicemia de jejum, tolerância à insulina, insulinemia de jejum, índice HOMA-IR) de animais obesos submetidos ao treinamento de curta duração em escada.

Meta II: Analisar a fosforilação de enzimas chaves envolvidas com a via de sinalização da insulina (IR, IRS1, AKT, AS160, GSK3 β e ERK1/2) em tecido muscular de animais obesos submetidos ao treinamento de curta duração em escada.

Meta III: Analisar os níveis proteicos de CLU e seu receptor LRP2 em tecido muscular de animais submetidos a DHL. Analisar os efeitos da insulina nos níveis proteicos de CLU em tecido muscular de animais obesos submetidos ao treinamento de curta duração em escada.

Meta IV: Analisar os níveis de transcrição gênica de CLU e seu receptor LRP2 através da quantificação do mRNA em tecido muscular de animais obesos submetidos ao treinamento de curta duração em escada.

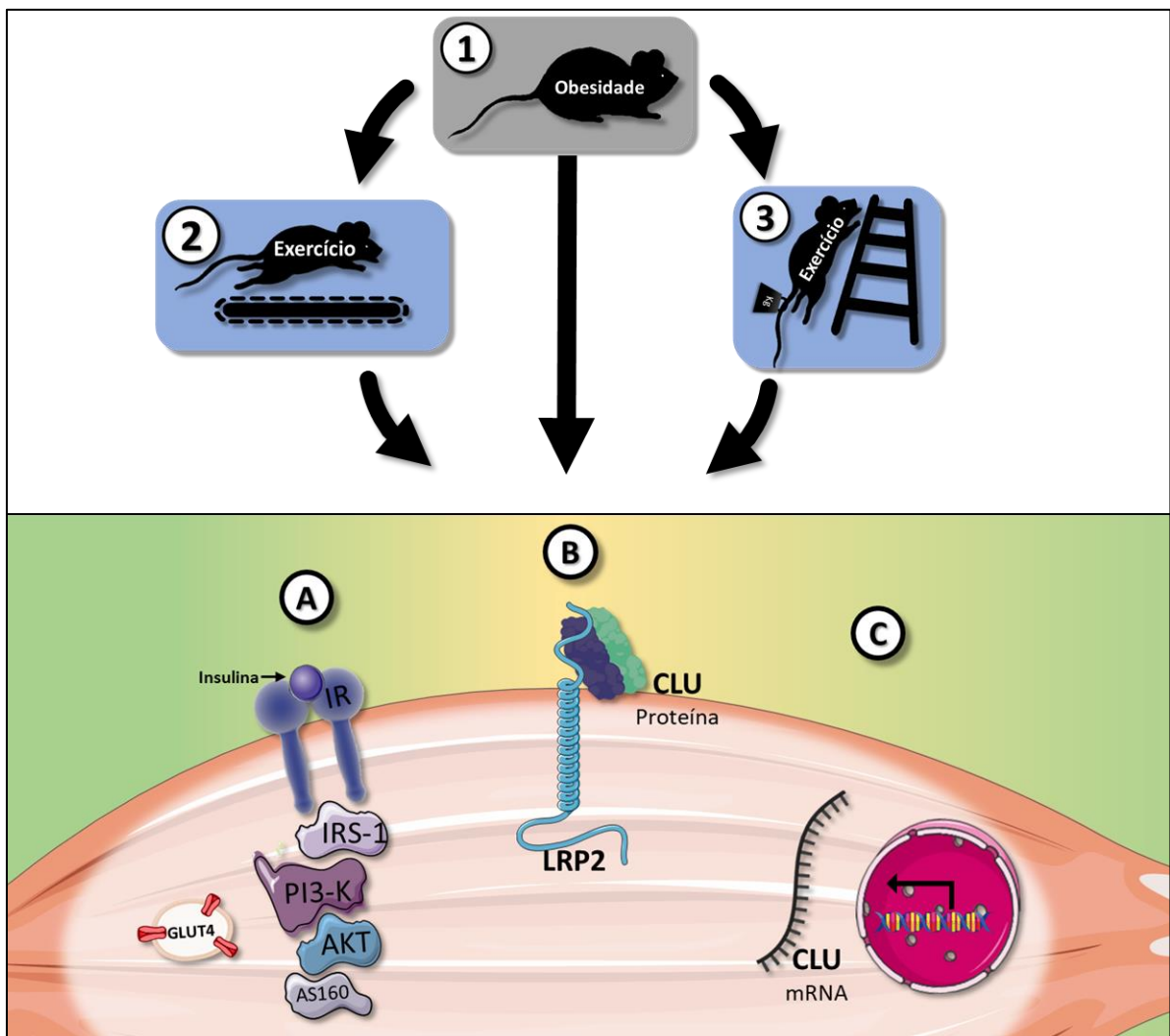


Figura 1. Esquema ilustrativo dos objetivos propostos. 1. O objetivo 1 tem como meta investigar o efeito da obesidade induzida por DHL nas enzimas envolvidas na sinalização da insulina (1-A), níveis proteicos (1-B) e gênicos (1-C) de CLU em tecido muscular de camundongos obesos; 2. O objetivo 2 tem como meta investigar o efeito do treinamento de curta duração em esteira na ativação das enzimas envolvidas na sinalização da insulina (2-A), níveis proteicos (2-B) e gênicos (2-C) de CLU em tecido muscular de camundongos obesos; 3. O objetivo 3 tem como meta investigar o efeito do treinamento de curta duração em escada

na ativação das enzimas envolvidas na sinalização da insulina (**3-A**), níveis proteicos (**3-B**) e gênicos (**3-C**) de CLU em tecido muscular de camundongos obesos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Caracterização do modelo experimental

Foram utilizados camundongos Swiss com quatro semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Unicamp. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008) e aprovados sob o protocolo nº 4773-1/2018 previamente a prática experimental pela Comissão de Ética no Uso Animal, do Instituto de Ciências Biológicas, da UNICAMP – Campinas-SP. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais com enriquecimento ambiental (abrigo constituído por tubos de PVC serrados ao meio medindo 10x10cm de base e 5cm de altura), sob as condições controladas de ciclo claro-escuro de 12h sendo que lâmpadas de 100W foram usadas durante o ciclo claro (Phillips; 2700K; 565–590nm; 60 lux), temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e humidade relativa mantida em 45-55% com livre acesso a água e ração convencional ou hiperlipídica. Posteriormente, os animais foram distribuídos em dois grupos: controle, receberam dieta padrão e grupo obeso, animais que receberão dieta rica em gordura por 14 semanas para o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina, antes de dar início à fase experimental, ao final da exposição a DHL, os animais obesos foram submetidos uma pesagem, glicemia de jejum e teste de tolerância à insulina intraperitoneal, posteriormente, foram subdivididos de forma homogênea utilizando a técnica de “score Z” baseado na massa corporal e glicemia de jejum, previamente ao início dos protocolos de treinamento.

Em seguida, os animais sob dieta sob DHL foram divididos em dois grupos, sendo um controle sedentário e outro submetido ao treinamento de curta duração, dentre os treinamentos, o primeiro grupo de animais desenvolveu o treinamento em esteira e o segundo o treinamento de escalada em escada. A cada protocolo de exercício, foram utilizados 3 grupos sendo eles: CTS: animais magros sedentários; OBS: animais obesos sedentários e; OBA ou OBF: animais obesos submetidos ao treinamento de curta duração (do inglês: short-term training ou TCD) em esteira (OBA) ou escada (OBF).

5.2 Composição da dieta hiperlipídica

A DHL foi preparada de acordo com as diretrizes da “American Institute of Nutrition” (AIN-93G) (Reeves, Nielsen, & Fahey, 1993) modificada para conter 35% de gordura (banha suína), como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das dietas padrão ou hiperlipídica dos grupos experimentais.

Ingredientes	Dieta padrão		DHL	
	g/Kg	Kcal/kg	g/Kg	Kcal/kg
Amido de milho (q.s.p.)	398	1590	116	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Amido dextrenizado	132	528	132	528
Banha suína	-	-	312	2808
Óleo de soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mix mineral	35	-	35	-
Mix vitamínico	10	-	10	-
L-Cisteína	3	-	3	-
Colina	2.5	-	2.5	-
Total	1000	3948	1000	5358

5.3 Teste de carga incremental para determinação da potência máxima (P_{máx}) e protocolo de treinamento em esteira

Primeiramente, os animais foram adaptados ao exercício em esteira rolante durante 5 dias, 10min/dia na velocidade de 3m/min. Conforme padronizado por Ferreira et al. (Ferreira et al., 2007), o teste de carga incremental foi iniciado na velocidade de 6m/min, com 0% de inclinação e foram feitos incrementos de 3m/min a cada 3min até a exaustão voluntária dos camundongos, padronizado para quando os mesmos encostarem 5 vezes no final da esteira em um intervalo de 1 min. A potência máxima (P_{máx}) ou velocidade máxima de exaustão, foi definida como a velocidade (m/min) de exaustão do animal e foi utilizada para a prescrição de intensidade no protocolo de treinamento em esteira que consistiu em uma intensidade de 75% da P_{máx} por uma hora ao dia durante 7 dias como descrito na Figura 2.

5.4 Teste de carga incremental para determinação máxima carga de carregamento voluntário (MVCC) e protocolo de treinamento em escada

Primeiramente, os animais foram adaptados ao aparato proposto por Cassilhas et al. (Cassilhas et al., 2013) pelo período de 5 dias consecutivos. Ao primeiro dia, os animais foram

adaptados ao tubo de carga vazio posicionado na cauda do animal e foram mantidos na câmara escura no topo da escada por 60 segundos. Nos demais dias, os animais foram posicionados a certa distância do topo, iniciando com 15cm com incrementos diários até a base da escada localizada a 70cm de distância do topo. Os animais foram considerados adaptados quando conseguiam executar 3 tentativas sem a necessidade de estímulo manual do pesquisador. Em seguida, os animais foram submetidos a avaliação da MVCC proposto para ratos por (Hornberger & Farrar, 2004; Speretta et al., 2016) e adaptados para camundongos no presente estudo. O teste incremental consiste em identificar a carga máxima individual que o animal é capaz de executar em uma tentativa de escalada desde a base até o topo totalizando 70cm de distância total. Os animais iniciam o teste com sobrecarga de 75% da massa corporal e incrementos de 5g eram feitos a cada tentativa completa com sucesso. A cada tentativa, os animais eram colocados em gaiolas individuais para descanso pelo período de 5 min. A carga máxima executada pelos animais foi considerada para cálculo de carga individual de treinamento. Após 48 horas da determinação da MVCC o treinamento de força foi iniciado. O exercício consistia de 20 escaladas (séries) com sobrecarga de 70% da MVCC com intervalos de 60-90 seg por 7 dias, como descrito na Figura 2.

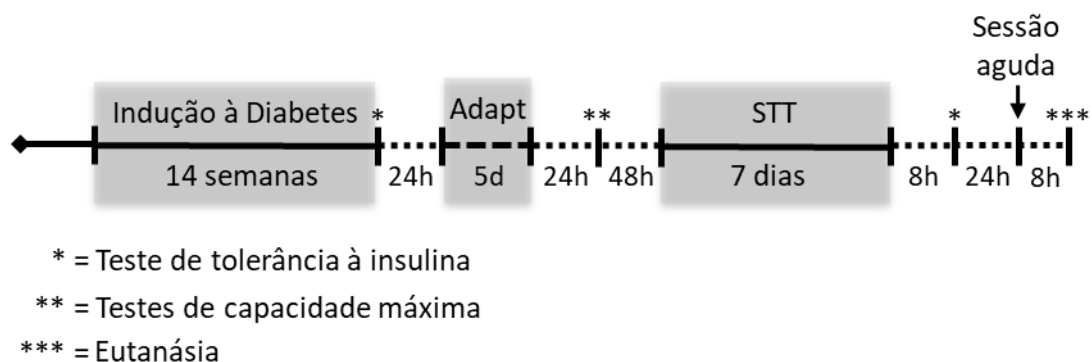


Figura 2: Desenho experimental. Adapt.: adaptação. TCD: short-term training (treinamento de curta duração).

5.5 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)

O teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT) foi realizado com os animais estando em jejum prévio de 8 horas para a avaliação do quadro de resistência à insulina induzida pela DHL repetido após 8 horas da última sessão de treinamento físico. Para isso, os camundongos receberam injeção intraperitoneal de insulina recombinante humana (Humulin R) da Eli Lilly (Indianápolis, IN, USA) na concentração de 1,5 U/kg de massa corporal. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a partir da

cauda dos animais para a determinação da glicemia. O tempo 0 representa o valor basal de glicose dos animais e que antecede a injeção de insulina. A área sob a curva (AUC) dos pontos foi calculada assim como a taxa constante de captação da glicose plasmática (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/\text{meia-vida biológica (t}_{1/2})$. A glicose plasmática $t_{1/2}$ foi calculada a partir da inclinação da última análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear (Bonora et al., 1989).

5.6 Eutanásia dos animais

Os animais em jejum de 8 horas foram anestesiados com a inalação de isoflurano e em seguida sacrificados para as coletas de sangue e tecido muscular (gastrocnêmio). As amostras de tecido muscular foram coletadas após 10 minutos da injeção de insulina, administrada via intraperitoneal 8-10 U/Kg diluída em soro fisiológico (NaCl 0,9%) com o intuito de estimular a via de sinalização da insulina muscular. As amostras coletadas foram rapidamente armazenadas até serem analisadas em freezer -80°C.

5.7 Homogeneização e determinação do conteúdo de proteínas totais

Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em tampão de extração (1% Triton-X 100, 100 mM de Tris (pH 7,4), 100 mM pirofosfato sódico, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM PMSF e 0,1 mg de aprotinina/mL) em 4 °C com, para tal, foram utilizadas esferas de aço no interior de micro tubos juntamente com o tecido muscular e posteriormente homogeneizadas utilizando o aparelho TissueLyser II (Quiagen) operado na velocidade máxima por 1 minuto. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C em um rotor Beckman 70.1 Ti (Palo Alto, CA) por 15 min para remover o material insolúvel, e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), enquanto que a outra parte foi submetida à técnica de imunoblot (IB) com anticorpos específicos. As metodologias para análise de IB foram realizadas de acordo com estudos prévios realizados em nosso laboratório (de Moura et al., 2013).

5.8 Anticorpos utilizados nos experimentos

Os anticorpos usados para imunoblot foram: Clusterina- α (goat, sc-6420) e secundário mouse anti-goat (sc-2354) da Santa Cruz Biotechnology; pIR β Y972 (rabbit, 07-838) da Milipore; pIRS1 Y612 (rabbit, NBP1-73967) e α -Tubulina (mouse, NB100690) da Novus

Biological; ERK (rabbit, AF1576) da Red Systems; IR (rabbit, #3025), IRS1 (rabbit, #2382s), pAKT S473 (rabbit, #4060), AKT (rabbit, #4685), pAS160 T642 (rabbit, #4288), AS160 (rabbit, #2447), pGSK3 β S9 (rabbit, #5558s), GSK3 β (rabbit, 5676), pERK1/2 T202/204 (rabbit, #4370) GAPDH (rabbit, #2118), secundário mouse anti-rabbit (#7074) and mouse anti-mouse (#7076) da Cell Signaling Technology. Solução de Ponceau S (6226-76-5, Sigma Aldrich) foi utilizado como marcador de conteúdo de proteínas totais. As bandas proteicas foram visualizadas com reagente de quimioluminescência aprimorado (ECL) e quantificadas com UN-SCAN-IT gel 6.1® software.

5.9 Quantificação dos níveis séricos de insulina de jejum

Os níveis de insulina séricas foram analisados utilizando um kit de ELISA ultrasensível para insulina de camundongos (#90080; Crystal Chem, Downers Grove, IL), amostras de sangue coletadas após 8 horas de jejum foram analisadas de acordo com o fabricante. Posteriormente, os valores HOMA-IR foram calculados (do inglês: Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance) como descrito previamente (Matthews et al., 1985).

5.10 Extração tecidual e quantificação do mRNA

Para análise do RNA mensageiro para CLU, RNA total foi isolado através utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, GrandIsland, NY, USA). Após isolar o RNA, a quantidade de 2 μ g de RNA total foi utilizada para síntese de cDNA, em acordo com as instruções do kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems). As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando 40 ng de cDNA, 1 μ L de primer e 5 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para tal, foram utilizados primers desenhados dos genes CLU (NM_013492.3) e GAPDH (NM_001289726.1), de acordo com a Tabela 2. Os parâmetros de ciclos foram: 10 min a 95 °C seguido por 40 ciclos de 15s a 95 °C, 30s a 60 °C e 30s a 72 °C. O conteúdo relativo de mRNA foi determinado após a normalização com GAPDH utilizando o método de $\Delta\Delta$ CT.

Tabela 2: Lista de primers dos genes de interesse.

GENE		PRIMER (5'>3')
CLU	Sense	GGGTGTACTTGAGCAGAGCG
	Antisense	TCCTTGGAATCTGGAGTCCGGT
GAPDH	Sense	TAAGAGGGATGCTGCCCTTAC
	Antisense	GTCTACGGGACGAGGAAACA

5.11 Análise estatística

Previamente todas as análises, a distribuição Gaussiana dos dados foi calculada através do teste de normalidade Shapiro-Wilk. O teste Anova one-way seguido de pós teste de múltipla comparação de Tukey foi aplicado para os valores de massa corporal, glicemia de jejum, área sob a curva do ipITT, qPCR em tempo real e resultados de quantificação de Western Blot. O teste Anova two-way (Grupo x Tempo) seguido de pós teste de múltipla comparação de Tukey foi aplicado para os valores da curva glicêmica durante o ipITT. A correlação de Pearson ou Spearman foram analisadas entre os níveis de CLU e o parâmetros antropométricos e bioquímicos. Todos os resultados foram apresentados como média±erro padrão da média (E.P.M.) e o nível de significância adotado foi de $p < 0.05$ para todas as análises. A análise estatística e a construção dos gráficos foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 8®.

6 RESULTADOS

6.1 Efeito do TCD aeróbio nos parâmetros antropométricos e fisiológicos em camundongos obesos

Após 14 semanas de indução à obesidade e resistência à insulina, os animais do grupo OBA iniciaram o TCD aeróbio em esteira. Após esse período, os dados antropométricos e fisiológicos foram avaliados, os animais dos grupos OBS e OBA apresentaram aumento na massa corporal quando comparados aos animais que foram alimentados com dieta padrão (CTS: 45 ± 2 vs OBS: 55 ± 1 vs OBA: 54 ± 3), quando analisados os grupos que foram submetidos a DHL, não foram encontradas diferenças quando comparadas ambas as massas corporais (Fig. 3. A). A DHL foi capaz de causar aumento de 552% nos níveis de insulina quando comparados os grupos CTS e OBS, sendo que o TCD foi capaz de melhorar esse quadro (CTS: $1,02 \pm 0,6$ vs OBS: $5,58 \pm 0,9$ vs OBA: $1,81 \pm 2,0$ ng/mL), uma redução de 68% em relação ao grupo OBS (Fig. 3. B).

O efeito da DHL em elevar os níveis de glicemia foi observado no grupo OBS com uma pequena redução no grupo OBA (CTS: 175 ± 6 vs OBS: 237 ± 13 vs OBA: 221 ± 29 mg/dL) que não foi estatisticamente significativo em relação a ambos os outros grupos experimentais CTS e OBS (Fig. 3. C). Entretanto, o HOMA-IR, um importante parâmetro de mensuração da sensibilidade à insulina, apresentou 74% de melhora pelo TCD no grupo OBA quando comparado ao grupo OBS (OBS: $3,4 \pm 0,3$ vs OBA: $0,9 \pm 0,5$; Fig. 3. D).

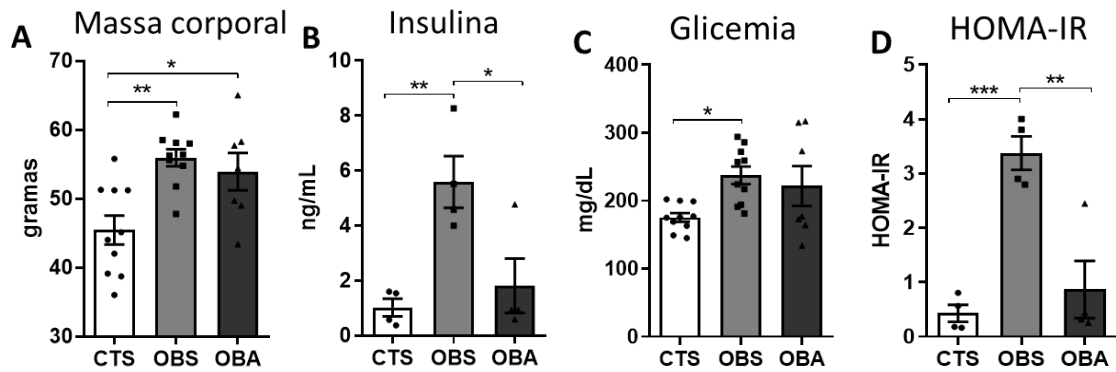


Figura 3: Parâmetros antropométricos e fisiológicos dos grupos experimentais durante ipITT. **A.** Massa corporal em gramas dos grupos experimentais; **B.** Insulina sérica de jejum em ng/mL dos grupos experimentais; **C.** Glicemia de jejum em mg/dL dos grupos experimentais; **D.** Valores de HOMA-IR dos grupos experimentais. Dados expressos em média±E.P.M.; *p<0,05; **p<0,01 e; ***p<0,001.

Ao final do período de treinamento, os animais foram submetidos ao ipITT. Durante o ipITT (Fig. 4.), o grupo OBS apresentou elevados níveis glicêmicos em todos os pontos da curva quando comparados ao grupo CTS, sendo que o TCD foi capaz de reverter essa diferença (Fig. 2. E). Ademais, o grupo OBS apresentou maior AUC, demonstrando que eles apresentavam um maior volume de glicose sanguínea durante o período do teste, apesar disso, não foram encontradas diferenças na captação de glicose por minuto, calculada através do kITT (Fig. 2. F and G). Importante enfatizar que tais melhoras estão relacionadas ao TCD pelo fato de que os animais dos grupos OBS e OBA não apresentaram diferenças significativas quanto a massa corporal.

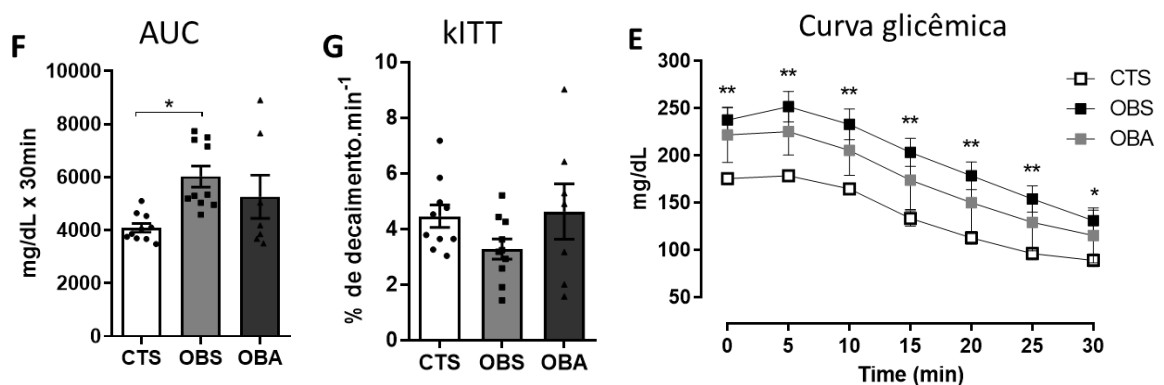


Figura 3: Parâmetros antropométricos e fisiológicos dos grupos experimentais durante ipITT. **A.** Massa corporal em gramas dos grupos experimentais; **B.** Insulina sérica de jejum em ng/mL dos grupos experimentais; **C.** Glicemia de jejum em mg/dL dos grupos experimentais; **D.** Valores de HOMA-IR dos grupos experimentais; **E.** Curva glicêmica em mg/dL durante o ipITT dos grupos experimentais; **F.** Área sob a curva da glicemia em mg/dLx30min durante ipITT dos grupos experimentais; **G.** Valores de decaimento da glicemia por minuto (kITT) em valores percentuais durante o ipITT dos grupos experimentais. Dados expressos em média±E.P.M.; *p<0,05; **p<0,01 and; ***p<0,001.

6.2 Efeito do TCD em esteira na sinalização da insulina e nos níveis proteicos e gênicos de CLU e seu receptor LRP2 em músculo esquelético dos animais submetidos ao protocolo experimental

Em seguida, as proteínas envolvidas na sinalização muscular da insulina foram avaliadas em resposta ao estímulo com insulina como mostrado na Figura 4. Também foram investigados a síntese de glicogênio através da fosforilação da proteína GSK3 β e ativação da via de sinalização da MAPK através da fosforilação da ERK1/2. Não foram observadas mudanças no grupo OBS em relação a fosforilação do resíduo tirosina 972 do receptor de insulina assim como no resíduo tirosina 612 de seu substrato IRS1, entretanto, o TCD foi capaz de aumentar a fosforilação de ambas as proteínas (Fig. 4. A and B). A fosforilação da proteína AKT apresentou uma diminuição de ~42% no grupo OBS em comparação ao grupo CTS, que foi restaurada pelo TCD em esteira, entretanto, do ponto de vista estatístico, esses valores não foram diferentes entre os grupos (Fig. 4. C). A fosforilação da proteína AS160, importante na translocação de vesículas contendo transportadores de glicose (GLUT-4) até a membrana plasmática para a captação de glicose sanguínea não apresentou diferenças estatística entre os grupos (Fig. 4. D). Um comportamento similar foi encontrado na fosforilação da proteína GSK3 β que não apresentou diferenças entre os grupos (Fig. 4. E). Apesar de apresentar uma diminuição de 46% em sua fosforilação quando comparado o grupo OBS ao CTS, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos experimentais (Fig. 4. F).

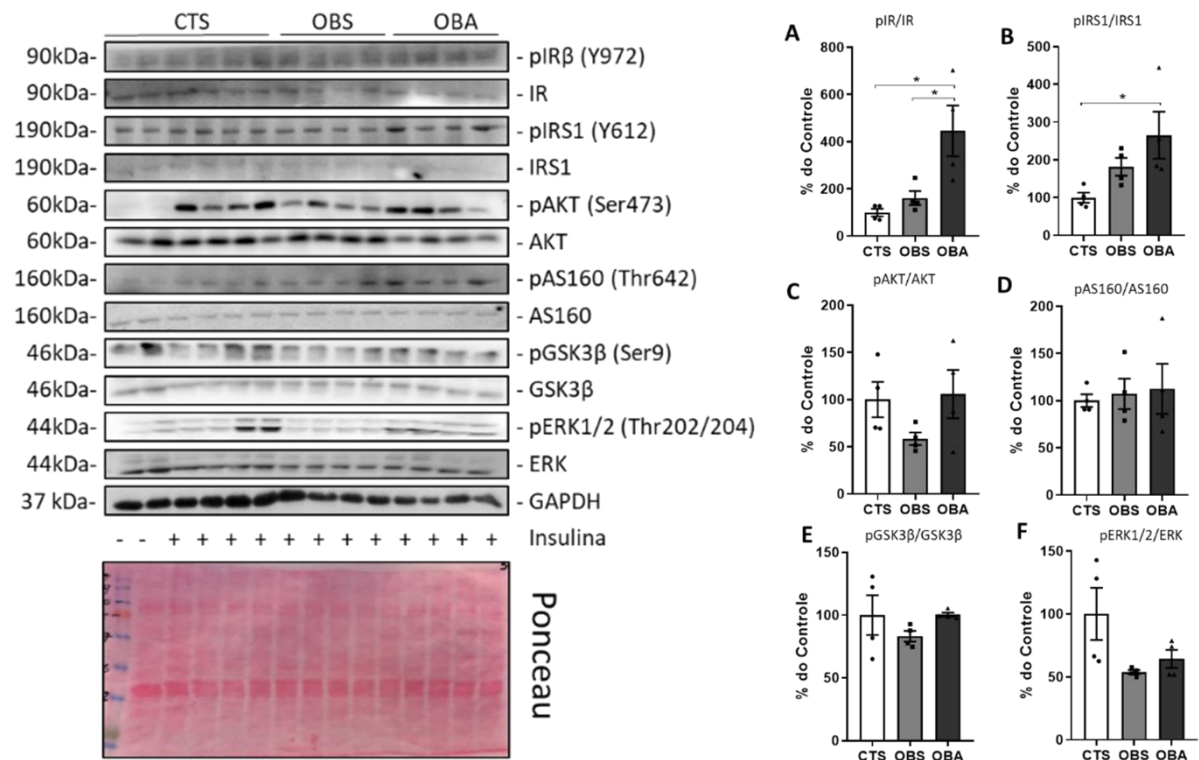


Figura 4: Quadro de fosforilação das proteínas relacionadas a sinalização da insulina, crescimento e sobrevivência celular em gastrocnêmio dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira. **A.** Fosforilação do receptor de insulina (pIR/IR) dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **B.** Fosforilação do substrato do receptor de insulina (pIRS1/IRS1) dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **C.** Fosforilação da proteína quinase B/AKT (pAKT/AKT) dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **D.** Fosforilação do substrato de AKT de 160kDa dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **E.** Fosforilação da proteína glicogênio sintase quinase dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **F.** Fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (pERK1/2/ERK) dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; Dados expressos em média±E.P.M. das unidades normalizadas e relativizadas pelo controle; * $p < 0,05$.

Os níveis proteicos de CLU muscular foram avaliados nos animais dos grupos experimentais com e sem estímulo de insulina como demonstrado na Figura 5. Quando estimulados com insulina, os níveis proteicos de CLU muscular foram 37% maiores no grupo OBS comparado ao grupo CTS, não obstante, o TCD em esteira foi capaz de reduzir os níveis de CLU no grupo OBA significativamente quando comparado ao grupo OBS (Fig. 5. A). Enquanto que no músculo esquelético dos animais sem estímulo com insulina não foram encontradas diferenças nos grupos CTS comparado ao grupo OBS, mostrando que não houve modulação dos níveis de CLU pela DHL, interessante, o TCD em esteira foi capaz de causar uma elevação considerável nos níveis de CLU em comparação a ambos os grupos CTS e OBS (Fig. 5. B).

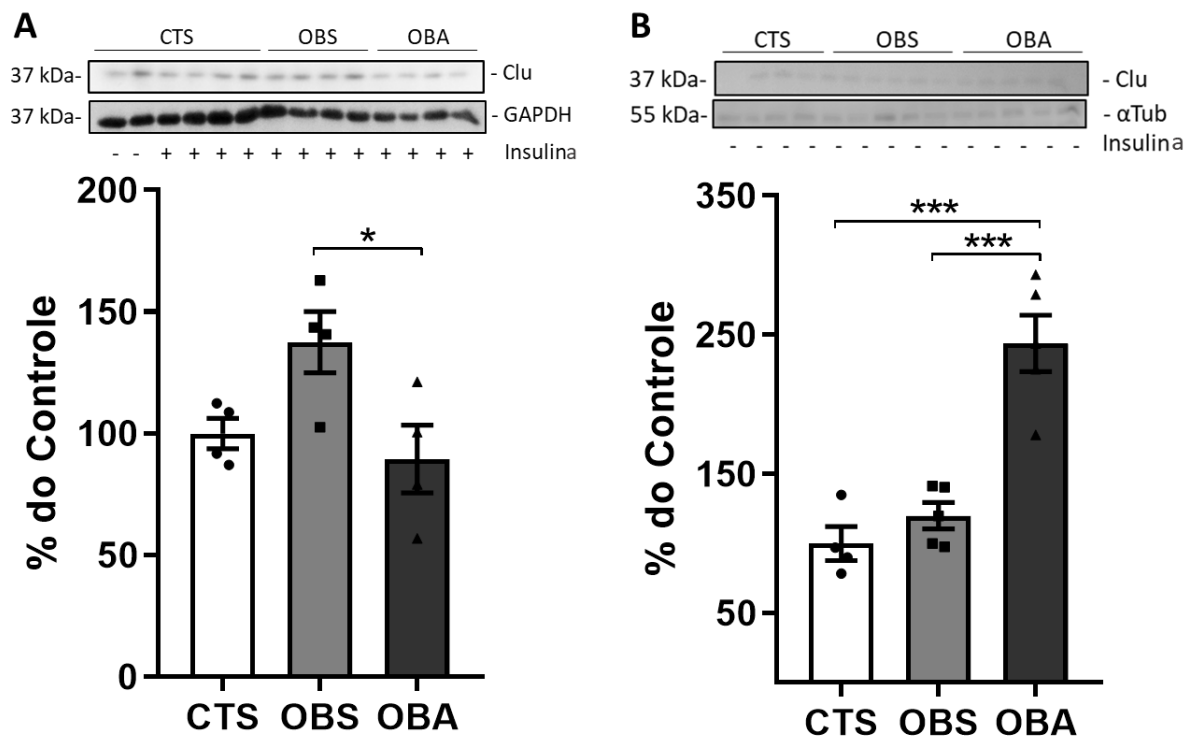


Figura 5: Efeito da insulina e do TCD no conteúdo proteico de CLU nos grupos experimentais. A. Níveis de CLU em músculo esquelético com estímulo de insulina dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **B.** Níveis de CLU em músculo esquelético sem estímulo de insulina dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. das unidades normalizadas e relativizadas pelo controle; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Adiante, os níveis de mRNA de CLU em músculo esquelético foram quantificados através da técnica de qPCR em tempo real nos animais sem estímulo com insulina. Similar aos dados de conteúdo proteico, os níveis de mRNA demonstraram que em músculo esquelético, a obesidade e resistência à insulina não foram capazes de alterar os níveis de mRNA de CLU, entretanto, o TCD foi capaz de elevar sua expressão em cerca de 2 vezes no músculo esquelético dos animais do grupo OBA (Fig. 6).

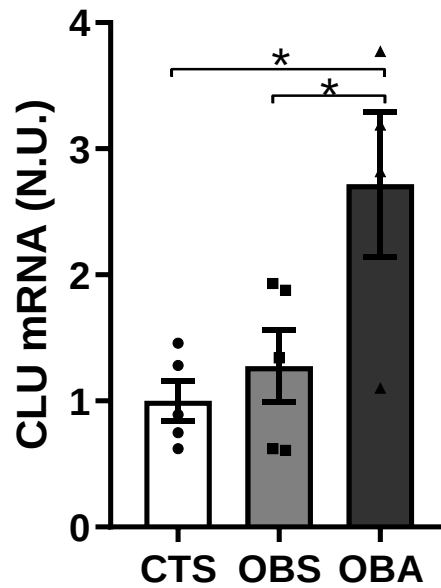


Figura 6: Expressão gênica de CLU em músculo esquelético dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira. Valores de mRNA de CLU em músculo esquelético sem estímulo de insulina dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; Dados expressos em média±E.P.M. das unidades normalizadas e relativizadas pelo controle; * $p < 0,05$.

6.3 Correlação entre conteúdo proteico de CLU muscular e parâmetros antropométricos e fisiológicos dos animais dos grupos experimentais

No intuito de avaliar se existe uma correlação entre os níveis de CLU e certos parâmetros, foi aplicado o teste de correlação de Pearson entre as variáveis. Para tal, os níveis proteicos de CLU muscular dos animais sem estímulo de insulina foram avaliados em conjunto com os parâmetros antropométricos e fisiológicos. Os dados demonstram que a proteína CLU apresenta uma tendência ($p=0,09$) em se correlacionar positiva e moderadamente com a massa corporal ($r=0,50$; Fig. 7. A). Em seguida, certos parâmetros fisiológicos como glicemia de jejum e insulinemia de jejum foram avaliados e apresentaram correlação positiva, moderada ($r=0,60$) e forte com a proteína CLU ($r=0,70$), respectivamente (Fig. 7. B e C). Finalmente, o índice HOMA-IR apresentou a correlação mais forte dentre os parâmetros antropométricos e fisiológicos, apresentando um valor de $r=0,72$ e $p=0,007$ (Fig. 7. D). No geral, o conteúdo proteico de CLU muscular se correlaciona positivamente com os parâmetros antropométricos e fisiológicos independente do tratamento nos animais dos grupos experimentais.

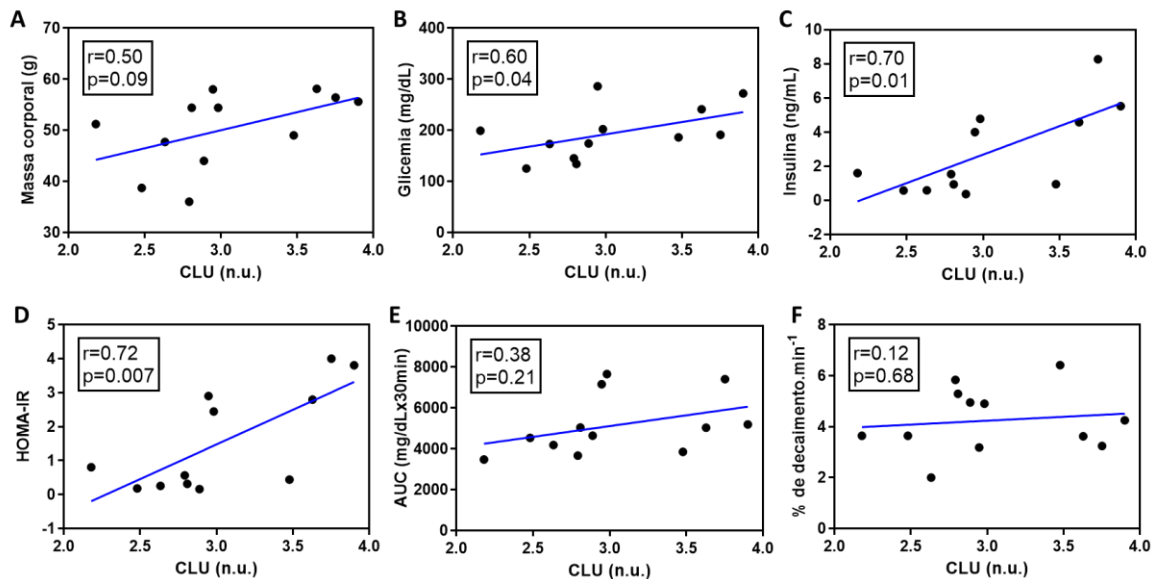


Figura 7: Gráficos de correlação entre os níveis proteicos de CLU muscular e parâmetros antropométricos e fisiológicos dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira. A. Massa corporal; B. Glicemia de jejum; C. Insulinemia de jejum e; D. HOMA-IR. Gráficos de correlação desenvolvidos a partir do teste de Pearson para os valores de “r” e “p”.

6.4 Efeito do TCD em escada nos parâmetros antropométricos e fisiológicos em camundongos obesos

Após 14 semanas de indução à obesidade e resistência à insulina, os animais do grupo OBF iniciaram o TCD. Ao final do período de treinamento, os animais foram submetidos ao ipITT (Figura 8). Os dados demonstram que os animais dos grupos OBS e OBF apresentaram aumento na massa corporal quando comparados aos animais que foram alimentados com dieta padrão (CTS: $36,6 \pm 1,7$ vs OBS: $55,2 \pm 3,3$ gramas), quando analisados os grupos que foram submetidos a DHL, a massa corporal de ambos os grupos se mostrou similar, não sofrendo alteração pelo TCD em escada (OBF: $53,6 \pm 1,0$ gramas; Fig. 8. A). A DHL foi capaz de elevar os níveis de insulina do grupo OBS quando comparado aos animais do grupo CTS (CTS: $0,45 \pm 0,1$ vs OBS: $2,87 \pm 0,1$ ng/mL), sendo que o TCD foi capaz de causar uma redução de 25% em relação ao grupo OBS (OBA: $2,1 \pm 0,6$ ng/mL, Fig. 8. B).

Após o período de indução a obesidade e resistência à insulina, os níveis glicêmicos nos animais do grupo OBS se elevaram significativamente em comparação ao grupo CTS (CTS: 158 ± 9 vs OBS: 270 ± 25 mg/dL), e em um curto período de tempo, o exercício de força em escada reduziu significativamente para níveis ligeiramente menores que os do grupo CTS (OBF: 150 ± 8 mg/dL, Fig. 8. C). Entretanto, apesar do índice HOMA-IR apresentar um

comportamento similar ao da insulina e da glicemia, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Fig. 8. D).

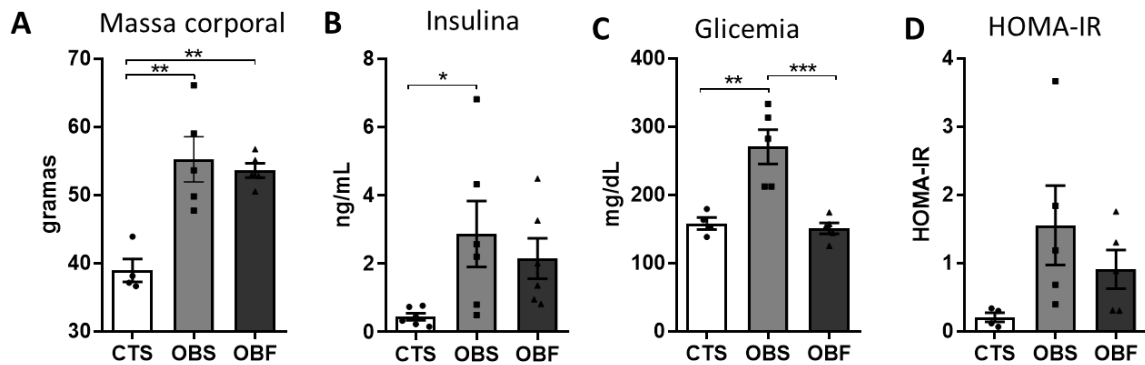


Figure 8: Parâmetros antropométricos e fisiológicos dos grupos experimentais durante ipITT. **A.** Massa corporal em gramas dos grupos experimentais; **B.** Insulinemia de jejum em ng/mL dos grupos experimentais; **C.** Glicemia de jejum em mg/dL dos grupos experimentais; **D.** Valores de HOMA-IR dos grupos experimentais; **E.** Curva glicêmica em mg/dL durante o ipITT dos grupos experimentais; **F.** Área sob a curva da glicemia em mg/dLx30min durante ipITT dos grupos experimentais; **G.** Valores de decaimento da glicemia por minuto (kITT) em valores percentuais durante o ipITT dos grupos experimentais. Dados expressos em média±E.P.M.; * $p<0,05$ vs CTS e OBF; ** $p<0,01$ vs CTS; *** $p<0,001$ vs CTS; # $p<0,05$ vs OBF; ## $p>0,01$ vs OBF.

Durante o ipITT, o grupo OBS apresentou elevados níveis glicêmicos em todos os pontos da curva quando comparados ao grupo CTS, sendo que o TCD em escada foi capaz de reverter essa diferença dos animais do grupo OBF, com os valores glicêmicos próximos aos do grupo CTS (Fig. 8. E). Ademais, o grupo OBS apresentou maior AUC, o que representa o volume de glicose sanguínea durante o período do teste (Fig. 8. F). Seguindo o mesmo padrão, a captação de glicose por minuto, calculada através do kITT apresentou piora de 58% nos valores dos animais do grupo OBS (CTS: $3,8 \pm 0,5$ vs OBS: $1,6 \pm 0,2$) e apesar do grupo OBF apresentar uma melhora de 62% desse parâmetro em comparação ao grupo OBS, os valores ainda se mostraram significativamente menores que os do grupo CTS em 32% (Fig. 8. G). Novamente, se faz importante enfatizar que pelo fato de não ter havido mudanças significativas na massa corporal desses animais, podemos considerar que essas melhoras são resultado do treinamento de curta duração em escada.

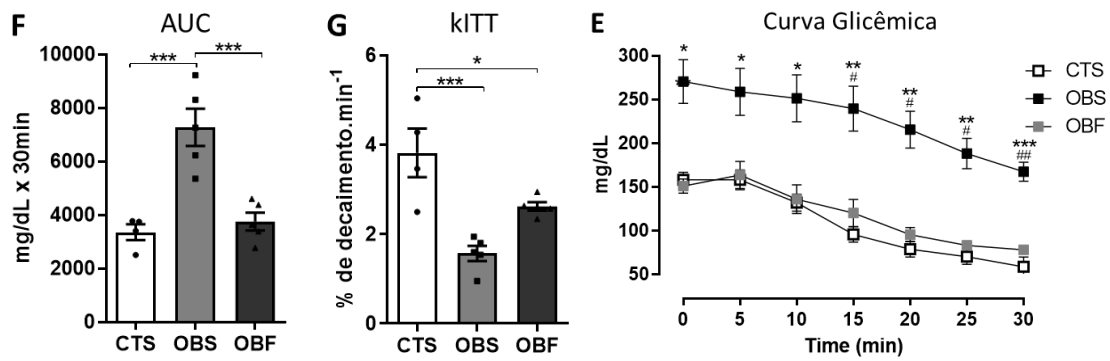


Figure 8: Parâmetros antropométricos e fisiológicos dos grupos experimentais durante ipITT. **A.** Massa corporal em gramas dos grupos experimentais; **B.** Insulinemia de jejum em ng/mL dos grupos experimentais; **C.** Glicemia de jejum em mg/dL dos grupos experimentais; **D.** Valores de HOMA-IR dos grupos experimentais; **E.** Curva glicêmica em mg/dL durante o ipITT dos grupos experimentais; **F.** Área sob a curva da glicemia em mg/dLx30min durante ipITT dos grupos experimentais; **G.** Valores de decaimento da glicemia por minuto (kITT) em valores percentuais durante o ipITT dos grupos experimentais. Dados expressos em média±E.P.M.; *p<0,05 vs CTS e OBF; **p<0,01 vs CTS; ***p<0,001 vs CTS; #p<0,05 vs OBF; ##p>0,01 vs OBF

6.5 Efeito do TCD em escada na sinalização da insulina e nos níveis proteicos e gênicos de CLU e seu receptor LRP2 em músculo esquelético dos animais submetidos ao protocolo experimental

Em seguida, as proteínas envolvidas na sinalização muscular da insulina foram avaliadas em resposta ao estímulo com insulina como mostrado na Figura 4. Também foram investigados a síntese de glicogênio através da fosforilação da proteína GSK3 β e ativação da via de sinalização da MAPK através da fosforilação da ERK1/2. Não foram observadas mudanças no grupo OBS em relação a fosforilação do resíduo tirosina 972 do receptor de insulina assim como no resíduo tirosina 612 de seu substrato IRS1, entretanto, o TCD foi capaz de aumentar a fosforilação de ambas as proteínas (Fig. 9. A and B). A fosforilação da proteína AKT apresentou uma diminuição de ~42% no grupo OBS em comparação ao grupo CTS, que foi restaurada pelo TCD em esteira, entretanto, do ponto de vista estatístico, esses valores não foram diferentes entre os grupos (Fig. 9. C). A fosforilação da proteína AS160, importante na translocação de vesículas contendo transportadores de glicose (GLUT-4) até a membrana plasmática para a captação de glicose sanguínea não apresentou diferenças estatística entre os grupos (Fig. 9. D). Um comportamento similar foi encontrado na fosforilação da proteína GSK3 β que não apresentou diferenças entre os grupos (Fig. 9. E). Apesar de apresentar uma diminuição de 46% em sua fosforilação quando comparado o grupo OBS ao CTS, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos experimentais (Fig. 9. F).

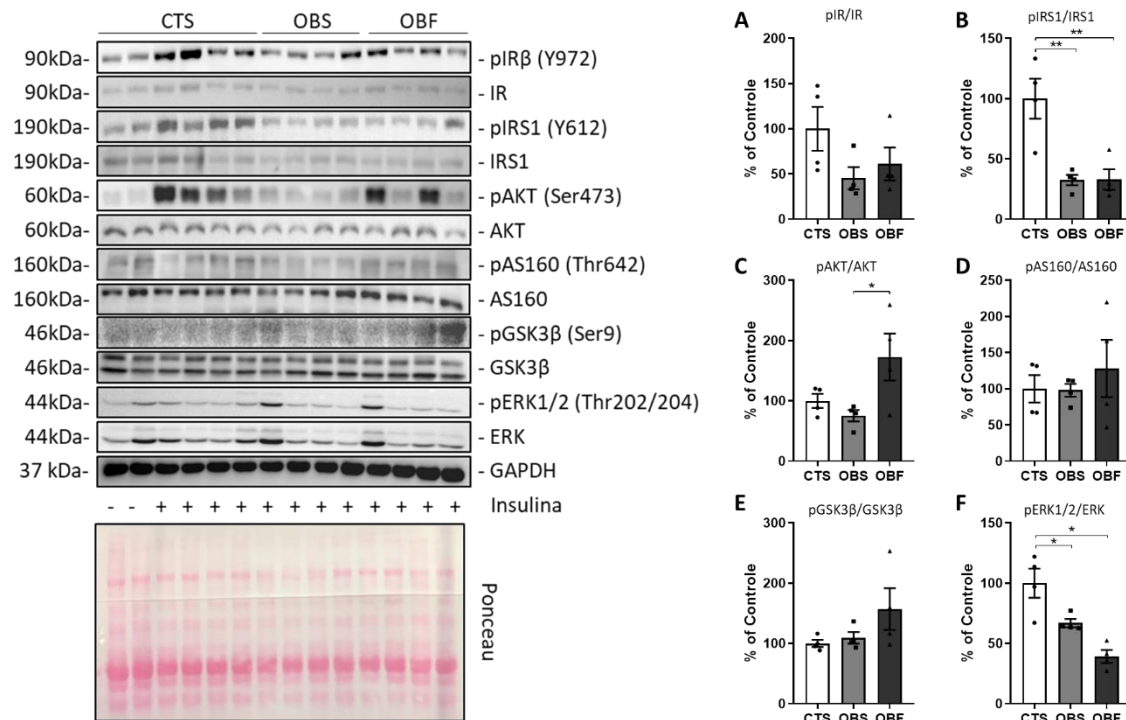


Figura 9: Quadro de fosforilação das proteínas relacionadas a sinalização da insulina, crescimento e sobrevivência celular em gastrocnêmio dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira. A. Fosforilação do receptor de insulina (pIR/IR) dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **B.** Fosforilação do substrato do receptor de insulina (pIRS1/IRS1) dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **C.** Fosforilação da proteína quinase B/AKT (pAKT/AKT) dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **D.** Fosforilação do substrato de AKT de 160kDa dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **E.** Fosforilação da proteína glicogênio sintase quinase dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **F.** Fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (pERK1/2/ERK) dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; Dados expressos em média±E.P.M. das unidades normalizadas e relativizadas pelo controle; *p<0,05.

6.6 Efeito do TCD em escada na sinalização da insulina e nos níveis proteicos e gênicos de CLU e seu receptor LRP2 em músculo esquelético dos animais submetidos ao protocolo experimental

Os níveis proteicos de CLU, bem como de seu receptor LRP2 musculares foram avaliados nos animais dos grupos experimentais com e sem estímulo de insulina como demonstrado na Figura 9. Os níveis de CLU não foram diferentes entre os grupos experimentais tanto em função da DHL quanto em músculo dos animais obesos submetidos ao TCD em escada (Fig. 9. A). Entretanto, apesar de a DHL não gerar modulação na expressão de LRP2 muscular, o exercício físico foi capaz de gerar um aumento significativo em sua expressão quando

comparado com o grupo CTS e gerar uma tendência ($p=0,0979$) de aumento quando comparados aos animais do grupo OBS (Fig. 9. B).

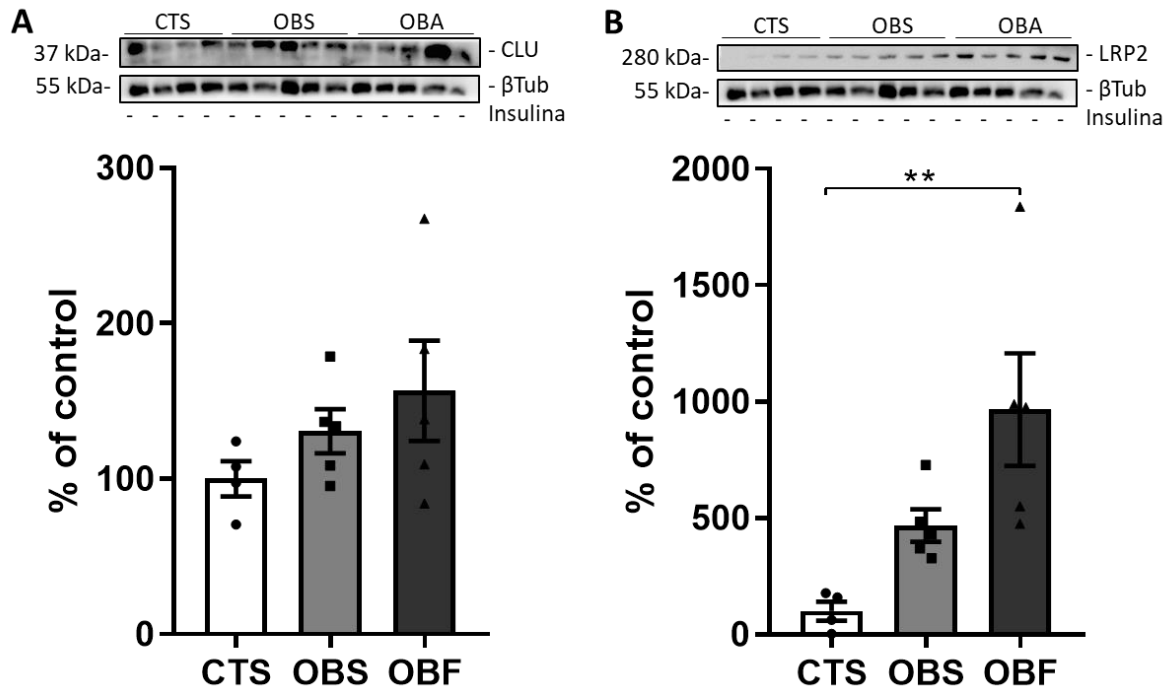


Figura 9: Efeito do TCD em escada no conteúdo proteico de CLU e seu receptor LRP2 nos grupos experimentais. A. Níveis de CLU em músculo esquelético sem estímulo de insulina dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **B.** Níveis de LRP2 em músculo esquelético sem estímulo de insulina dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. das unidades normalizadas e relativizadas pelo controle. ** $p < 0,01$.

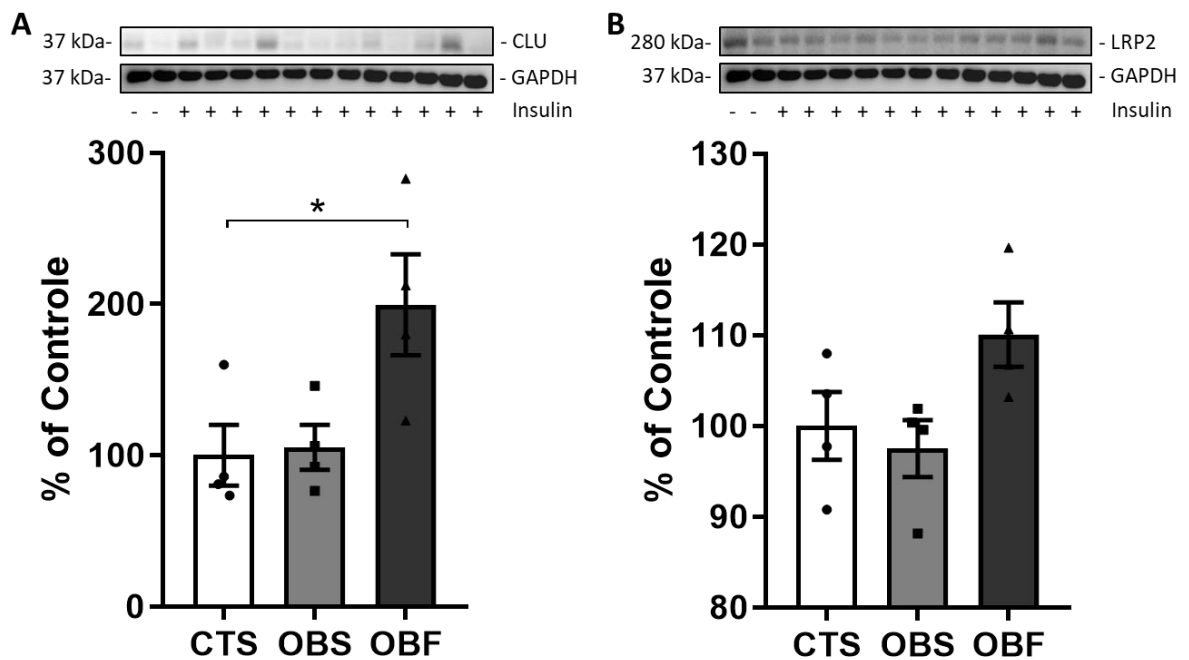


Figura 10: Efeito do TCD em escada no conteúdo proteico de CLU e seu receptor LRP2 nos grupos experimentais. A. Níveis de CLU em músculo esquelético sem estímulo de

insulina dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; **B.** Níveis de LRP2 em músculo esquelético sem estímulo de insulina dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira; Dados expressos em média±E.P.M. das unidades normalizadas e relativizadas pelo controle. ** $p<0,01$.

Durante a análise de expressão gênica da CLU em tecido muscular desenvolvida através de qPCR em tempo real nos animais sem estímulo de insulina, não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais, tanto nos animais submetidos a DHL, quanto no grupo submetido ao TCD em escada (Fig. 11).

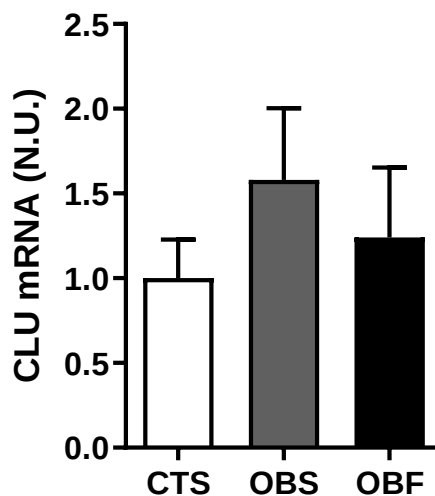


Figure 11: Expressão gênica de CLU em músculo esquelético dos grupos experimentais submetidos ao exercício em escada. Expressão gênica de CLU em músculo esquelético sem estímulo de insulina dos grupos experimentais submetidos ao exercício em escada; Dados expressos em média±E.P.M. das unidades normalizadas e relativizadas pelo controle.

6.7 Correlação entre conteúdo proteico de CLU muscular e parâmetros antropométricos e fisiológicos dos animais dos grupos experimentais

No intuito de avaliar se existe uma correlação entre os níveis de CLU e certos parâmetros, foi aplicado o teste de correlação de Pearson entre as variáveis. Para tal, os níveis proteicos de CLU muscular dos animais sem estímulo de insulina foram avaliados em conjunto com os parâmetros antropométricos e fisiológicos. Os dados demonstram que a proteína CLU apresenta uma tendência ($p=0,09$) em se correlacionar positiva e moderadamente com a massa corporal ($r=0,50$; Fig. 12. A). Em seguida, certos parâmetros fisiológicos como glicemia de jejum e insulinemia de jejum foram avaliados e apresentaram correlação positiva, moderada ($r=0,60$) e forte com a proteína CLU ($r=0,70$), respectivamente (Fig. 12. B e C). Finalmente, o

índice HOMA-IR apresentou a correlação mais forte dentre os parâmetros antropométricos e fisiológicos, apresentando um valor de $r=0,72$ e $p=0,007$ (Fig. 12. D). No geral, o conteúdo proteico de CLU muscular se correlaciona positivamente com os parâmetros antropométricos e fisiológicos independente do tratamento nos animais dos grupos experimentais.

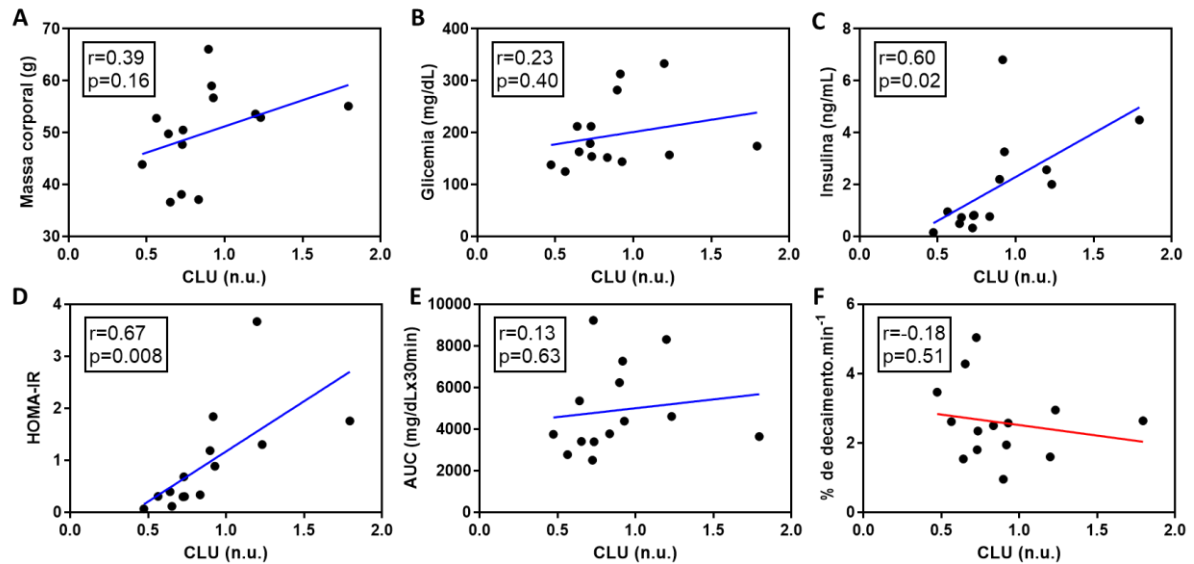


Figura 12: Gráficos de correlação entre os níveis proteicos de CLU muscular e parâmetros antropométricos e fisiológicos dos grupos experimentais submetidos ao exercício em esteira. **A.** Massa corporal; **B.** Glicemia de jejum; **C.** Insulinemia de jejum e; **D.** HOMA-IR. Gráficos de correlação desenvolvidos a partir do teste de Pearson para os valores de “r” e “p”.

7 RESUMO DOS RESULTADOS

	Aeróbio			Resistido		
Fisiológicos	OBS vs CTS	OBA vs CTS	OBA vs OBS	OBS vs CTS	OBF vs CTS	OBF vs OBS
Massa corporal	↑↑ (+22%)	↑ (+20%)	↔ (-2%)	↑↑ (+50%)	↑↑ (+46%)	↔ (-3%)
Insulina	↑↑ (+452%)	↔ (+76%)	↓ (-68%)	↑ (+537%)	↔ (+366%)	↔ (-25%)
Glicemia	↑ (+35%)	↔ (+26%)	↔ (-7%)	↑↑ (+70%)	↔ (-6%)	↓↓↓ (-45%)
HOMA-IR	↑↑↑ (+802%)	↔ (+104%)	↓↓ (-74%)	↔ (+675%)	↔ (+350%)	↔ (-42%)
Curva glicêmica (ipTTI)	↑↑	↔	↔	↑↑	↔	↓↓
AUC	↑ (+47%)	↔ (+28%)	↔ (-13%)	↑↑↑ (+116%)	↔ (+11%)	↓↓↓ (-49%)
kITT	↔ (-27%)	↔ (+3%)	↔ (+34%)	↓↓↓ (-60%)	↓ (-32%)	↔ (+66%)
Moleculares						
CLU (- ins)	↔ (+20%)	↑↑↑ (+144%)	↑↑↑ (+104%)	↔ (+30%)	↔ (+56%)	↔ (+20%)
LRP2 (- ins)	↔ (26%)	↔ (26%)	↔ (0%)	↑ (+493%)	↑↑ (+865%)	↔ (+106%)
CLU (+ ins)	↔ (+37%)	↔ (-11%)	↓ (-35%)	↔ (+5%)	↑ (+99%)	↔ (+89%)
LRP2 (+ ins)	↓ (-65%)	↓ (-47%)	↔ (48%)	↔ (-3%)	↔ (+10%)	↔ (+13%)
pIR	↔ (+61%)	↑ (+345%)	↑ (+176%)	↔ (-55%)	↔ (-38%)	↔ (+35%)
pIRS1	↔ (+81%)	↑ (+165%)	↔ (+46%)	↓ (-68%)	↓ (-67%)	↔ (+1%)
pAKT	↔ (-42%)	↔ (+5%)	↔ (+81%)	↔ (-25%)	↔ (+72%)	↑ (+129%)
pAS160	↔ (+7%)	↔ (+12%)	↔ (+4%)	↔ (-2%)	↔ (+28%)	↔ (+30%)
pGSK3β	↔ (-47%)	↔ (+36%)	↔ (+20%)	↔ (+9%)	↔ (+57%)	↔ (+44%)
pERK1/2	↔ (-17%)	↔ (+0,3%)	↔ (+20%)	↓ (-33%)	↓ (-61%)	↔ (-41%)
Gênicos						
CLU	↔ (+27%)	↑ (+172%)	↑ (+114%)	↔ (+58%)	↔ (+24%)	↔ (-22%)

8 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, foi demonstrado que 14 semanas de DHL foram suficientes para induzir obesidade e quadro de resistência à insulina (Fig. 3 e 8). Ademais, nosso trabalho foi o primeiro a mostrar os níveis proteicos de CLU, bem como sua expressão gênica, tanto em tecido muscular, quanto sobre o efeito do exercício físico nesse parâmetro. Trabalhos prévios demonstraram que a proteína CLU apresenta-se elevada em soro de animais e humanos com obesidade (Bradley et al., 2019; Daimon et al., 2011; Hoofnagle et al., 2010; Kujiraoka et al., 2006; Kwon et al., 2014; Oberbach et al., 2011; Seo et al., 2018; Won et al., 2014), entretanto, em músculo esquelético esse comportamento não foi encontrado (Fig. 4-B; 6; 9 e 10). Contudo, nos animais submetidos ao protocolo de TCD em esteira, a proteína CLU foi positivamente correlacionada com diversos parâmetros relacionados ao quadro de resistência à insulina, como obesidade, glicemia de jejum, insulinemia de jejum e índice HOMA-IR. Ademais, sob estímulo com insulina, os níveis de insulina tendem a se elevar ($p=0,10$) em animais obesos comparados ao grupo CTS, sendo que o TCD em esteira foi capaz de prevenir esse aumento. Dados prévios demonstraram que o exercício físico tem a capacidade de melhorar a sinalização da insulina e reduzir a inflamação em tecido muscular esquelético, principalmente via ativação das proteínas AMPK, PGC1- α , PPAR, assim como através da sinalização das interleucinas IL-6 e IL-10 (Egan & Zierath, 2013; Fan & Evans, 2017; Fujii, Jessen, & Goodyear, 2006; Liu, Niu, Yuan, Huang, & Fu, 2015; Pereira et al., 2017; Stanford & Goodyear, 2014). Além disso, a proteína CLU vem sendo relacionada como sensível a diferentes tipos de fatores estressores como aqueles relacionados a inflamação (Bradley et al., 2019; Kwon et al., 2014) e ao estresse oxidativo (Bradley et al., 2019; Jun et al., 2011; Trougakos, 2013).

Em seguida, sabe-se que a CLU tem a capacidade de ativar a via de sinalização PI3K/AKT em diferentes linhagens de célula e tecidos, não somente participando da via de sobrevivência celular como também para a captação de glicose (Ammar & Closset, 2008; Jun et al., 2011; Ma & Bai, 2012; Rohne, Prochnow, & Koch-Brandt, 2016; Y.-J. Shim et al., 2011). Levando isso em consideração, os níveis de CLU musculares podem estar elevados nos animais obesos estimulados com insulina, no sentido de colaborar positivamente para a prejudicada sensibilidade à insulina nesse modelo. Levando em consideração que a insulina é um hormônio de crescimento, que está envolvido com o crescimento e sobrevivência celular, e que a proteína CLU, por ser uma molécula induzida por estresse, é provável que ela possa participar do processo de remoção de resíduos, carregando-os para os lisossomos para que possam ser

degradados e usados como substrato na melhora na função muscular, como resposta adaptativa ao exercício físico. Ademais, já foi demonstrado na literatura que a CLU é capaz de ativar a matriz metallopeptidase 9 (MMP-9) em macrófagos (Y.-J. Shim et al., 2011; Young-Jun Shim et al., 2016), participando com a degradação de colágeno, complementando, dados recentes mostraram que a cadeia α da proteína CLU tem a capacidade de migrar para o lisossomo da célula aumentando a degradação de moléculas por essa organela em células C2C12 (Matukumalli, Tangirala, & Rao, 2017).

Como uma chaperona extracelular, existe a possibilidade de que a proteína CLU esteja participando da remoção de detritos celulares, elevados após um treinamento de curta duração, e esteja participando da regeneração tecidual e autofagia relacionadas ao exercício físico (Lenhare et al., 2017; Liu et al., 2015). Assim, participando da regeneração tecidual gerada pelo dano causado pelo TCD e levando nutrientes do espaço extracelular para o lisossomo no citosol do miócito. Sendo assim, a localização da proteína CLU é importante, visto que sua ação positiva na sinalização da insulina é dependente de seu receptor, localizado na membrana plasmática, e que outras localizações, como as próximas ao núcleo podem ser relacionadas com mecanismos pró-apoptóticos. A relação da proteína CLU e seu receptor LRP2 pode estar envolvida na endocitose não somente dos detritos extracelulares (Matukumalli et al., 2017), como também do receptor de insulina em si, tanto para sua degradação (Nephrol, Orlando, Posner, Bergeron, & Farquhar, 1998), quanto para que ele se transloque ao núcleo como fator de transcrição e participe da expressão de genes relacionados (Amaya et al., 2014; Hancock et al., 2019).

Sabe-se que a proteína CLU possui diferentes estruturas, dependendo de processos como o splicing alternativo e pode sofrer modificações pós-transcricionais moduladas por certos processos, como o estresse oxidativo, levando a alterações em seus níveis de glicosilação e modificando sua atividade como chaperona (Rohne, Prochnow, Wolf, Renner, & Koch-Brandt, 2014). Além disso, diferentes pontos de glicosilação, dependendo de qual de suas cadeias, α ou β , podem alterar sua função, como demonstrado na progressão de doenças com a de Alzheimer (Liang et al., 2015). Finalizando, outros estressores, como diferentes concentrações de cálcio podem levar a retro translocação da forma secretada da proteína CLU para o citosol da célula e para o sistema ERAD (Nizard et al., 2007), o que demonstra que a proteína CLU participa de diversas funções e é modulada por variados processos biológicos.

9 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos até o momento, concluímos que proteína CLU aparenta se modulada pelo exercício mas não pela obesidade em músculo esquelético de animais obesos. O treinamento físico de curta duração tem a capacidade de modular sua expressão proteica e gênica, dependendo do tipo de exercício físico. Pelas suas participações em diversos processos biológicos e funções celulares, a proteína CLU merece maiores investigações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaya, M. J., Oliveira, A. G., Guimarães, E. S., Casteluber, M. C. F., Carvalho, S. M., Andrade, L. M., ... Leite, M. F. (2014). The insulin receptor translocates to the nucleus to regulate cell proliferation in liver. *Hepatology*, 59(1), 274–283. <https://doi.org/10.1002/hep.26609>
- Ammar, H., & Closset, J. L. (2008). Clusterin Activates Survival through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12851–12861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800403200>
- Aronson, D., Fielding, R. A., & Goodyear, L. J. (1997). Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *The Journal of Clinical investigation*, 99(6), 1251–1257.
- Berger, B. M., Hagg, S., & Ruderman, N. B. (1975). Glucose Metabolism in Perfused Skeletal Muscle. *The Biochemical journal*, 146(2), 231–238.
- Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C. E., & Pasinetti, G. M. (1995). Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Molecular Brain Research*, 33(1), 174–178. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00097-C](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00097-C)
- Bonora, E., Moghetti, P., Zancanaro, C., Cigolini, M., Querena, M., Cacciatori, V., ... Muggeo, M. (1989). Estimates of in vivo insulin action in man: Comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 68(2), 374–378. <https://doi.org/10.1210/jcem-68-2-374>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
- Bradley, D., Blaszcak, A., Yin, Z., Liu, J., Joseph, J. J., Wright, V., ... Hsueh, W. A. (2019). Clusterin impairs hepatic insulin sensitivity and adipocyte clusterin associates with cardiometabolic risk. *Diabetes Care*, 42(3), 466–475. <https://doi.org/10.2337/dc18-0870>
- Byun, K., Gil, S. Y., Namkoong, C., Youn, B., Huang, H., Shin, M., ... Kim, M. (2014). Clusterin / ApoJ enhances central leptin signaling through Lrp 2-mediated endocytosis. *EMBO Reports*, 15(7), 801–808.

- Cassilhas, R. C., Reis, I. T., Venâncio, D., Fernandes, J., Tufik, S., & De Mello, M. T. (2013). Animal model for progressive resistance exercise: A detailed description of model and its implications for basic research in exercise. *Motriz. Revista de Educacao Fisica*, 19(1), 178–184. <https://doi.org/10.1590/S1980-65742013000100018>
- Chibalin, A. V., Yu, M., Ryder, J. W., Song, X. M., Galuska, D., Krook, A., ... Zierath, J. R. (1999). Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle : Differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. *Pnas*, 97(1), 38–43.
- Colberg, S. R., Sigal, R. J., Fernhall, B., Regensteiner, J. G., Blissmer, B., R. R. Rubin, ... Braun, B. (2010). Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33(12), e147-67. <https://doi.org/10.2337/dc10-9990>
- Daimon, M., Oizumi, T., Karasawa, S., Kaino, W., Takase, K., Tada, K., ... Kato, T. (2011). Association of the clusterin gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 60(6), 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.07.033>
- de Moura, L. P., Souza Pauli, L. S., Cintra, D. E., de Souza, C. T., da Silva, A. S. R., Marinho, R., ... Pauli, J. R. (2013). Acute exercise decreases PTP-1B protein level and improves insulin signaling in the liver of old rats. *Immunity & ageing: I & A*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-8>
- de Silva, H. V., Harmony, J. a, Stuart, W. D., Gil, C. M., & Robbins, J. (1990). Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry*, 29(22), 5380–5389. <https://doi.org/10.1021/bi00474a025>
- Egan, B., & Zierath, J. R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*, 17(2), 162–184. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>
- Fan, W., & Evans, R. M. (2017). Exercise Mimetics: Impact on Health and Performance. *Cell Metabolism*, 25(2), 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.022>
- Ferreira, J. C. B., Rolim, N. P. L., Bartholomeu, J. B., Gobatto, C. A., Kokubun, E., & Brum, P. C. (2007). Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(8), 760–765.

<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x>

- Frøsig, C., Pehmøller, C., Birk, J. B., Richter, E. A., Jørgen, F. P., Abbott, M. J., ... Wojtaszewski, J. F. P. (1997). Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 273, E1039-51.
- Fujii, N., Jessen, N., & Goodyear, L. J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 291(5), E867–E877. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00207.2006>
- Gil, S. Y., Youn, B.-S., Byun, K., Huang, H., Namkoong, C., Jang, P., ... Kim, M. (2013). Clusterin and LRP2 are critical components of the hypothalamic feeding regulatory pathway. *Nature Communications*, 4(May), 1862–1869. <https://doi.org/10.1038/ncomms2896>
- Glasheen, E. M., Backer, J. M., White, M. F., & Dk-, G. (2015). IRS-1 Is a Common Element in Insulin and Insulin-Like Growth Factor-I Signaling. *Endocrinology*, 132(4), 1992.
- Goodyear, Laurie J, Giorgino, F., Sherman, L. A., Carey, J., Smith, R. J., Dohm, G. L., & Carolina, N. (1995). Insulin Receptor Phosphorylation , Insulin Receptor Substrate-1 Phosphorylation , and Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity Are Decreased in Intact Skeletal Muscle Strips from Obese Subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 95(May), 2195–2204.
- Goodyear, L. J., Hirshman, M. F., & Horton, E. S. (1991). Exercise-induced translocation of skeletal muscle glucose transporters. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 261(6), e795-799.
- Hancock, M. L., Meyer, R. C., Mistry, M., Khetani, R. S., Wagschal, A., Shin, T., ... Flanagan, J. G. (2019). Insulin Receptor Associates with Promoters Genome-wide and Regulates Gene Expression. *Cell*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.030>
- Hellenius, M. B., Berglund, E. B. S. B. O. H., & Faire, U. L. F. H. D. E. (1995). Effects on glucose tolerance , insulin secretion , insulin-like growth factor 1 and its binding protein , IGFBP-1 , in a randomized controlled diet and exercise study in healthy , middle-aged men. *Journal of intern*, 238, 121–130.
- Hjalm, G., I, E. M., I, G. C., I, W. H., Lundgren, S., Onyango, I., ... Morse, B. (1996). Cloning and sequencing of human gp330 , a Ca²⁺ -binding receptor with potential intracellular signaling properties. *European journal of biochemistry*, 239, 132–137.

- Holloszy, J. O., & Booth, F. W. (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annual review of physiology*, 38, 273–291.
- Hoofnagle, A. N., Wu, M., Gosmanova, A. K., Becker, J. O., Wijsman, E. M., Brunzell, J. D., ... Heinecke, J. W. (2010). Low clusterin levels in high-density lipoprotein associate with insulin resistance, obesity, and dyslipoproteinemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(12), 2528–2534. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.212894>
- Hornberger, T. A., & Farrar, R. P. (2004). Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. *Canadian journal of applied physiology*, 29(1), 16–31. <https://doi.org/10.1139/h04-002>
- Hossain, P., Kavar, B., & El Nahas, M. (2007). Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. *New England Journal of Medicine*, 356(3), 213–215. <https://doi.org/10.1056/NEJMp068177>
- Jenne, D. E., Lowin, B., Peitsch, M. C., Bottchers, A., & Schmitzg, G. (1991). Clusterin (Complement Lysis Inhibitor) Forms a High Density Lipoprotein Complex with Apolipoprotein A-I in Human Plasma *. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(17), 11030–11036.
- Jun, H. O., Kim, D. hun, Lee, S. W., Lee, H. S., Seo, J. H., Kim, J. H., ... Kim, K. W. (2011). Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Experimental and Molecular Medicine*, 43(1), 53–61. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.1.006>
- Kounnas, M. Z., Loukinova, E. B., Stefansson, S., Harmony, J. A. K., Brewer, B. H., Strickland, D. K., & Argraves, W. S. (1995). Identification of Glycoprotein 330 as an Endocytic Receptor for Apolipoprotein J/Clusterin. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13070–13075.
- Kujiraoka, T., Hattori, H., Miwa, Y., Ishihara, M., Ueno, T., Ishii, J., ... Egashira, T. (2006). Serum apolipoprotein j in health, coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 13, 314–322. <https://doi.org/10.5551/jat.13.314>
- Kwon, M. J., Ju, T. J., Heo, J. Y., Kim, Y. W., Kim, J. Y., Won, K. C., ... Park, S. Y. (2014).

- Deficiency of clusterin exacerbates high-fat diet-induced insulin resistance in male mice. *Endocrinology*, 155(6), 2089–2101. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1870>
- Lenhare, L., Crisol, B. M., Silva, V. R. R., Katashima, C. K., Cordeiro, A. V., Pereira, K. D., ... Ropelle, E. R. (2017). Physical exercise increases Sestrin 2 protein levels and induces autophagy in the skeletal muscle of old mice. *Experimental Gerontology*, 97, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.07.009>
- Liang, H. C., Russell, C., Mitra, V., Chung, R., Hye, A., Bazenet, C., ... Ward, M. (2015). Glycosylation of Human Plasma Clusterin Yields a Novel Candidate Biomarker of Alzheimer's Disease. *Journal of Proteome Research*, 14(12), 5063–5076. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00892>
- Liu, X., Niu, Y., Yuan, H., Huang, J., & Fu, L. (2015). AMPK binds to Sestrins and mediates the effect of exercise to increase insulin-sensitivity through autophagy. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 64(6), 658–665. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.01.015>
- Luciano, E., Carneiro, E. M., Carvalho, C. R. O., Carvalheira, J. B. C., Peres, S. B., Reis, M. a B., ... Velloso, L. a. (2002). Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *European Journal of Endocrinology*, 147(1), 149–157. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1470149>
- Lumeng, C. N., & Saltiel, A. R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *Life Sciences*, 121(6), 2111–2117. <https://doi.org/10.1172/JCI57132>.In
- Ma, X., & Bai, Y. (2012). IGF-1 activates the P13K/AKT signaling pathway via upregulation of secretory clusterin. *Molecular Medicine Reports*, 6(6), 1433–1437. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1110>
- Masters, R. K., Reither, E. N., Powers, D. A., Yang, Y. C., Burger, A. E., & Link, B. G. (2013). The Impact of Obesity on US Mortality Levels : The Importance of Age and Cohort Factors in Population Estimates. *American Journal of Public Health*, 103(10), 1895–1901. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2013.301379>
- Matthews, D. R., Hosker, J. R., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., Turner, R. C., & Infirmary, R. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28,

412–419.

- Matukumalli, S. R., Tangirala, R., & Rao, C. M. (2017). Clusterin : full-length protein and one of its chains show opposing effects on cellular lipid accumulation. *Nature Publishing Group*, (June 2016), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep41235>
- Mclaughlin, L., Zhu, G., Mistry, M., Ley-ebert, C., Stuart, W. D., Florio, C. J., ... Aronow, B. J. (2000). Apolipoprotein J / clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis, *106*(9), 1105–1113.
- Murphy, B. F., Kirszbaum, L., Walker, I. D., & d'Apice, J. F. (1988). Sp-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *Journal of Clinical Investigation*, *81*(6), 1858–1864. <https://doi.org/10.1172/JCI113531>
- Myers, M. G., Wang, L., Sun, X. J., Zhang, Y., Yenush, L., Schlessinger, J., ... White, M. F. (1994). Role of IRS-1-GRB-2 Complexes in Insulin Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(6), 3577–3587.
- Nephrol, J. A. S., Orlando, A., Posner, I., Bergeron, J. J. M., & Farquhar, G. (1998). Megalin Is an Endocytic Receptor for Insulin. *Journal of American Society of Nephrology*, *9*, 1759–1766.
- Nizard, P., Tetley, S., Le Dréan, Y., Watrin, T., Le Goff, P., Wilson, M. R., & Michel, D. (2007). Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol. *Traffic*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00549.x>
- Oberbach, A., Blüher, M., Wirth, H., Till, H., Kovacs, P., Kullnick, Y., ... Bergen, M. Von. (2011). Combined proteomic and metabolomic profiling of serum reveals association of the complement system with obesity and identifies novel markers of body fat mass changes. *Journal of Proteome Research*, *10*(10), 4769–4788. <https://doi.org/10.1021/pr2005555>
- Oliveira, N. R. C., Marques, S. O., Luciano, T. F., Pauli, J. R., Moura, L. P., Caperuto, E., ... Souza, C. T. De. (2014). Treadmill Training Increases SIRT-1 and PGC-1 ? Protein Levels and AMPK Phosphorylation in Quadriceps of Middle-Aged Rats in an Intensity-Dependent Manner. *Mediators of Inflammation*, *2014*, 1–12. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2014/987017>
- Pagel-langenickel, I., Bao, J., Pang, L., & Sack, M. N. (2010). The Role of Mitochondria in the

- Pathophysiology of Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Endocrine Reviews*, 31(1), 25–51. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0003>
- Patti, M. E., & Corvera, S. (2010). The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 31(3), 364–395. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0027>
- Pauli, L. S., Ropelle, E. C. C., de Souza, C. T., Cintra, D. E., da Silva, A. S., Rodrigues, B. a, ... Ropelle, E. R. (2014). Exercise training decreases MAPK phosphatase-3 expression and suppresses hepatic gluconeogenesis in obese mice. *The Journal of physiology*, 6, 1325–1340. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264002>
- Pereira, R. M., De Moura, L. P., Muñoz, V. R., Da Silva, A. S. R., Gaspar, R. S., Ropelle, E. R., & Pauli, J. R. (2017). Molecular mechanisms of glucose uptake in skeletal muscle at rest and in response to exercise. *Motriz. Revista de Educacao Fisica*, 23, 1–8. <https://doi.org/10.1590/S1980-6574201700SI0004>
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition*, 123(11), 1939–1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- Rizzi, F., Caccamo, A. E., Belloni, L., & Bettuzzi, S. (2009). Clusterin is a short half-life, poly-ubiquitinated protein, which controls the fate of prostate cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 219(2), 314–323. <https://doi.org/10.1002/jcp.21671>
- Rohne, P., Prochnow, H., & Koch-Brandt, C. (2016). The CLU-files: Disentanglement of a mystery. *Biomolecular Concepts*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0026>
- Rohne, P., Prochnow, H., Wolf, S., Renner, B., & Koch-Brandt, C. (2014). The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(5), 1626–1639. <https://doi.org/10.1159/000366365>
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799–806. <https://doi.org/10.1038/414799a>
- Seo, J. A., Kang, M. C., Ciaraldi, T. P., Kim, S. S., Park, K. S., Choe, C., ... Kim, Y. B. (2018). Circulating ApoJ is closely associated with insulin resistance in human subjects. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 78, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.014>
- Shim, Y.-J., Kang, B.-H., Jeon, H.-S., Park, I.-S., Lee, K.-U., Lee, I.-K., ... Min, B.-H. (2011).

- Clusterin induces matrix metalloproteinase-9 expression via ERK1/2 and PI3K/Akt/NF- κ B pathways in monocytes/macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(October), 761–769. <https://doi.org/10.1189/jlb.0311110>
- Shim, Young-Jun, Tae, Y.-K., Kang, B.-H., Park, J.-S., Jeon, S.-Y., & Min, B.-H. (2016). Toll-like receptor 4 signaling is required for clusterin-induced tumor necrosis factor- α secretion in macrophage. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(4), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.049>
- Speretta, G. F., Silva, A. A., Vendramini, R. C., Zanesco, A., Delbin, M. A., Menani, J. V., ... Colombari, D. S. A. (2016). Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life Sciences*, 146, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.011>
- Stanford, K. I., & Goodyear, L. J. (2014). Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. *Advances in Physiology Education*, 38(4), 308–314. <https://doi.org/10.1152/advan.00080.2014>
- Tao, Z., Shi, A., & Zhao, J. (2015). Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 73(1), 181–185. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0598-4>
- Trougakos, I. P. (2013). The molecular chaperone apolipoprotein J/Clusterin as a sensor of oxidative stress: Implications in therapeutic approaches - A mini-review. *Gerontology*, 59(6), 514–523. <https://doi.org/10.1159/000351207>
- Trougakos, I. P., & Gonos, E. S. (2002). Clusterin/Apolipoprotein J in human aging and cancer. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(11), 1430–1448. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00041-9)
- Wang, C., Zeng, Z., Liu, Q., Zhang, R., & Ni, J. (2014). Se-methylselenocysteine inhibits apoptosis induced by clusterin knockdown in neuroblastoma N2a and SH-SY5Y cell lines. *International journal of molecular sciences*, 15(11), 21331–21347. <https://doi.org/10.3390/ijms151121331>
- Watari, H., Ohta, Y., Kamel, M., Xiong, Y., Tanaka, S., & Sakuragi, N. (2008). Clusterin expression predicts survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy and systematic lymphadenectomy. *Gynecologic Oncology*, 108, 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.11.026>

- White, M. F. (1998). The IRS-signalling system : A network of docking proteins that mediate insulin action. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182, 3–11.
- Wojtaszewski, J. F. P., Birk, J. B., Frøsig, C., Holten, M., Pilegaard, H., & Dela, F. (2005). 5 AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle : effects of strength training and type 2 diabetes. *Journal of Physiology*, 564(2), 563–573. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.082669>
- Won, J. C., Park, C. Y., Oh, S. W., Lee, E. S., Youn, B. S., & Kim, M. S. (2014). Plasma Clusterin (ApoJ) levels are associated with adiposity and systemic inflammation. *PLoS ONE*, 9(7), 3–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103351>
- Xue, T., Wei, L. I., Zha, D. J., Qiao, L. I., Lu, L. J., Chen, F. Q., & Qiu, J. H. (2015). Exposure to acoustic stimuli promotes the development and differentiation of neural stem cells from the cochlear nuclei through the clusterin pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(3), 637–644. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2075>
- Zhang, H., Kim, J. K., Edwards, C. a, Xu, Z., Taichman, R., & Wang, C.-Y. (2005). Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nature cell biology*, 7(9), 909–915. <https://doi.org/10.1038/ncb1291>
- Zierath, J. R., Krook, A., & Wallberg-henriksson, H. (1998). Insulin action in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182, 153–160.

ANEXO – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA



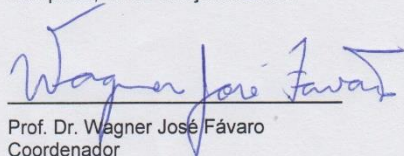
CERTIFICADO

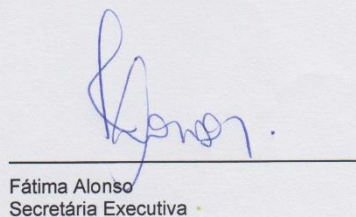
Certificamos que a proposta intitulada **EFEITOS DO EXERCÍCIO NA INFILTRAÇÃO DE MACRÓFAGOS E MUDANÇA DE M1 PARA M2 EM CAMUNDONGOS OBESOS**, registrada com o nº **4773-1/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Leandro Pereira de Moura e Rodrigo Martins Pereira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **13 de março de 2018**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	23/02/2018-23/02/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	13/03/2018-23/02/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	448
Idade/Peso:	04 semanas / 40g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas, FCA/UNICAMP

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

Campinas, 13 de março de 2018.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Coordenador


Fátima Alonso
Secretária Executiva

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