



apunts

MEDICINA DE L'ESPORT

www.apunts.org



TREBALL ORIGINAL

Efectes de 12 setmanes d'entrenament de resistència a 2 intensitats diferents en l'expressió de l'ARNm del GLUT4 dels músculs soli i gastrocnemi en ratolins obesos

Hamid Mohebbi^{a,*}, Hadi Rohani^b i Sadegh Hassan-Nia^c

^a Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

^b Department of Sport Medicine, Sport Sciences Research Institute of Iran, Teheran, Iran

^c Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Teheran, Iran

Rebut el 10 d'octubre de 2015; acceptat el 14 de desembre de 2015

PARAULES CLAU

Entrenament de resistència;
Tipus muscular;
Obesitat;
GLUT

Resum

L'objectiu d'aquest estudi fou investigar la resposta a l'entrenament de resistència de l'expressió de l'ARNm del GLUT4 dels músculs soli i gastrocnemi en ratolins obesos. En aquest estudi es van utilitzar 40 ratolins mascles C57BL/6. Vuit ratolins (base normal [BN]) serviren com a controls no obesos i no entrenats, i 32 ratolins foren sotmesos a una dieta alta en greixos (DAG) (augment del 60% de kcal) durant 12 setmanes. A la setmana 16 els ratolins obesos foren distribuïts aleatòriament en els grups de tractament següents ($n = 8$ cada grup): obesos base (OB); baixa intensitat (BI); alta intensitat (AI), o grups de control d'obesitat (CO). BI i AI foren entrenats 5 dies per setmana durant 12 setmanes en una cinta de córrer motoritzada a 15 m/min amb un pendent del 5% (en BI) i/o en 22 m/min en un pendent del 5% (en AI). Els ratolins CO es mantingueren sedentaris a la gàbia durant el programa d'entrenament. Es mesurà l'expressió de l'ARNm del GLUT4 dels músculs gastrocnemi i soli, utilitzant el mètode PCR en temps real. L'expressió de l'ARNm del GLUT4 del múscul soli en el grup BI augmentà aproximadament 2,2 vegades, enfront a 1,6 vegades en el gastrocnemi ($p < 0,05$). A més, l'expressió de l'ARNm del GLUT4 en els músculs soli i gastrocnemi dels grups BI i AI fou significativament major que en OB i en els grups CO ($p < 0,05$). Podem concloure que tota alteració de l'equilibri energètic del cos, especialment per l'entrenament físic i/o una dieta alta en greixos, pot influir en els mecanismes moleculars i cel·lulars que actuen per establir una homeòstasi estable. © 2015 Consell Català de l'Esport. Generalitat de Catalunya. Publicat per Elsevier España, S.L.U. Tots els drets reservats.

* Autor per a correspondència.

Correu electrònic: mohebbi-h@yahoo.com (H. Mohebbi).

KEYWORDS

Endurance training;
Muscle type;
Obesity;
GLUT4

The effect of 12 weeks endurance training at 2 different intensities on GLUT4 mRNA expression of soleus and gastrocnemius muscles in obese mice

Abstract

The aim of this study was to investigate the expression of GLUT4 mRNA in soleus and gastrocnemius muscles in obese mice in response to endurance training. Forty male C57BL/6 mice were used in this study. Eight mice (normal base [NB]) served as non-obese non-trained controls, and 32 mice were put on a high fat diet (HFD) regimen (60% kcal fat) for 12 weeks. At week 16, the obese mice were randomized into the following treatment groups (n = 8 each group): obese base [OB]; low intensity [LI]; high intensity [HI], or obese control [OC] groups. LI and HI trained for 5 days/week for 12 weeks on a motorized treadmill at 15 m/min on a 5% slope (for LI), and/or at 22 m/min on a 5% slope (for HI). OC mice were kept sedentarily in the cage during the training program. GLUT4 mRNA expression was measured in gastrocnemius and soleus muscles using a Real Time-PCR method. GLUT4 mRNA expression of soleus muscle in LI group increased about 2.2 fold, against about 1.6 fold for gastrocnemius ($P < .05$). In addition, GLUT4 mRNA expression of soleus and gastrocnemius muscles in LI and HI groups were significantly higher than OB and OC groups ($P < .05$). It can be concluded that any disturbance in body energy balance, especially by exercise training and/or high fat diet, can influence these molecular and cellular mechanisms that act to establish a stable homeostasis.

© 2015 Consell Català de l'Esport. Generalitat de Catalunya. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducció

Generalment s'admet que l'obesitat està fonamentalment associada a una alteració de la taxa d'absorció de glucosa estimulada per la insulina en el múscul esquelètic, que s'ha atribuït a la resistència a la insulina. Diversos estudis s'han centrat en el sistema de transport de la glucosa com a part dels mecanismes subjacents. La glucosa transporta les cèl·lules del múscul esquelètic a través de les proteïnes transportadores de glucosa GLUT1 i GLUT4¹. Sembla que la isoforma GLUT1 és la transportadora de la glucosa que suporta el transport de la glucosa basal^{2,3}, mentre que la isoforma GLUT4 augmenta el transport de glucosa en resposta a la insulina i a la contracció. La insulina i les contraccions transporten el GLUT4 de la reserva intracel·lular a la membrana plasmàtica i als túbuls T^{4,5}.

Se sap que en els rosegadors, la capacitat d'absorció de la glucosa és major en els músculs oxidatius vermells que en els músculs glucolítics blancs⁶⁻¹⁰. Sembla que un mecanisme subjacent té un major nivell d'expressió de GLUT4, tant a nivell intracel·lular^{6,7} com a la membrana plasmàtica⁸. En el múscul esquelètic humà, la captació de glucosa s'associa positivament a la proporció de fibres de tipus I i negativament a la proporció de fibres de tipus II¹¹. Aquests resultats es basen en l'estudi in vitro de Zierath et al.¹², que reportaren que l'augment d'insulina estimulada en la captació de la glucosa per damunt del nivell basal correlaciona estretament, tant afirmativament amb el percentatge de fibres musculars de tipus I, com negativament amb el percentatge de fibres tipus IIa. Tanmateix, s'han reportat resultats poc convinents respecte a la relació entre la distribució del tipus de fibra i el contingut de GLUT4 en el múscul humà¹³⁻¹⁵.

Andersen et al.¹³ no trobaren cap correlació entre tipus de fibra i contingut de GLUT4, mentre que Houmard et al.¹⁵ mostraren una baixa correlació entre tipus de composició de la fibra i contingut de GLUT4.

Ha estat demostrat que els diferents músculs presenten importants diferències de contingut de GLUT4, i aquestes diferències sovint estan associades a les diferències en la captació de la glucosa estimulada per la insulina^{16,17}. Com que el diferents músculs es componen d'una combinació de diferents tipus de fibres musculars¹⁸, és possible que hi hagi diferències significatives en el contingut de GLUT4 entre músculs.

Probablement, les diferències en el contingut de GLUT4 i la captació de la glucosa estimulada per la insulina estan relacionades amb el nivell d'entrenament. Els canvis de nivell d'activitat del múscul esquelètic són la clau reguladora del contingut de GLUT4 en ratolins^{19,20}. Entre els humans, els esportistes tenen més GLUT4 que els subjectes control de la mateixa edat no entrenats^{21,22}, i en ambdós, subjectes control normals i sans i individus amb la captació disminuïda de la glucosa estimulada per la insulina, l'entrenament físic ha demostrat que incrementa el contingut de GLUT4^{20,23,24}. A més, una disminució del nivell d'activitat pot minorar el contingut de GLUT4^{20,25}. Finalment, s'ha demostrat que canvis en l'activitat física i el contingut de GLUT4 estan relacionats amb canvis en la captació de la glucosa estimulada per la insulina²⁰.

El principal objectiu d'aquest treball fou investigar l'expressió de l'ARNm del GLUT4 en el solí (múscul predominantment de contracció lenta) i el gastrocnemi (múscul predominantment de contracció ràpida) com a resposta a l'entrenament de resistència en ratolins obesos.

Subjectes i mètodes

Animals

En aquest estudi s'utilitzaren 40 ratolins mascles C57BL/6 (de 4 setmanes). Vuit ratolins no obesos (base normal [BN]; dieta estàndard alimentats *ad libitum*) van servir de control no obesos no entrenats (el grup BN es considerarà com a valor de referència per calcular l'expressió gènica en temps real que s'expressa com a valors relatius) i 32 ratolins van ser sotmesos a una dieta alimentària rica en greixos (DAG) durant 12 setmanes que consistí en accés lliure a una dieta rica en greixos de 60% kcal (*High-Fat Diet*, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Iran). A la setmana 16, els ratolins obesos foren assignats aleatòriament als grups de tractament següents (n = 8 cada grup): 1) grup obès base [OB]; 2) grup de baixa intensitat [BI]; 3) grup d'alta intensitat [AI], o 4) grup control obès [CO]. Els ratolins OB moriren abans del programa d'entrenament. BI i AI entrenaren 5 dies per setmana durant 12 setmanes en una cinta de córrer motoritzada. Els CO serviren de control no entrenats. Tots els ratolins van ser ficats en gàbies binàries, la temperatura de la sala dels animals es mantingué a 22 °C i es creà un cicle artificial de 12 h de llum i 12 h de foscor. S'aplicà un període de familiarització de 2 setmanes en què els ratolins corrien 7-10 m durant 10-15 min en un pendent del 5%. Després, es continuà l'entrenament a les 12 setmanes següents, durant 60 min, de forma contínua a 15 m/min en un pendent del 5% (els BI) i/o 41 min continuament a 22 m/min en un pendent del 5% (els AI). El treball diari total es féu coincidir en ambdós grups i es fixà en 900 m la distància de carrera. Els ratolins CO es mantingueren sedentaris a la gàbia durant el programa d'entrenament. El pes es registrà setmanalment. BI, AI i CO van ser morts al final del programa d'entrenament. Se'ls retirà el menjar 12-14 h abans de morir. Els experiments van ser aprovats pel Comitè d'ètica d'investigació.

Preparació del múscul

Els ratolins van ser anestesiats per via intraperitoneal amb una preparació de ketamina (30-50 mg/kg en perfusió contínua [pc]) i xilacina (3-5 mg/kg pc) i moriren per extracció de sang del cor per prendre mostres del múscul 48 h després de la darrera sessió d'exercici, i es van dissecar els músculs soli i gastrocnemi. Les mostres de múscul es congelaren ràpidament en nitrogen líquid i es conservaren a -80 °C. Els procediments de preparació dels teixits i l'extracció d'ARN total estan a bastament descrits en diversos estudis²⁶.

PCR en temps real

S'utilitzà ARN transcriptasa inversa o retrotranscripció i encebadors d'hexàmers aleatoris segons les instruccions del fabricant (AccuPower Green Star qPCR PreMix, BiONEER, Daejeon, Corea). Després, s'hi afegiren PCR Master Mix que contien encebadors específics, ADN Taq Hotstar polimerasa i tampó de SYBR-Green PCR. Totes les mostres foren determinades per duplicat, i per a un control negatiu s'utilitzà la mateixa configuració, tret de l'addició de la transcriptasa inversa. No es detectà cap producte de PCR en aquestes darreres condicions.

Els nivells d'ARNm de GLUT4 i β -actina, un gen de manteniment, es determinaren per transcripció inversa quantitativa-PCR de l'ARN cel·lular total amb l'encebador directe 5' CCG CGG CCT CCT ATG AGA TAC T3' i l'encebador revers 5' AGG CAC CCC GAA GAT GAG T3' per a l'amplificació de l'ARNm del GLUT4 i l'encebador directe 5' ACA ATG AGC TGC GTG TGG CC 3' i l'encebador revers 5' CCT CGT AGA TGG GCA CAG TG 3' per a l'amplificació de β -actina ARNm. Els productes d'amplificació van ser sotmesos a electroforesi en gels d'agarosa al 2% i es van tenyir amb bromur d'etidi.

La quantificació en temps real de GLUT4 a β -actina d'ARNm es realitzà mitjançant un assaig de PCR SYBR-Green (Rotor-gene 6000, Corbett). GLUT4 ARNm i β -actina d'ARNm foren amplificats en tubs separats i el protocol de ciclat tèrmic de 40 cicles consistí en la desnaturalització a 95 °C durant 20 s, hibridació a 60 °C durant 60 s, extensió a 72 °C durant 30 s que s'inicià amb una desnaturalització inicial a 95 °C durant 15 min i es completà amb una extensió final a 72 °C durant 10 min. Durant l'etapa d'extensió, l'augment de la fluorescència fou mesurat en temps real. Les dades van ser obtingudes com a valors CT (valor del cicle llindar). L'expressió gènica relativa fou calculada amb la fórmula de Pfaffl²⁷:

$$\text{Ràtio} = \frac{(E_{\text{objectiu}})^{\Delta CT_{\text{objectiu}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CT_{\text{ref}}}}$$

(mostra control)

Anàlisi de dades

Els valors es presenten com a mitjana $\pm$ DE. S'utilitzà l'anàlisi de variància (ANOVA) d'una via seguit del test *Honestly-significant-difference* (HSD) de Tukey per a avaluar els efectes de l'entrenament sobre l'expressió relativa d'ARNm de GLUT4 en diferents grups. També s'utilitzà la prova *t* aparellada, per valorar la diferència entre l'ARNm del GLUT4 dels músculs soli i gastrocnemi de cada grup. En tots els tests s'utilitzà el programari SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), i el valor de significació estadística s'establí en $p \leq 0,05$.

Resultats

A la figura 1 es presenta la mitjana dels valors del pes dels ratolins dels diferents grups durant la dieta alta en greixos (DAG) i les fases d'entrenament. El pes dels grups que consumiren DAG (és a dir, OB, CO, BI i AI) augmentà significativament en comparació amb BN a partir de la cinquena setmana durant la fase DAG que es mantingué alta fins a la setmana 12 ($p \leq 0,05$). L'augment de pes dels 4 grups tractats fou del 18% de mitjana en comparació amb BN, que assolí el 32% a la dotzena setmana (fig. 1).

Durant la fase d'entrenament només s'estudiaren els grups d'entrenament (BI i AI) i CO, i la pèrdua de pes dels grups d'entrenament començà a diferenciar-se del grup CO des de la sisena setmana, i esdevingué significativa a partir de la vuitena setmana ($p \leq 0,05$). Per tant, la pèrdua de pes en els grups d'entrenament (en comparació amb el grup CO) fou del 5 i del 7% en la sisena i dotzena setmana de la fase d'entrenament, respectivament. És interessant asse-

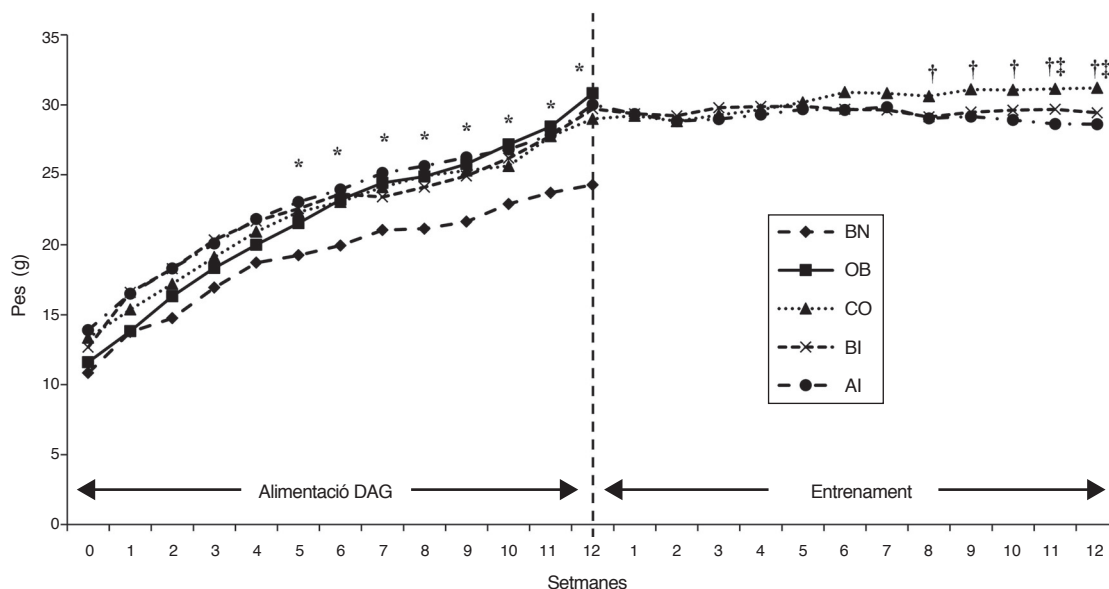


Figura 1 Canvi de pes de ratolins durant les fases d'alimentació DAG i d'entrenament.

*: diferència significativa entre els grups obesos i normal; †: diferència significativa entre grups d'entrenament i OB; ‡: diferències significatives entre els grups AI/BI.

AI: entrenament a alta intensitat; BI: entrenament a baixa intensitat; BN: base normal; CO: control obesos; OB: obesos base.

nyalar que la diferència de la pèrdua de pes entre BI i AI aparegué a partir de la setmana 9 i arribà a ser estadísticament divergent a les setmanes 11 i 12 ($p \leq 0,05$). De fet, la ràtio de la pèrdua de pes fou major en AI que en BI, de manera que els canvis en el percentatge de pes al final de l'entrenament de 12 setmanes del grup AI fou 8% vs 5,5% del grup BI.

L'expressió de l'ARNm del GLUT4 del múscul soli en els ratolins que participaren en el grup BI augmentà aproximadament 2,2 vegades, enfront a ~ 1,6 vegades en el gastrocnemi, en relació a BN ($p = 0,05$); de manera similar, respecte a l'expressió de l'ARNm del GLUT4 incrementà, tot i que, estadísticament, de manera no significativa, per la pràctica d'exercici d'alta intensitat en els músculs soli i gastrocnemi

~ 2,1 i ~ 1,8 vegades, respectivament ($p \leq 0,05$). A més, l'expressió d'ARNm del GLUT4 dels músculs soli i gastrocnemi en els grups BI i AI fou significativament major que en els grups OB i CO ($p \leq 0,05$), amb una lleugera regulació en descens (*down regulation*) en els darrers grups (fig. 2).

Discussió

Ploug et al.²⁸ establiren que GLUT4 en fibres no estimulades (per la insulina) es distribuïa al llarg de totes les fibres musculars, i era present tant en la superfície (68% del GLUT4 total) com en el nucli (32% del GLUT4 total) de les fibres. També trobaren que els nuclis eren desplaçats i alineats amb els vasos sanguinis que cursen al llarg de la superfície de la fibra, que ocasionen una gran fracció de GLUT4 prop de la font de la glucosa evitant la necessitat de difusió a través de llargues distàncies. Està ben documentat que, en estat normal, el GLUT4 circula lentament entre la membrana plasmàtica i un o més compartiments intracel·lulars, amb la gran majoria de transportadors que resideixen en els compartiments vesiculars dins de l'interior de la cèl·lula^{28,29}. L'acumulació d'insulina estimulada de la proteïna GLUT4 en la superfície de la cèl·lula pot ser causada per un increment de 10 a 20 vegades de la ràtio d'exocitosi amb una petita disminució (2-3 vegades) de la ràtio d'endocitosi del GLUT4^{10,45,30}.

La insulina estimula el transport de glucosa a través de la translocació de GLUT4 a partir de l'agrupació d'emmagatzemament intracel·lular cap a la membrana plasmàtica. La resistència a la insulina causada per la manca d'insulina o uns resultats anormals de senyalització de la insulina amb un descens en l'expressió i translocació de GLUT4 causen la hiperglucèmia i la diabetis³⁰⁻³². També s'ha demostrat que la

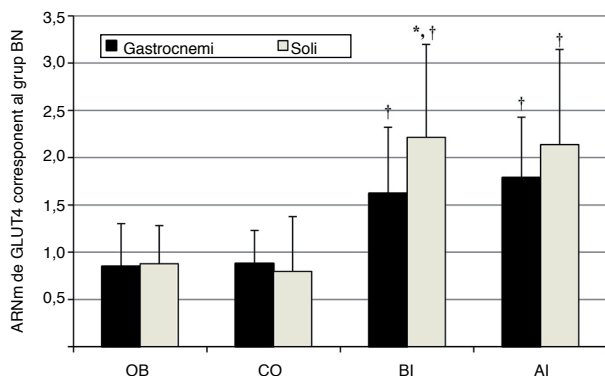


Figura 2 Contingut d'ARNm de GLUT4 dels grups experimentals gastrocnemi i soli en relació amb el múscul emparellat en el grup BN ($p \leq 0,05$).

*: augment significatiu amb relació a BN; †: diferència significativa en comparació amb OB i CO ($p \leq 0,05$).

contracció muscular augmenta el contingut de GLUT4 de la membrana cel·lular^{29,30}. Diversos estudis suggereixen que l'exercici físic causa l'expressió de la proteïna GLUT4 i la translocació en membrana plasmàtica mitjançant un mecanisme diferent de senyalització de la insulina^{5,33}. La majoria d'estudis sobre el múscul esquelètic dels ratolins indiquen que hi ha més GLUT4 en les fibres de tipus I que en les del II^{10,34}, la qual cosa coincideix amb els resultats que vam trobar en el ratolins. En aquest estudi només vam utilitzar el múscul soli, generalment conegut com a múscul de fibres de tipus I.

El nostre estudi concorda amb altres³⁵⁻³⁹ que han indicat que l'exercici físic incrementa l'expressió de la proteïna GLUT4 en subjectes diabètics, tal com succeï en els nostres subjectes obesos.

Vam veure que l'expressió d'ARNm de GLUT4 s'incrementa amb 12 setmanes d'entrenament de resistència, en ambdós músculs, en el soli (múscul en què predominen les fibres de contracció lenta) i en el gastrocnemi (en què predominen les fibres de contracció ràpida) en ratolins obesos, amb patró intens de dependència. Això significa que la intensitat de l'exercici pot afectar l'expressió del gen GLUT4 (i, probablement, la proteïna) en resposta a l'entrenament, la qual cosa pot provocar canvis metabòlics significatius especialment en els casos obesos. En consonància amb els nostres resultats, s'ha demostrat que la proteïna GLUT4 i el transport de glucosa són immensament superiors en les fibres musculars oxidatives vermelles (tipus I i IIa) que en les fibres glucolítiques blanques (tipus IIb)^{10,40}. Això podria ser un factor important en l'adaptació a l'exercici, degut a què els resultats de l'entrenament de resistència faciliten un canvi de fibres de tipus IIb a fibres tipus IIa⁴¹. Tanmateix, en els músculs esquelètics humans hi ha una diferència molt menor en l'expressió de GLUT4 en diferents tipus de fibres musculars^{34,42}. Dugaard et al.³⁴ van aïllar fibres musculars individuals i les van classificar segons la isoforma de la miosina. GLUT4 fou ~ 20% més elevada en les fibres que expressen la cadena pesada de la miosina I que en les que expressen la cadena pesada de la miosina IIa o IIb. No es van trobar diferències entre les fibres IIa i IIb. Després de 2 setmanes d'entrenament, GLUT4 incrementà ~ 23% de fibres musculars de tipus I, però no hi hagué canvis en els tipus IIa o IIb. Tanmateix, l'exercici de baixa intensitat utilitzat és conegut principalment per reclutar fibres de tipus I.

D'acord amb els nostres resultats, l'entrenament de baixa intensitat originà una expressió major d'ARNm de GLUT4 en el múscul oxidatiu (és a dir, el soli), probablement degut a les necessitats relacionades amb la capacitat oxidativa de les cèl·lules. D'altra banda, la pràctica d'exercici d'alta intensitat no produí una expressió major d'ARNm de GLUT4 en el soli ni en el gastrocnemi. Com que el múscul gastrocnemi consisteix en una barreja de fibres vermelles i blanques, una altra explicació podria ser que l'entrenament amb exercicis de baixa intensitat no fou suficient per exercir o fins i tot per activar les fibres vermelles del múscul gastrocnemi, i un augment no significatiu d'aquest múscul podria procedir de les fibres blanques. Aquest escenari pot ampliar-se al que s'ha observat en les troballes relacionades amb l'alta intensitat; és a dir, un augment no significatiu d'aquest múscul amb l'exercici d'alta intensitat podria procedir només de les fibres vermelles.

Les hormones també regulen la concentració de la proteïna del múscul transportador de la glucosa. L'expressió de GLUT4 s'incrementà degut a la insulina i a les hormones tiroidees^{20,43} i disminuï per un AMPc elevat⁴⁴. La regulació de l'expressió de GLUT4 per l'activitat contràctil és independent de la regulació hormonal, perquè la carrera en la cinta de córrer augmentà el GLUT4 en els ratolins diabètics⁴⁵. S'hi afegiren els efectes de la deficiència de la insulina i denervació en les concentracions de GLUT4⁴⁵. L'entrenament físic també augmenta la proteïna del GLUT4 i l'ARNm muscular en pacients amb diabetis tipus 2⁴⁶. Aquests resultats suggereixen que l'activitat contràctil del múscul modula directament l'expressió de GLUT4 del múscul, independentment de l'acció de la insulina. La histona deacetilasa 5 (HDAC5) és un mediador crític dels canvis del nivell d'ARNm de GLUT4 en resposta a l'entrenament⁴⁷. S'ha demostrat que una sèrie de modificacions de les histones causades per la histona deacetilasa i la histona metiltransferasa culminaran en una caiguda metabòlica del gen GLUT4 en el múscul esquelètic dels ratolins⁴⁸.

Hi ha evidències significatives que els nivells d'ARNm de GLUT4 disminueixen en el múscul del teixit adipós amb l'obesitat^{49,50}, y que l'augment d'ARNm de GLUT4 pot alleujar o compensar la resistència a la insulina^{51,52}. Tal com era d'esperar, les nostres troballes sobre els nivells d'ARNm del GLUT4 augmentaren significativament amb l'entrenament, i aquest increment s'associà a una pèrdua de pes, la qual cosa recolza aquesta idea. Per tant, l'augment de la transcripció de GLUT4 en el múscul durant la pèrdua de pes pot ser una prova definitiva en la reversió de la resistència a la insulina.

Estudis anteriors, juntament amb els nostres resultats, suggereixen que la regulació transcripcional del gen GLUT4 és sensible a canvis en l'equilibri d'energia del cos. A més, nosaltres vam trobar una resposta de GLUT4 a l'entrenament depenent de la intensitat i del tipus de fibra, que no es plantejava en estudis anteriors.

Podem concloure que tot tipus d'alteració de l'equilibri energètic del cos, especialment per la pràctica d'exercici i/o dieta alta en greixos, pot influir en els mecanismes moleculars i cel·lulars que actuen per establir una homeòstasi estable. GLUT4 podria disminuir si s'augmentés la ingesta d'energia, i a la inversa, augmentaria si s'augmentés la despesa energètica. Aquests canvis són gairebé similars en els músculs de contracció lenta i ràpida, amb una mica més de capacitat de resposta en els músculs de contracció lenta, perquè estan més compromesos amb el metabolisme de la glucosa.

Conflicte d'interessos

Els autors declaren que no tenen cap conflicte d'interessos

Agraïment

Els autors agraeixen a la Universitat de Guilan el suport econòmic atorgat a aquest projecte d'investigació.

Bibliografia

- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*. 1990;13:198-208.
- Marshall BA, Ren JM, Johnson DW, Gibbs EM, Lillquist JS, Soeller WC, et al. Germline manipulation of glucose homeostasis via alteration of glucose transporter levels in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1993;268:18442-5.
- Ren JM, Marshall BA, Gulve EA, Gao J, Johnson DW, Holloszy JO, et al. Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1993;268:16113-5.
- Hirshman MF, Goodyear LJ, Wardzala LJ, Horton ED, Horton ES. Identification of an intracellular pool of glucose transporters from basal and insulin-stimulated rat skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1990;265:987-91.
- Marette A, Burdett E, Douen A, Vranic M, Klip A. Insulin induces the translocation of GLUT4 from a unique intracellular organelle to transverse tubules in rat skeletal muscle. *Diabetes*. 1992;41:1562-9.
- Goodyear LJ, Hirshman MF, Smith RJ, Horton ES. Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membranes of red and white skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1991;261 Pt 1:E556-61.
- Henriksen EJ, Bourey RE, Rodnick KJ, Koranyi L, Permutt MA, Holloszy JO. Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. *Am J Physiol*. 1990;259 Pt 1:E593-8.
- Marette A, Richardson JM, Ramlal T, Balon TW, Vranic M, Pessin JE, et al. Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am J Physiol*. 1992;263 Pt 1:C443-52.
- Izumiya Y, Hopkins T, Morris C, Sato K, Zeng L, Viereck J, et al. Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab*. 2008;7:159-72.
- Kern M, Wells JA, Stephens JM, Elton CW, Friedman JE, Tapscott EB, et al. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (GLUT4) protein level. *Biochem J*. 1990;270:397-400.
- Lillioja S, Young AA, Culter CL, Ivy JL, Abbott WG, Zawadzki JK, et al. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. *J Clin Invest*. 1987;80:415-24.
- Zierath JR, He L, Guma A, Odegard Wahlstrom E, Klip A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia*. 1996;39:1180-9.
- Andersen PH, Lund S, Schmitz O, Junker S, Kahn BB, Pedersen O. Increased insulin-stimulated glucose uptake in athletes: The importance of GLUT4 mRNA, GLUT4 protein and fibre type composition of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 1993; 149: 393-404.
- Houmard JA, Egan PC, Neuffer PD, Friedman JE, Wheeler WS, Israel RG, et al. Elevated skeletal muscle glucose transporter levels in exercise-trained middle-aged men. *Am J Physiol*. 1991;261 Pt 1:E437-43.
- Houmard JA, Shinebarger MH, Dolan PL, Leggett-Frazier N, Bruner RK, McCammon MR, et al. Exercise training increases GLUT-4 protein concentration in previously sedentary middle-aged men. *Am J Physiol*. 1993;264 Pt 1:E896-901.
- Hardin DS, Azzarelli B, Edwards J, Wigglesworth J, Maianu L, Brechtel G, et al. Mechanisms of enhanced insulin sensitivity in endurance-trained athletes: Effects on blood flow and differential expression of GLUT 4 in skeletal muscles. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:2437-46.
- Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2005;99:330-7.
- Pette D. Training effects on the contractile apparatus. *Acta Physiol Scand*. 1998;162:367-76.
- Dela F, Mikines KJ, von Linstow M, Secher NH, Galbo H. Effect of training on insulin-mediated glucose uptake in human muscle. *Am J Physiol*. 2006;263:E1134-43.
- Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev*. 2013;93:993-1017.
- Gallagher PM, Touchberry CD, Teson K, McCabe E, Tehel M, Wacker MJ. Effects of an acute bout of resistance exercise on fiber-type specific GLUT4 and IGF-1R expression. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2013;38:581-6.
- Newsom SA, Schenk S. Interaction between lipid availability, endurance exercise and insulin sensitivity. *Med Sport Sci*. 2014;60:62-70.
- Higashida K, Tabata I, Higuchi M, Terada S. Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise and nutritional stimuli. *J Phys Fitness Sports Med*. 2013;2:355-60.
- Hussey S, McGee S, Garnham A, McConnell G, Hargreaves M. Exercise increases skeletal muscle GLUT4 gene expression in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14: 768-71.
- Mortensen B, Friedrichsen M, Andersen NR, Alibegovic AC, Højbjørre L, Sonne MP, et al. Physical inactivity affects skeletal muscle insulin signaling in a birth weight-dependent manner. *J Diabetes Complications*. 2014;28:71-8.
- Mohebbi H, Rohani H, Hassan-Nia S, Pirooznia N. The effect of obesity and endurance training-induced weight loss on UCP3 mRNA expression in C57BL/6 mice. *Ir J Endocrinol Metab*. 2013;15:311-21.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:e45.
- Ploug T, van Deurs B, Ai H, Cushman SW, Ralston E. Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *J Cell Biol*. 1998;142:1429-46.
- Malide D, Dwyer NK, Blanchette-Mackie EJ, Cushman SW. Immunocytochemical evidence that GLUT4 resides in a specialized translocation post-endosomal VAMP2-positive compartment in rat adipose cells in the absence of insulin. *J Histochem Cytochem*. 1997;45:1083-96.
- Hughes VA, Fiatarone MA, Fielding RA, Kahn BB, Ferrara CM, Shepherd P, et al. Exercise increases muscle GLUT-4 levels and insulin action in subjects with impaired glucose tolerance. *Am J Physiol*. 1993;264 Pt 1:E855-62.
- Friedman JE, Sherman WM, Reed MJ, Elton CW, Dohm GL. Exercise training increases glucose transporter protein GLUT4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats. *FEBS Lett*. 1990; 268:13-6.
- Ishihara H, Asano T, Katagiri H, Lin JL, Tsukuda K, Inukai K, et al. Expression of GLUT-4 glucose transporter in unweighted soleus muscle of normal and STZ-induced diabetic rats. *Am J Physiol*. 1993;264 Pt 1:E301-7.
- Holman GD, Cushman SW. Subcellular localization and trafficking of the GLUT4 glucose transporter isoform in insulin-responsive cells. *Bioessays*. 1994;16:753-9.
- Daugaard JR, Richter EA. Relationship between muscle fibre composition, glucose transporter protein 4 and exercise training: Possible consequences in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Physiol Scand*. 2001;171:267-76.
- Brozinick J, Etgen G, Yaspelkis B, Kang H, Ivy J. Effects of exercise training on muscle GLUT-4 protein content and translocation in obese Zucker rats. *Am J Physiol Metab*. 1993;265:E419-27.
- O'gorman D, Karlsson H, McQuaid S, Yousif O, Rahman Y,

- Gasparro D, et al. Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006;49:2983-92.
37. Dohm GL. Invited review: Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise. *J Appl Physiol*. 2002;93:782-7.
38. Chiu L-L, Chou S-W, Cho Y-M, Ho H-Y, Ivy JL, Hunt D, et al. Effect of prolonged intermittent hypoxia and exercise training on glucose tolerance and muscle GLUT4 protein expression in rats. *J Biomed Sci*. 2004;11:838-46.
39. Kraniou GN, Cameron-Smith D, Hargreaves M. Effect of short-term training on GLUT-4 mRNA and protein expression in human skeletal muscle. *Exp Physiol*. 2004;89:559-63.
40. Castorena CM, Arias EB, Sharma N, Bogan JS, Cartee GD. Fiber type effects on contraction-stimulated glucose uptake and GLUT4 abundance in single fibers from rat skeletal muscle. *Am J Physiol Metab*. 2015;308:E223-30.
41. Garrett WE, Kirkendall DT. Exercise and sport science. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 171-3.
42. Gaster M, Poulsen P, Handberg A, Schrøder H, Beck-Nielsen H. Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Metab*. 2000;278:E910-6.
43. Raychaudhuri N, Thamotharan S, Srinivasan M, Mahmood S, Patel MS, Devaskar SU. Postnatal exposure to a high-carbohydrate diet interferes epigenetically with thyroid hormone receptor induction of the adult male rat skeletal muscle glucose transporter isoform 4 expression. *J Nutr Biochem*. 2014;25:1066-76.
44. Weems JC, Griesel BA, Olson AL. Class II histone deacetylases downregulate GLUT4 transcription in response to increased cAMP signaling in cultured adipocytes and fasting mice. *Diabetes*. 2012;61:1404-14.
45. Kawanaka K, Higuchi M, Ohmori H, Shimegi S, Ezaki O, Katsuta S. Muscle contractile activity modulates GLUT4 protein content in the absence of insulin. *Horm Metab Res*. 1996;28:75-80.
46. Holten MK, Zacho M, Gaster M, Juel C, Wojtaszewski JF, Dela F. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:294-305.
47. McGee SL, van Denderen BJ, Howlett KF, Mollica J, Schertzer JD, Kemp BE, et al. AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes*. 2008;57:860-7.
48. Raychaudhuri N, Raychaudhuri S, Thamotharan M, Devaskar SU. Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. *J Biol Chem*. 2008;283:13611-26.
49. Friedman JE, Ishizuka T, Liu S, Farrell CJ, Bedol D, Koletsky RJ, et al. Reduced insulin receptor signaling in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Am J Physiol Metab*. 1997;273:E1014-23.
50. Shao J, Yamashita H, Qiao L, Friedman J. Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Leprdb/db mice. *J Endocrinol*. 2000;167:107-15.
51. Furuta M, Yano Y, Gabazza EC, Araki-Sasaki R, Tanaka T, Katsuki A, et al. Troglitazone improves GLUT4 expression in adipose tissue in an animal model of obese type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002;56:159-71.
52. Tozzo E, Gnudi L, Kahn BB. Amelioration of insulin resistance in streptozotocin diabetic mice by transgenic overexpression of GLUT4 driven by an adipose-specific promoter 1. *Endocrinology*. 1997;138:1604-11.