



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR



TALITA ADRIANA PEREIRA DOS SANTOS

**EPIGENÉTICA NO TECIDO ADIPOSEO
RETROPERITONEAL DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA
RICA EM CARBOIDRATOS SIMPLES APÓS TREINAMENTO
FÍSICO DE NATAÇÃO**

OURO PRETO

MINAS GERAIS – BRASIL

2018

TALITA ADRIANA PEREIRA DOS SANTOS

**EPIGENÉTICA NO TECIDO ADIPOSEO
RETROPERITONEAL DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA
RICA EM CARBOIDRATOS SIMPLES APÓS TREINAMENTO
FÍSICO DE NATAÇÃO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Ouro Preto,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica
Estrutural e Biologia Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Renata Guerra de Sá Cota

Co-orientadora: Dr.^a Natália Rocha Barboza

OURO PRETO
MINAS GERAIS – BRASIL

2018

S591e Santos, Talita Adriana Pereira .
Epigenética no tecido adiposo retroperitoneal de ratos alimentados com
dieta rica em carboidratos simples após treinamento físico de natação [manuscrito]
/ Talita Adriana Pereira Santos. - 2018.
xv, 85pf.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Renata Guerra de Sá Cota.
Coorientadora: Profª. Drª. Natália Rocha Barboza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de
Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Area de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Epigenética. 2. Carboidratos. 3. Tecido adiposo. 4. Educação física. I. Cota,
Renata Guerra de Sá. II. Barboza, Natália Rocha. III. Universidade Federal
de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 577.114

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 05 dias do mês de setembro do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Talita Adriana Pereira dos Santos, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Renata Guerra de Sá Cota (Presidente - UFOP), pelo Prof. Elio Hideo Baba (Membro - Externo), pelo Prof. Mauro Cesar Isoldi (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Talita Adriana Pereira dos Santos 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Epigenética no Tecido Adiposo Retroperitoneal de Ratos Alimentados com Dieta Rica em Carboidratos Simples Após Treinamento Físico de Natação", na área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Prof. Elio Hideo Baba; segundo, Prof. Mauro Cesar Isoldi; terceiro, Profa. Renata Guerra de Sá Cota. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 05 de setembro de 2018.

Presidente: Renata Guerra de Sá Cota

Membro: Ca. Baba

Membro: Mauro Cesar Isoldi

Mestranda: Talita Adriana Pereira dos Santos

*“É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”*

(Martin Luther King)

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo maior presente, a vida, pela possibilidade do amanhã, e por sempre me conduzir pelo melhor caminho, suprimindo todas as minhas necessidades.

À minha família, por ser meu alicerce em todos os momentos e pelo amor incondicional.

À dona Efigênia e sua família por terem me recebido com tanto carinho em sua casa nesse período de dois anos.

Minhas “anjinhas terrestres”, Jéssica e Grazi, por me ajudarem a acalmar esse coração ansioso, Luciene com exemplo de força e sabedoria, colaborando com meu crescimento pessoal.

Aos amigos e companheiros de Ouro Preto e do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFOP: Dainane Severino, Viviano, Daiane, Isabela, Deborah, Regina, Victor, Ester, Thales, Polyana, France Anne, Natália, Mônica, Joana, Virgínia, e Yuri.

À Prof^a. Dr^a. Karina Barbosa de Queiroz, por dar início e inspirar este trabalho.

À Dr^a. Luíza Perucci, técnica do Laboratório de Genômica, por toda competência e disponibilidade.

À Dr^a. Natália Rocha Barboza, pela orientação e paciência.

À Prof^a. Dr^a. Renata Guerra de Sá, pela oportunidade de executar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista, por todo cuidado, carinho e ensinamentos que levarei por toda vida.

Aos colegas e laboratórios do NUPEB.

Aos funcionários do Biotério.

Aos animais, pelo sacrifício em prol da ciência.

Ao CNPq, FAPEMIG, CAPES e UFOP, pelo auxílio financeiro e apoio oferecido.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIACÕES	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. Introdução.....	1
1.1 O tecido adiposo em resposta a dieta.....	2
1.2 O tecido adiposo em resposta a atividade física	5
1.3 O modelo de estudo da adiposidade em resposta a dieta rica em carboidratos simples 6	
1.4 Reprogramação epigenética e tecido adiposo: efeito da metilação do DNA.....	8
1.5 Sirtuínas no metabolismo.....	12
2. Objetivo	17
2.1 Objetivos específicos	17
3. Materiais e Métodos	18
3.1 Desenho Experimental.....	18
3.1.1. Cálculo amostral, animais e dieta.....	18
3.1.2. Treinamento físico de natação com carga de trabalho	19
3.2 Determinação do consumo alimentar e evolução do ganho de massa corporal.....	20
3.3 Parâmetros biométricos.....	21
3.4 Análise dos parâmetros bioquímicos	21
3.4.1. Dosagem de Insulina	21
3.5 Análises histológicas.....	23
3.6 Extração de lipídeos.....	23
3.6.1. Dosagem do conteúdo lipídico do tecido adiposo retroperitoneal	24
3.7 Extração de gDNA.....	24

3.8.	Quantificação da metilação global do DNA no tecido adiposo retroperitoneal por Imunoensaio Enzimático (ELISA) dos animais tratados por 8 semanas.....	25
3.9.	Análise da expressão gênica	27
3.9.1.	Extração de RNA.....	27
3.9.2.	Síntese de cDNA	28
3.9.3.	Seleção do controle endógeno	28
3.9.4.	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real	28
3.10.	Análise Estatística	30
4.	Resultados.....	31
4.1.	Efeitos da dieta rica em carboidratos simples e do treinamento físico de natação sobre os parâmetros biométricos e bioquímicos.....	31
4.2.	Efeitos da dieta rica em carboidratos simples e do treinamento físico de natação sobre os parâmetros morfológicos e conteúdo lipídico dos adipócitos	38
4.3.	Efeitos epigenéticos induzidos pela dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação sobre o tecido adiposo retroperitoneal.....	40
4.3.1.	Metilação global do DNA por ELISA.....	40
4.3.2.	Análise da expressão gênica de <i>metilases</i> e <i>desmetilases</i> no tecido adiposo retroperitoneal.....	41
4.3.3.	Análise da expressão gênica de <i>sirtuínas</i> no tecido adiposo retroperitoneal	44
5.	Discussão.....	49
6.	Conclusão	57
7.	Referências	59
8.	Anexos.....	69
	Anexo I: Certificado de aprovação do protocolo nº. 2014/45, intitulado “Efeito da dieta rica em carboidratos simples sobre a modulação metabólica e cardiovascular em ratos treinados por natação.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Papel metabólico do tecido adiposo.....	5
Figura 2: Os grupos metil e acetil que modificam a cromatina e regulam a expressão gênica são derivados de dietas.	9
Figura 3: Formação de 5-metilcitosina.....	9
Figura 4: Vias de metilação do DNA.	10
Figura 5: Vias ativas da demetilação do DNA.	11
Figura 6: Reação de deacetilação por uma Sirtuína. SIRT1 utiliza NAD ⁺ como um co-substrato para clivar grupos acetil de proteínas alvo.....	14
Figura 7: Curva padrão referente a dosagem de insulina no soro de ratos.....	22
Figura 8: Análise da qualidade do gDNA em gel de agarose a 0,6 %.....	25
Figura 9: Curva padrão referente à preparação de DNA metilado e não metilado	26
Figura 10: Gel de agarose 1,2% representativo da qualidade do RNA.	27
Figura 11: Ganho massa corporal de animais alimentados com dieta rica em carboidratos simples e submetidos ao treinamento físico durante 4 e 8 semanas.....	33
Figura 12: Número e tamanho dos adipócitos do tecido adiposo retroperitoneal dos animais nos períodos de 4 semanas e 8 semanas	39
Figura 13: Conteúdo lipídico do tecido adiposo retroperitoneal dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de ingestão da dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação com carga.....	40
Figura 14: Porcentagem de 5-metilcitosina (5-mC) em 100 ng de DNA extraído do tecido adiposo retroperitoneal de ratos alimentados com a dieta rica em carboidratos simples e submetidos ao treinamento físico de natação durante 8 semanas.....	41
Figura 15- Perfil de expressão mRNA de metilases no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas.	42
Figura 16: Perfil de expressão mRNA de desmetilases no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas..	43
Figura 17: Razão entre as expressões de metilases e desmetilases..	44
Figura 18: Perfil de expressão mRNA das sirtuínas 1 e 2 no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas..	45
Figura 19: Perfil de expressão mRNA das sirtuínas 3 e 4 no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas	46

Figura 20: Perfil de expressão mRNA das sirtuínas 5 e 6 no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas..	47
Figura 21: Perfil de expressão mRNA da sirtuína 7 no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas..	48
Figura 22: Efeitos da dieta rica em carboidratos simples e do treinamento físico de natação com carga de trabalho sobre o tecido adiposo retroperitoneal de ratos alimentados e treinados por 8 semanas	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localização e funções das Sirtuínas.....	13
Tabela 2: Composição básica da ração Nuvilab CR-1.	19
Tabela 3: Esquema de sobrecarga de peso durante o treinamento físico de natação: 4 e 8 semanas.....	20
Tabela 4: Preparação utilizando controles negativo e positivo para construção da curva padrão. %5-mC- %5 - metilcitosina	26
Tabela 5: Primers, número de acesso no GenBank, e sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.....	29
Tabela 6: Consumo alimentar (g) e Ingestão calórica (Kcal) no período de 4 e 8 semanas.....	31
Tabela 7: Ganho de massa corporal dos animais submetidos a 4 semanas de ingestão da dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação com carga.	32
Tabela 8: Ganho de massa corporal dos animais submetidos a 8 semanas de ingestão da dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação com carga.	32
Tabela 9: Massa relativa dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal, inguinal e epididimal dos animais no período de 4 e 8 semanas.....	34
Tabela 10: Massa relativa do tecido adiposo marrom (TAM) dos animais no período de 4 e 8 semanas.....	34
Tabela 11: Índice de Lee e índice de adiposidade dos animais no período de 4 e 8 semanas..	35
Tabela 12: Parâmetros bioquímicos induzidos por treinamento físico de natação e dieta rica em carboidratos simples nos animais no período de 4 semanas.....	36
Tabela 13: Parâmetros bioquímicos induzidos por treinamento físico de natação e dieta rica em carboidratos simples nos animais no período de 8 semanas.....	37

LISTA DE ABREVIACOES

ADP: adenosina difosfato

AKT: proteína quinase B

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

ATP: adenosina trifosfato

CaCl₂: cloreto de cálcio

cDNA: DNA complementar

CCAAT-C/EBPs: proteínas CCAAT potenciadoras de ligação

cHDL: HDL-colesterol

cLDL: LDL-colesterol

CT: limiar do ciclo

CTAB: Brometo de cetiltrimetilamnio

cVLDL: lipoproteínas de densidade muito baixa

DNA: cido desoxirribonucleico

DNMT: metiltransferases de DNA

dNTPs: desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA: cido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

FADH: dinucleótido de flavina e adenina

FOXO: fatores de transcrição forkhead box

GAPDH: gliceraldeido 3 fosfato desidrogenase

GLUT: proteína transportadora de glicose

HDAC: proteínas desacetilases de histona da classe III

HPRT1: hipoxantina forofosiltransferase 1

IRS: substrato do receptor de insulina

LAPAC: Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto

NaCl: cloreto de sódio

NAD⁺: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (oxidado)

NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (reduzido)

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGC-1 α : coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase

PPAR γ : receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

*rRNA*18S: ribossomal RNA 18S

RNA: ácido ribonucleico

SAM: S-adenil metionina

SCS: sedentários dieta rica em carboidratos simples

SDC: sedentário dieta controle

SIRT: sirtuína

SREBP-1: proteína-1 de ligação ao elemento regulador de esterol

TCS: treinados dieta rica em carboidratos simples

TDC: treinados dieta controle

TE: Tris EDTA

TET: enzima dez-onze translocação

UCP-1: proteína desacopladora de elétrons

RESUMO

A adiposidade corporal é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas, sugerindo um papel importante do tecido adiposo para a evolução dessas condições. Fatores ambientais como componentes dietéticos e a prática de atividades físicas podem contribuir para a modulação epigenética dos tecidos, porém não é claro o momento em que essa reprogramação acontece bem como se tais eventos antecedem o surgimento de fenótipos dessas doenças. Neste trabalho objetivamos avaliar o efeito de uma dieta rica em carboidratos simples e do treinamento físico de natação sobre a modulação epigenética no tecido adiposo retroperitoneal de animais jovens. Ratos Wistar machos recém-desmamados foram divididos em dois grupos: alimentados com uma dieta controle ou uma dieta rica em carboidratos simples e subdivididos em um grupo sedentário e um grupo treinado que foi submetido a 60 minutos de treinamento físico regular de natação com carga de trabalho por um período de quatro (20 sessões) ou oito semanas (40 sessões). Após esse período, os animais foram eutanasiados, os soros e os tecidos adiposos foram removidos para avaliar os parâmetros bioquímicos, o perfil de metilação do DNA, assim como a expressão de mRNA das enzimas metilases e desmetilases do DNA e das *sirtuínas 1-7* por reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. A dieta rica em carboidratos simples aumentou os coxins gordurosos retroperitoneal e epididimal, os níveis séricos de insulina e o índice HOMA-IR relacionado à hipertrofia dos adipócitos no período de 8 semanas. O treinamento físico de natação impediu o ganho excessivo de massa corporal nos animais alimentados com a dieta rica em carboidratos simples por 8 semanas, além de impedir a hipertrofia do tecido adiposo retroperitoneal induzido pela dieta. A análise comparativa revelou diminuição dos níveis de mRNA das *sirtuínas 1, 2, 6 e 7* induzidos pela dieta rica em carboidratos simples e que não foi revertido pelo treinamento físico no período de oito semanas. A natação com carga de trabalho diminuiu a expressão das *sirtuínas 3 e 5* no mesmo período, enquanto que a dieta rica em carboidratos simples aumentou os níveis da *sirtuína 5*. Em relação à metilação do DNA, não observamos alterações na metilação global, assim como na expressão gênica das enzimas envolvidas nesse processo. Assim, demonstramos que a expressão gênica de *sirtuínas* é modulada em função da idade e dieta e pode ser alterada através do treinamento físico, e ainda, que estas condições não induziram uma modificação na metilação do DNA nesse período de tempo estudado.

Palavras-chave: Epigenética, carboidratos simples, *sirtuínas*, tecido adiposo, treinamento físico.

ABSTRACT

Body adiposity is an important risk factor for the development of metabolic diseases, suggesting an important role of adipose tissue for the evolution of these conditions. Environmental factors such as dietary components and the practice of physical activities may contribute to the epigenetic modulation of tissues, but it is not clear when this reprogramming occurs as well as whether such events precede the onset of phenotypes of these diseases. In this work we aimed to evaluate the effect of a diet rich in simple carbohydrates and physical swimming training on epigenetic modulation in retroperitoneal adipose tissue of young animals. Newly weaned male Wistar rats were divided into two groups: fed a control diet or a diet rich in simple carbohydrates and subdivided into a sedentary group and a trained group who underwent 60 minutes of regular physical training of swimming with workload for a period of four (20 sessions) or eight weeks (40 sessions). After this period, the animals were euthanized, the sera and adipose tissues were removed to evaluate the biochemical parameters, the DNA methylation profile, as well as mRNA expression of the enzymes methylases and demethylases of DNA and sirtuins 1-7 by reverse transcription polymerase chain reaction in real time. The diet rich in simple carbohydrates increased the fatty retroperitoneal and epididimal cushions, serum insulin levels and the HOMA-IR index related to adipocyte hypertrophy in the 8-week period. Physical swimming training prevented excessive body mass gain in animals fed a simple carbohydrate-rich diet for 8 weeks in addition to preventing dietary hypertrophy of retroperitoneal adipose tissue. The comparative analysis revealed a decrease in mRNA levels of sirtuins 1, 2, 6 and 7 induced by the diet rich in simple carbohydrates and that was not reversed by the physical training in the period of eight weeks. Working-swimming swimming decreases the expression of sirtuins 3 and 5 in the same period, whereas the diet rich in simple carbohydrates increased sirtuin 5 levels. Regarding DNA methylation, we did not observe changes in global methylation, as in gene expression of the enzymes involved in this process. Thus, we demonstrate that the gene expression of sirtuins is modulated as a function of age and diet and can be altered through physical training, and also that these conditions did not induce a modification in the DNA methylation during the studied period of time.

Key words: Epigenetic, simple carbohydrates, sirtuins, adipose tissue, physical training.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade tem se tornado um dos mais graves problemas de saúde pública mundial, sendo caracterizada como um distúrbio multifatorial consequente de um aporte calórico excessivo e crônico provenientes de alimentos e bebidas aliados a um gasto energético diminuído, resultando em um aumento de gordura corporal. O sedentarismo, a facilidade encontrada para a obtenção de alimentos e os maus hábitos alimentares tem contribuído para o aumento da incidência da obesidade no mundo, sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer. Além desses fatores ambientais, o fator genético também está implicado no desenvolvimento da obesidade (PENG et al., 2014; JIA et al., 2015).

Um estudo recente mostrou que houve um aumento de dez vezes no número de casos de crianças e adolescentes (entre cinco e dezenove anos) obesas em todo o mundo nos últimos quarenta anos. No ano de 2016, esse número chegou a 124 milhões de crianças e adolescentes, e 671 milhões de adultos, além de 1,3 bilhões de pessoas adultas apresentarem sobrepeso. Nesse período ocorreu uma rápida transição em que crianças e adolescentes deixaram de apresentar um quadro de desnutrição e se tornaram indivíduos com sobrepeso em muitos países da América Latina, Caribe e Leste Asiático. Isso se deve ao aumento do consumo de alimentos altamente energéticos e ricos em carboidratos refinados, e a prática de atividades recreativas sedentárias que não estimulam as crianças a aumentarem o gasto energético ((NCD-RISC), 2017).

Em função dos distúrbios relacionados com o aumento do tecido adiposo, tem-se investigado quais os mecanismos envolvidos na alteração desse tecido. Neste contexto, as alterações nos padrões epigenéticos têm sido associadas aos distúrbios metabólicos relacionados ao excesso de peso como síndrome metabólica e diabetes tipo 2, regulando a expressão gênica (MILAGRO et al., 2013).

1.1 O tecido adiposo em resposta a dieta

As alterações na composição e acessibilidade aos alimentos, como o aumento do consumo de refeições ricas em calorias e açúcares e baixas em nutrientes vêm colaborando para o aumento da prevalência da obesidade nas últimas décadas. Esse fato demonstra que apesar dos fatores genéticos desempenharem um papel importante na determinação da susceptibilidade do indivíduo para o ganho de peso, são os fatores ambientais e o estilo de vida que geralmente levam a um balanço energético positivo, favorecendo o ganho de peso que eleva a suscetibilidade a diversas doenças como esteatose hepática, diabetes tipo 2, doenças respiratórias e cardiovasculares, síndrome metabólica e alguns tipos de cânceres (MORRIS et al., 2015).

A qualidade ideal de macronutrientes contidos na alimentação para manutenção da saúde ainda é controversa, destacando alimentos ricos em gordura saturada como a principal causa do ganho de peso proveniente do aumento do tecido adiposo (RIPPE E ANGELOPOULOS, 2016a). O crescente empenho mundial em combater a obesidade tem aumentado a substituição da dieta rica em gorduras pela dieta rica em açúcar na tentativa de reduzir a ingestão calórica e o excesso de peso, entretanto, dietas ricas em açúcares e pobres em gordura podem ser pouco eficazes para o controle do peso devido à elevação da glicemia pós-prandial (RIPPE E ANGELOPOULOS, 2016b).

Para ser utilizada pelo tecido adiposo a glicose precisa entrar na célula e, para que isso ocorra, a insulina se liga ao seu receptor na membrana plasmática promovendo mudanças conformacionais que desencadeiam uma cascata de transdução de sinal. Esse receptor tem atividade tirosina quinase e promove a fosforilação de substratos no resíduo de tirosina, ativação de PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) e AKT (proteína quinase B), o que faz com que ocorra a translocação de GLUT4 (proteína 4 transportadora de glicose) para a membrana do adipócito e entrada da glicose na célula (Haczeyni *et al.*, 2017). Dessa forma, há um aumento na síntese de ácidos graxos a partir de glicose, o que leva ao rápido armazenamento de gordura e conseqüente ganho de massa corporal (RIPPE E ANGELOPOULOS, 2016b).

Diante desses fatos, muitos pesquisadores associam a quantidade de aporte calórico e a inatividade física como sendo as principais causas de ganho de peso corporal (RIPPE E ANGELOPOULOS, 2016b). Além disso, alguns estudos mostram que podem ocorrer alterações neuroquímicas no cérebro induzidas pelo consumo de alimentos ricos em açúcar e

ou gordura, causando uma dependência alimentar, que gera um ciclo vicioso e aumenta ainda mais a ingestão de alimentos (MORRIS et al., 2015). Outros estudos mostraram que uma dieta rica em carboidratos adicionada de fibras não causa descontrole glicêmico nem alteração nos perfis lipídicos, apresentando efeitos similares quando comparada a uma dieta com baixos níveis de carboidratos (BUYKEN et al., 2014).

O tecido adiposo é classificado em tecido adiposo branco, bege e marrom e possuem funções distintas. O tecido adiposo marrom promove a termogênese por ser abundante em mitocôndrias e manter a expressão elevada da proteína desacopladora de elétrons UCP-1. Já o tecido adiposo bege é caracterizado por expressar marcadores termogênicos como UCP-1 e PGC-1 α (coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama), exibindo características anatômicas e funcionais que são intermediárias entre os adipócitos marrons e brancos (CANNON, B. E J. NEDERGAARD, 2004).

Durante algum tempo, o tecido adiposo branco foi conhecido como um reservatório de energia sob a forma de triacilgliceróis, porém ele não é tão simplista assim, funciona como isolante térmico e como um órgão endócrino capaz de produzir e liberar adipocinas; uma variedade de hormônios, citocinas e fatores de crescimento que regulam vários processos biológicos e permitem ao organismo se adaptar a diversas situações como estresse, fome, infecções e períodos curtos em que há um excesso no consumo de calorias (RODRÍGUEZ et al., 2015; HACZEYNI et al., 2017). Essas substâncias também estão envolvidas na regulação da homeostase de lipídeos e carboidratos (GALIC et al., 2010; COELHO et al., 2013), e atuam de forma autócrina, parácrina e sistêmica regulando também os sistemas imunológico e vascular (GALIC et al., 2010; OUCHI et al., 2011).

Os adipócitos armazenam o excesso de energia de forma eficiente: uma molécula de lipídeo contém o dobro de energia de uma molécula de glicose. Além disso, por serem de natureza hidrofóbica, o armazenamento dos lipídeos no tecido adiposo se torna mais fácil e ocorre em maior quantidade quando comparado ao armazenamento de glicogênio de natureza hidrofílica (HACZEYNI et al., 2017). De acordo com sua localização anatômica o tecido adiposo branco ainda é classificado como subcutâneo e visceral. Estudos têm demonstrado que o aumento do tecido adiposo visceral que fica localizado entre os órgãos, está associado com o desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e aumento da mortalidade (STANFORD E GOODYEAR, 2016; PEPPLER et al., 2017), já o acúmulo de tecido adiposo subcutâneo é preferido por melhorar a sensibilidade à insulina e

reduzir o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas (STANFORD E GOODYEAR, 2016).

O ganho de peso corporal é proveniente da capacidade que o tecido adiposo tem de aumentar de tamanho para armazenar o excesso de ácidos graxos ou diminuir no estado de jejum ou com a prática de exercício físico (MA et al., 2015; RODRÍGUEZ et al., 2015; GAGGINI et al., 2017). Quando os adipócitos aumentam de tamanho e não há um aumento do gasto energético, essa hipertrofia poderá estimular o aumento do número de células (hiperplasia), caracterizando a adipogênese (HACZEYNI et al., 2017) (Figura 1). O tecido adiposo é fundamental para que o excesso de lipídeos não seja armazenado em outros órgãos gerando uma desordem metabólica. Portanto, para o correto armazenamento do excesso de energia é necessário que ocorra o aumento do número de adipócitos para que se mantenha a homeostase do metabolismo, observado até mesmo em pessoas obesas saudáveis (STEPHENS, 2012).

Esse armazenamento de lipídeos, denominado lipogênese, é estimulado pela insulina e ocorre pela reação de esterificação de três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol formando os triacilgliceróis (HACZEYNI et al., 2017). Portanto, com a manutenção da lipogênese, o tecido adiposo pode sofrer hipertrofia e/ou hiperplasia dependendo das condições ambientais. Esses processos são regulados por diversos fatores de transcrição tais como PPAR γ (receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama), SREBP- 1 (proteína-1 de ligação ao elemento regulatório de esterol), CCAAT-C/EBPs (proteínas CCAAT potenciadoras de ligação) (FARMER, 2006; CHOE et al., 2016; PELLEGRINELLI et al., 2016). Os adipócitos hipertróficos sinalizam através desses fatores de transcrição que estimulam a diferenciação de adipócitos e, dessa forma, há uma tentativa de ajustar o desequilíbrio proveniente do excesso de energia. Esses adipócitos hipertróficos e que também são resistentes à insulina induzem a hiperplasia para que essa resistência possa ser corrigida (HACZEYNI et al., 2017).

O processo contrário à lipogênese, a lipólise, é a hidrólise de lipídeos em ácidos graxos e glicerol e acontece em situações de estresse metabólico, como jejum e exercício físico gerando energia para utilização por outros tecidos. As enzimas que participam na reação de quebra dos triacilgliceróis são a lipase sensível a hormônio e 2-monoacilglicerol lipase. A insulina inibe a enzima lipase sensível a hormônio, enquanto que o glucagon e a adrenalina estimulam. O glicerol sai do adipócito através de canais do tipo aquaporina

enquanto os ácidos graxos são transportados para outros órgãos ligados à albumina e são oxidados para gerar energia (COELHO et al., 2013) (Figura 1).

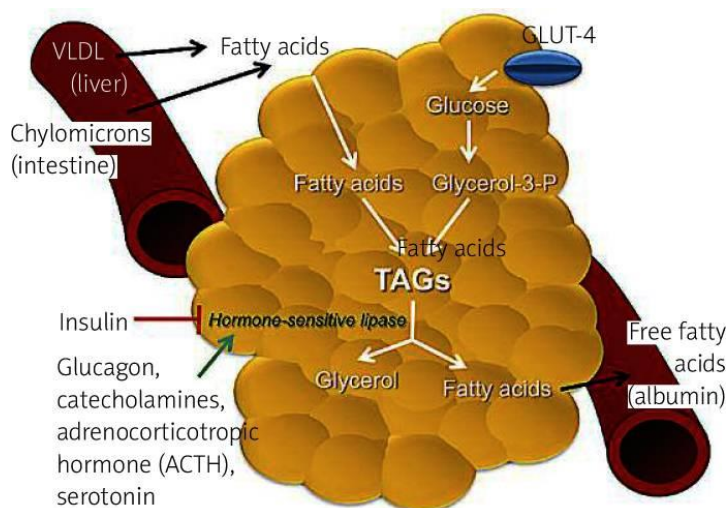


Figura 1: Papel metabólico do tecido adiposo. O transporte de glicose é dependente de insulina. GLUT4 permite a captação de glicose da corrente sanguínea para os adipócitos. Ocorre glicólise produzindo glicerol-3-fosfato, um substrato necessário para a lipogênese. Os ácidos graxos do fígado transportados pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (cVLDL) e os quilomícrons do intestino são esterificados com glicerol-3-fosfato para formar gotículas lipídicas de triacilgliceróis. No estado de jejum e em condições de estresse, a lipase sensível a hormônios é ativada para a lipólise. Alguns passos são necessários para produzir glicerol e ácidos graxos. Esses ácidos graxos livres serão transportados na corrente sanguínea para o fígado, os músculos e outros órgãos a serem oxidados. Na corrente sanguínea, os ácidos graxos são imediatamente ligados à albumina (COELHO et al., 2013).

1.2. O tecido adiposo em resposta a atividade física

O exercício físico aeróbio é conhecido por gerar benefícios metabólicos, como diminuir a adiposidade corporal por induzir a redução no tamanho dos adipócitos e no conteúdo lipídico, melhora o metabolismo da glicose aumentando a lipólise no tecido adiposo branco para fornecer energia ao músculo esquelético e aumenta a expressão de proteínas importantes para a homeostase corporal como GLUT4 e PGC1 α (STANFORD et al., 2015; STANFORD E GOODYEAR, 2016; PEPPLER et al., 2017). Essas melhorias na homeostase metabólica podem ocorrer independentemente de haver perda de massa corporal (STANFORD E GOODYEAR, 2016), demonstrando a importância do exercício físico no metabolismo do tecido adiposo branco. Além disso, o exercício físico regular aumenta a biogênese mitocondrial tanto no músculo esquelético (BARBOSA DE QUEIROZ et al.,

2017) quanto nos tecidos adiposos subcutâneo e visceral (PEPPLER et al., 2017) demonstrado pelo aumento na expressão de PGC1 α nesses tecidos após sessões de exercícios de natação, corrida em esteira e roda voluntária, por períodos que variam de 11 dias à 8 semanas (STANFORD et al., 2015).

Durante o exercício físico, a lipólise no tecido adiposo aumenta de 2,5 à 5 vezes dependendo da intensidade do exercício quando comparada ao repouso, diminui nos minutos seguintes após o exercício mas permanece acima dos níveis de repouso por 24 horas. Paralelamente, 20% desses ácidos graxos liberados são reesterificados nos adipócitos, perfazendo 12% da lipólise. Considerando um adulto, do sexo masculino, 80 kg de massa corporal e 15% gordura, o tecido adiposo é responsável por apenas 4% do gasto energético diário, tendo a noradrenalina e a adrenalina como os reguladores mais importantes do metabolismo, essas catecolaminas se elevam conforme a intensidade e duração do exercício físico, sobressaindo os níveis de adrenalina (TSILOULIS E WATT, 2015).

1.3. O modelo de estudo da adiposidade em resposta a dieta rica em carboidratos simples

A principal causa de obesidade vivenciada durante a infância e adolescência são o sedentarismo e alimentação excessiva baseada em alimentos altamente energéticos, e pode levar a prejuízos na vida adulta já que 85% das crianças obesas se tornam adultos obesos (ANDRICH et al., 2018). O envelhecimento que ocorre desde a infância provoca alterações fisiológicas no organismo como perda de massa muscular com aumento de tecido adiposo visceral. Além disso, ocorre também uma diminuição do gasto energético em repouso e durante atividade física, assim como uma redução na sensibilidade à insulina, ocasionando diretamente doença cardiovascular em adultos jovens, de meia idade e na velhice, aumentando a mortalidade nesses casos (POUDYAL et al., 2012).

Nesse sentido, é importante caracterizar os fenômenos que antecedem o ganho de peso corporal e as doenças metabólicas, tais como resistência à insulina, diabetes tipo 2, obesidade, dentre outras. Camundongos submetidos a dietas obesogênicas apresentaram alterações alimentares e na atividade voluntária, assim como ratos alimentados com uma dieta rica em gordura reduziram os níveis de atividade física em 28%. Essas alterações prejudicam a

homeostase corporal, desequilibrando o sono, a saciedade, o armazenamento e o gasto energético, assim como o metabolismo de glicose e lipídeos (ANDRICH et al., 2018).

Devido ao crescente aumento de casos de obesidade no cenário mundial, tornou-se necessário o estabelecimento de modelos de obesidade induzidos por dieta. Tem sido utilizada uma variedade de dietas, dentre elas, dietas hiperlipídicas e dietas de cafeteria, tendo a palatabilidade como uma característica importante para indução alimentar (BORTOLIN et al., 2018). Apesar de essas dietas apresentarem similaridade às dietas humanas e promoverem hiperfagia e ganho de massa corporal, os ratos Wistar utilizados nesses estudos podem apresentar fenótipos de obesidade diferentes dependendo da dieta utilizada (LUZ et al., 2018).

O grupo de LUZ et al. (2018) mostrou que ratos Wistar alimentados com uma dieta com alto índice glicêmico contendo 21% de proteínas, 4% de lipídeos e 48% de carboidratos, composta por dieta controle, leite condensado e açúcar, tratados por 17 semanas apresentaram índice de adiposidade, massa do tecido adiposo visceral e massa corporal aumentados quando comparado aos animais alimentados com a dieta controle.

Nosso grupo investigou alterações metabólicas em ratos Wistar recém-desmamados alimentados com uma dieta rica em carboidratos simples por 8 e 12 semanas. Os resultados mostram que, com 8 semanas de dieta, os ratos já apresentaram um tecido adiposo retroperitoneal hipertrófico e alterações nas expressões de genes que atuam no metabolismo de lipídeos e diferenciação celular desse tecido. Dessa forma, a ingestão de alimentos ricos em carboidratos refinados pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas durante a vida adulta por aumentar a expressão de genes relacionados à vias pró-adipogênicas, assim como uma diminuição de genes de vias anti-adipogênicas, enfatizando a importância da alimentação pós desmame na primeira infância e durante a puberdade (QUEIROZ et al., 2014). Na mesma linha de pesquisa, estudos recentes do nosso grupo (dados ainda não publicados) revelam que o uso dessa dieta por 18 semanas induz a obesidade e um aumento nos índices de Lee e adiposidade, além de aumentar os níveis de triglicerídeos e cVLDL. Esses resultados sugerem a participação de mecanismos epigenéticos nessa modulação da expressão gênica. Portanto, é de suma importância conhecer os mecanismos induzidos pela interação entre a qualidade dietética e outros fatores ambientais sobre a gênese do aumento da adiposidade corporal (MN et al., 2017).

1.4. Reprogramação epigenética e tecido adiposo: efeito da metilação do DNA

Estudos relatam que a herança genética tem pouca influência para o risco de obesidade (2%) e diabetes tipo 2 (5% a 10%), entretanto, os estudos epigenéticos vêm mostrando as consequências da exposição ao ambiente nutricional pré e pós-natal sobre as doenças metabólicas. O excesso no consumo alimentar ou a desnutrição levam a reprogramação epigenética do tecido adiposo relacionada ao aumento da adiposidade corporal, lipólise e lipogênese, metabolismo da glicose, estresse oxidativo, resposta inflamatória e gasto energético. Dessa forma é de fundamental importância compreender os distúrbios metabólicos derivados de alterações epigenéticas para melhorar as abordagens de prevenção e tratamento das comorbidades associadas (CHENG et al., 2018).

Os diversos tipos celulares respondem de acordo com o ambiente nutricional em que estão inseridos, pois o metabolismo energético se mantém interligado à regulação da expressão gênica através dos mecanismos epigenéticos que são modulados por metabólitos celulares. O metabolismo é o resultado de reações químicas enzimáticas específicas que mantém a homeostase celular frente às modificações ambientais, a exemplo, a diversidade nutricional em que as células são expostas (ETCHEGARAY E MOSTOSLAVSKY, 2016; DE LUCA et al., 2017).

Epigenética é definida como as mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional proveniente de fatores ambientais que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA. Os mecanismos epigenéticos ocorrem por meio da metilação do DNA, modificações pós traducionais das histonas como metilação, acetilação, sumoilação, ubiquitinação e ADP-ribosilação, assim como a regulação por RNAs não codificantes. Em conjunto, esses mecanismos atuam regulando a expressão de genes promovendo a reprogramação do epigenoma (ETCHEGARAY E MOSTOSLAVSKY, 2016; DE LUCA et al., 2017) (Figura 2).

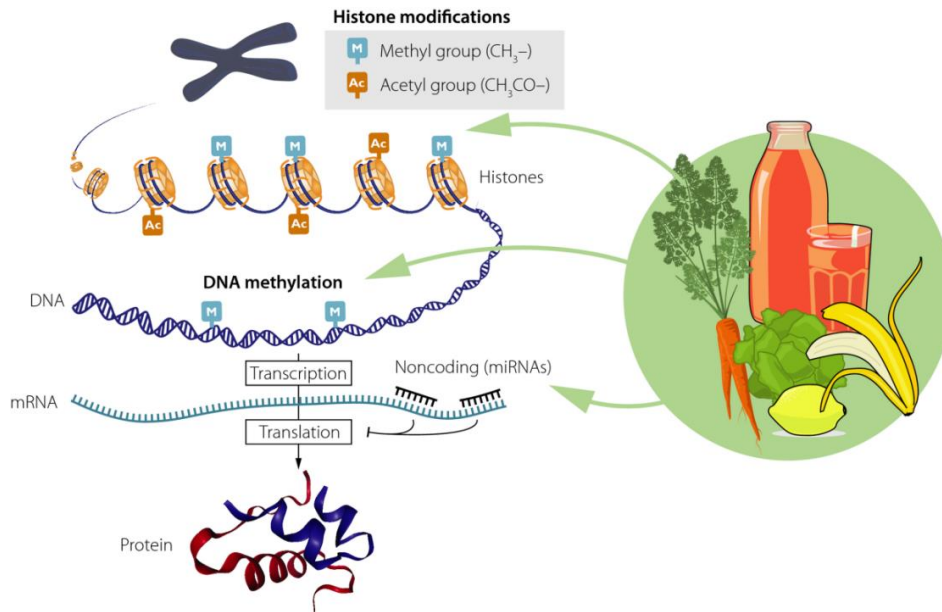


Figura 2: Os grupos metil e acetil que modificam a cromatina e regulam a expressão gênica são derivados de dietas (STOVER et al., 2018).

A metilação do DNA ocorre através da transferência de um grupo metil do doador S-adenil metionina (SAM) para o carbono cinco da citosina através de uma família de enzimas metiltransferases de DNA (DNMTs) para formar a 5-metilcitosina. Na maioria das vezes, a metilação inibe a expressão gênica, enquanto que o processo inverso, a demetilação é geralmente associada à ativação da transcrição gênica (ATTWOOD et al., 2002; DE LUCA et al., 2017).

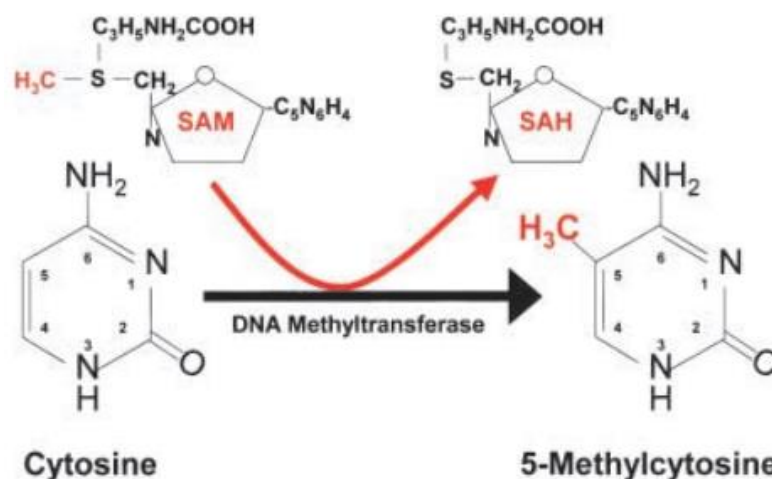


Figura 3: Formação de 5-metilcitosina. Uma enzima DNA metiltransferase catalisa a transferência de um grupo metil (CH₃) de S-adenosilmetionina (SAM) para desoxicitosina, produzindo 5- desoximetilcitosina e S-adenosil-homocistina (SAH).

São dois os mecanismos possíveis que em conjunto estabelecem esse padrão de metilação, a metilação de manutenção (DNMT1) e a metilação *de novo* (DNMT3a e DNMT3b). A enzima DNMT1 atua no momento da replicação para manter o padrão de metilação copiando da fita molde hemimetilada para a fita recém-sintetizada. Já as enzimas DNMT3a e DNMT3b catalisam a metilação em DNA não metilado, após a fertilização, no início do desenvolvimento em células em diferenciação estabelecendo um novo perfil de metilação, o que permite que a célula se transforme em um tipo celular (Figura 4). A metilação ocorre principalmente em locais ricos de bases citosinas ligadas a guaninas, conhecidas como ilhas CpG. As enzimas podem ser recrutadas para os promotores por fatores de transcrição específicos ou simplesmente agir em todas as ilhas CpG que não estejam protegidas por uma proteína. Outro membro da família, a DNMT3L não possui atividade catalítica, mas se associa às DNMT3a e DNMT3b estimulando a atividade dessas enzimas (MOORE et al., 2013).

A enzima metionina transferase catalisa a formação de SAM pela condensação do aminoácido metionina e ATP (adenosina trifosfato). As flutuações nos níveis de SAM servem como sensores metabólicos das células interferindo na atividade das enzimas metiltransferases em resposta à disponibilidade de nutrientes (ETCHEGARAY E MOSTOSLAVSKY, 2016).

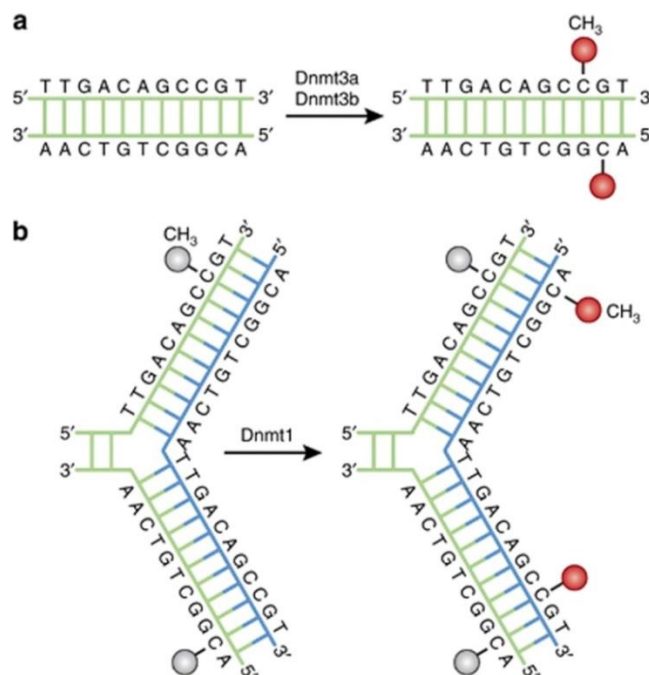


Figura 4: Vias de metilação do DNA. Uma família de DNA metiltransferases (DNMTs) catalisa a transferência de um grupo metila de S-adenosilmetionina (SAM) para o quinto carbono do resíduo de citosina para formar 5-metilcitosina (5- mC). (a) DNMT3a e DNMT3b são as DNMTs *de novo* e transferem os grupos metil (vermelho) para o DNA. (b) DNMT1 é a DNMT de manutenção e mantém o padrão de metilação do DNA durante a

replicação. Quando o DNA sofre replicação semiconservativa, o DNA da fita molde retém o padrão original de metilação do DNA (cinza). DNMT1 associa-se aos focos de replicação e replica com precisão o padrão original de metilação do DNA adicionando grupos metila (vermelho) na fita filha recém-formada (azul) (MOORE et al., 2013).

A demetilação do DNA pode ocorrer de forma passiva ou ativa. A primeira acontece durante a divisão celular, pela inibição da metiltransferase DNMT1 durante a multiplicação celular que faz com que a base citosina recém-incorporada mantenha-se não metilada reduzindo a metilação global a cada divisão das células. Já a demetilação ativa depende de reações enzimáticas e pode ocorrer em células em divisão ou não (JANKE ET AL., 2015; WU E ZHANG, 2017). As enzimas demetilases TETs (enzima dez-onze translocase de DNA) realizam reações sucessivas de oxidação da 5-metilcitosina gerando a 5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina e 5-carboxilcitosina. As duas últimas são reconhecidas pela DNA glicosilase de timina da via de reparo de excisão de bases do DNA (BER) que substitui as bases oxidadas por uma nova base citosina (Figura 5). Dessa forma as proteínas TETs conhecidas, TET1, TET2 e TET3 regulam os níveis de 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina (LI et al., 2015).

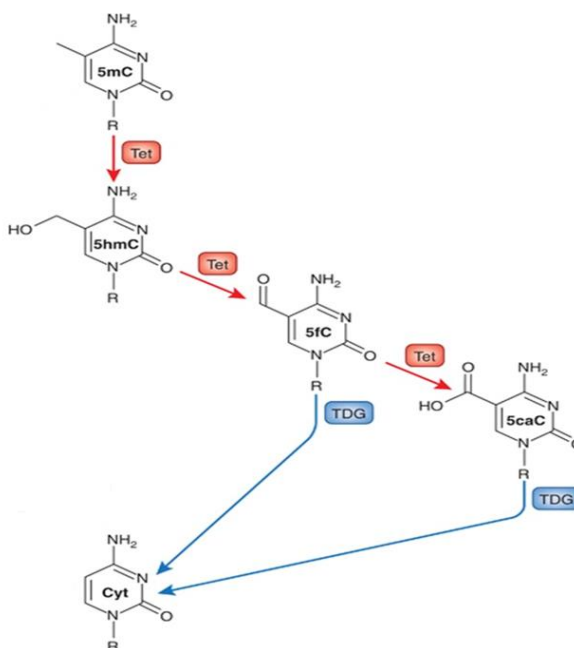


Figura 5: Vias ativas da demetilação do DNA. A 5-metilcitosina (5mC) pode ser quimicamente modificada pela adição de um grupo hidroxila mediado por enzimas TETs para gerar 5-hidroximetilcitosina (5 hmC). 5hmC pode também ser quimicamente modificado para produzir 5-formilcitosina (5fC) e depois 5-carboxilcitosina (5caC). Os produtos são reconhecidos e clivados para serem substituídos por uma citosina pela DNA glicosilase de timina (TDG). Adaptado de (MOORE et al., 2013).

Além da metilação do DNA, a metilação de histonas catalisada pelas histonas metil transferases também utiliza SAM como doador do grupo metila e seus níveis celulares regulam essa modificação pós-traducional. (JANKE et al., 2015; ETCHEGARAY E

MOSTOSLAVSKY, 2016). Para acetilação de histonas o acetil-coA é o metabólito doador de acetil, ele é limitante numa reação catalisada pelas histonas acetiltransferases (JANKE et al., 2015), além de ser dependente da disponibilidade de nutrientes (HERNÁNDEZ-AGUILERA et al., 2016). O acetil-coA é proveniente da degradação de carboidratos e lipídeos através da glicólise e da β -oxidação, respectivamente, e atua como um sensor do estado metabólico ativando genes específicos em resposta à disponibilidade de nutrientes através da acetilação de histonas. Os resíduos de lisina das histonas possuem carga positiva no pH fisiológico, a acetilação dessas lisinas neutraliza essa carga e interrompe a ligação eletrostática entre o DNA e as histonas desfavorecendo a compactação da cromatina que se torna mais frouxa e permissiva a transcrição (JANKE et al., 2015).

Dessa forma, as modificações no DNA e nas proteínas histonas regulam a transcrição gênica modulando a conformação da cromatina e o acesso dos fatores de transcrição ao DNA, e em conjunto com os RNAs não codificantes promovem o silenciamento ou estimulam a expressão gênica, dependente de fatores como a idade, o ambiente e o tecido (BARRÈS E ZIERATH, 2016).

1.5. Sirtuínas no metabolismo

As sirtuínas (reguladores de informação silenciosa, SIRTs) pertencem à família de proteínas deacetilases de histona da classe III (HDACs), com atividade dependente de NAD^+ , são altamente conservadas em procariontes e eucariontes (BLANK E GRUMMT, 2017). Em mamíferos foram identificados sete membros SIRT1-SIRT7, e suas funções e localização celular são variadas (Tabela 1): SIRT1 e SIRT6 estão presentes no núcleo, SIRT7 no nucléolo, enquanto SIRT3, SIRT4 e SIRT5 são encontradas principalmente nas mitocôndrias e SIRT2 é citossólica (MEI et al., 2016). Além de remover grupos acetil de resíduos de lisina em proteínas histonas e não histonas, as sirtuínas também atuam como mono-ADP-ribosiltransferase, (SIRT4), demalonilase e desuccinilase (SIRT5), dessa forma elas desempenham importantes funções nos processos fisiológicos, tais como reparo do DNA, regulação da transcrição gênica, do metabolismo lipídico e da glicose (KURYLOWICZ, 2016; MEI et al., 2016).

Tabela 1: Localização e funções das Sirtuínas.

Sirtuína	Localização celular	Funções	Referências
1	Núcleo	Melhora a intolerância à glicose e a resistência à insulina. Inibe a adipogênese.	(CHALKIADAKI E GUARENTE, 2012; KURYLOWICZ, 2016; MEI et al., 2016; ZHOU et al., 2016)
2	Citosol	Inibe a adipogênese.	(JOKINEN et al, 2017; KURYLOWICZ, 2016; MEI et al., 2016)
3	Mitocôndria	Produção de energia mitocondrial e homeostase metabólica, regulando o metabolismo de ácidos graxos.	(KURYLOWICZ, 2016; LOMBARDE ZWAANS, 2014; MEI et al., 2016)
4	Mitocôndria	Regula a homeostase lipídica.	(KURYLOWICZ, 2016; MEI et al., 2016; ZHOU et al., 2014)
5	Mitocôndria	Anabolismo lipídico.	(KURYLOWICZ, 2016; MEI et al., 2016; ZHOU et al., 2014)
6	Núcleo	Melhora a detecção de glicose e regula a secreção de insulina. Inibe a gliconeogênese hepática e a síntese de triglicérides e reduz a adipogênese corporal.	(BAE, 2017; KURYLOWICZ, 2016; MEI et al., 2016; SONGMY, 2016)
7	Nucléolo	Melhora o metabolismo da glicose e lipídeos. Inibe a adipogênese.	(FANG et al, 2017; KURYLOWICZ, 2016; MEI et al., 2016; YE et al, 2017)

Na reação de deacetilação, a enzima sirtuína hidrolisa NAD^+ em nicotinamida e ADP-ribose, em seguida, transfere o grupo acetil do substrato para o grupo 2'-OH do anel de ribose na molécula de ADP-ribose (NOGUEIRAS et al., 2012). Os produtos finais desta reação são nicotinamida, 2'-O-acetil-ADP-ribose e uma proteína deacetilada (Figura 6).

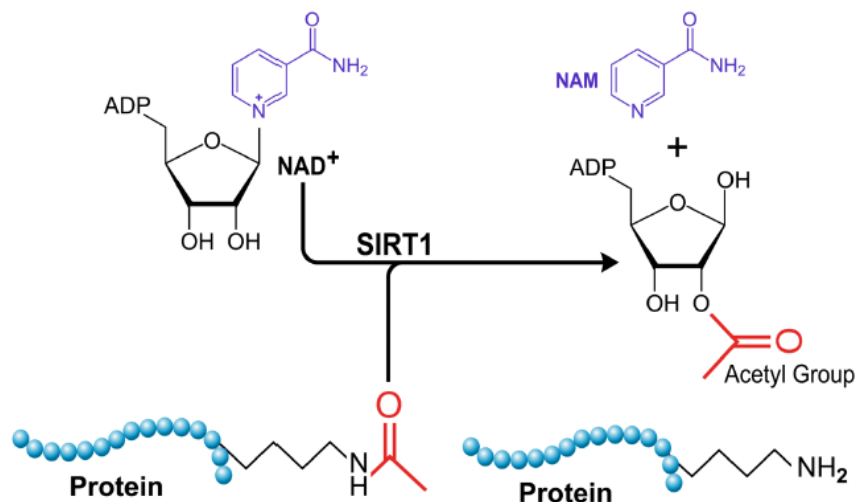


Figura 6: Reação de deacetilação por uma Sirtuína. SIRT1 utiliza NAD⁺ como um co-substrato para clivar grupos acetil de proteínas alvo (SCHUG E LI, 2011).

SIRT1 deacetila várias proteínas não histonas envolvidas em processos como apoptose, ciclo celular e metabolismo. O aumento na expressão dessa enzima em camundongos induziu uma redução na adiposidade, nos níveis de colesterol e insulina (NOGUEIRAS et al., 2012). SIRT1 regula negativamente a adipogênese por inibir a sinalização de PPAR γ . A deleção específica de *Sirt1* em adipócitos aumentou a adipogênese no tecido adiposo branco de camundongos alimentados com uma dieta rica em lipídeos, aumentando a hiperplasia e a massa do tecido, assim como a acetilação de PPAR γ . Além disso, a ativação dessa enzima tanto em camundongos quanto em células de pré-adipócitos humanos reduz os níveis de expressão de genes da via da lipogênese e da enzima acetil-coA carboxilase, uma enzima chave nesse processo, inibindo a lipogênese no tecido adiposo branco. SIRT1 também retarda o aparecimento de resistência à insulina e intolerância à glicose no tecido adiposo humano durante o envelhecimento, assim como sua inibição induz um efeito contrário em ratos alimentados com uma dieta rica em lipídeos (CHANG E GUARENTE, 2014).

O aumento da expressão de SIRT2 também exerce um efeito inibitório sobre a diferenciação de adipócitos, enquanto que sua redução a estimula. O mecanismo parece ser mediado pela deacetilação de FOXO1 e subsequente repressão da atividade transcricional de PPAR γ em adipócitos, *in vitro* (BÄCKESJÖ et al., 2006; YE ., 2017). Além disso, a deacetilação de carboxiquinase de fosfoenolpiruvato mediada pela SIRT2 diminui sua

ubiquitinação, modulando a gliconeogênese. No músculo esquelético, a expressão negativa de SIRT2 promove uma melhora na resistência à insulina, dessa forma SIRT2 regula o metabolismo de glicose, assim como a adipogênese no tecido adiposo (YE et al., 2017).

Camundongos nocaute do gene *Sirt3* resultou em uma série de anormalidades, como o desenvolvimento de síndrome metabólica e obesidade induzida por dieta, enquanto que a superexpressão de *Sirt3* aumentou a taxa metabólica, reduziu os depósitos de gordura, melhorou a resistência à insulina e protegeu contra a inflamação induzida pela obesidade (MILNE et al., 2007; GILLUM et al., 2011). SIRT3 tem como alvos proteínas que promovem a produção de energia celular, tais como acil-coA desidrogenase de cadeia longa, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coA sintase 2, isocitrato desidrogenase 2 e glutamato desidrogenase. Dessa forma, SIRT3 pode modular vias metabólicas mitocondriais do metabolismo de lipídeos podendo ser usada inclusive para impedir que ocorra lipotoxicidade hepática (PARIHAR et al., 2015) e ainda, pela ativação da enzima superóxido dismutase 2 protege as células das espécies reativas de oxigênio (YE et al., 2017).

SIRT4 induz o anabolismo de lipídeos por deacetilar e inativar a enzima malonil-coA descarboxilase aumentando a concentração de malonil-coA que, juntamente com acetil-coA são os metabólitos que dão início a biossíntese de ácidos graxos. Além disso, malonil-coA inibe a carnitina palmitoil transferase I, que transporta ácidos graxos para a matriz mitocondrial para que ocorra a β -oxidação e, dessa forma, inibe a oxidação de lipídeos durante o estado alimentado (CHEN et al., 2015; KUMAR E LOMBARD, 2018). SIRT4 também catalisa a ADP-ribosilação de glutamato desidrogenase, uma enzima que atua na conversão de glutamato em cetoglutarato, dessa forma SIRT4 reduz a atividade da glutamato desidrogenase e subsequente diminuição da secreção de insulina induzida por aminoácidos (CHEN et al., 2015).

Vários estudos sugerem que SIRT5 exerce funções na homeostase celular e metabólica regulando várias enzimas que operam nas vias da glicólise, do ciclo do ácido cítrico e na cadeia de transporte de elétrons (KUMAR E LOMBARD, 2018) em reações de desuccinilação, desmalonilação e desglutilação, removendo os grupos succinil, malonil e glutaril de resíduos de lisina (BRINGMAN-RODENBARGER et al., 2018). SIRT5 é bem conhecida por deacetilar e ativar a enzima carbamoil fosfato sintetase I, uma enzima chave que catalisa o primeiro passo do ciclo da ureia, uma série de reações para produção de ureia a partir de amônia (VASSILOPOULOS et al., 2011; KUMAR E LOMBARD, 2018).

SIRT6 também controla o metabolismo de lipídeos e de glicose. Camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica apresentaram uma redução da lipogênese através da redução nos níveis de triacilgliceróis devido a um aumento na expressão de SIRT6 no tecido adiposo branco, enquanto que a inibição de SIRT6 induz a expressão de genes relacionados à lipogênese hepática e síntese de triglicerídeos, assim como inibe genes da via da β -oxidação. SIRT6 também inibe a sinalização da insulina, pois regula a fosforilação de AKT por IRS1 e IRS2 diminuindo o deslocamento de GLUT1 e GLUT4 para a membrana celular, assim como a deficiência de SIRT6 induz um aumento de GLUT 1 e GLUT4 provocando hipoglicemia (YE et al., 2017).

SIRT7 estimula o aumento do número de células adiposas, em camundongos nocaute para *Sirt7* a expressão de genes envolvidos no processo de adipogênese foi diminuída, assim como o número de células com capacidade adipogênica. Em células de pré-adipócitos humanos a deleção de *Sirt7* fez com que houvesse uma diminuição da captação de lipídeos por essas células, assim como inibiu a diferenciação celular (JOKINEN et al., 2017). Estudos indicam que SIRT7 exerce funções importantes no metabolismo lipídico no fígado, dois deles mostraram que camundongos nocaute tiveram genes da via lipogênica superexpressos, aumento nos níveis de triglicerídeos plasmáticos e esteatose hepática (SHIN et al., 2013; RYU et al., 2014). Em contradição, outro grupo de pesquisadores mostrou que os camundongos nocaute para SIRT7 não apresentaram intolerância à glicose nem obesidade quando alimentados com uma dieta hiperlipídica, assim como foram resistentes ao desenvolvimento de esteatose hepática (YOSHIZAWA et al., 2014).

Portanto, considerando que o aumento da adiposidade corporal promove alterações metabólicas crônicas e fatais provenientes do sedentarismo e de uma alimentação desequilibrada inclusive nos momentos iniciais da vida, ao mesmo tempo em que as sirtuínas são mediadores centrais da adaptação metabólica à disponibilidade de nutrientes, e que o tecido adiposo exibe uma plasticidade modulada pela exposição ao ambiente nutricional, investigamos se a associação entre a dieta rica em carboidratos simples e o treinamento físico de natação pode induzir alterações metabólicas que promovam a reprogramação epigenética e alteração de sirtuínas no tecido adiposo retroperitoneal de ratos em um período precoce da vida na transição das fases infanto-juvenil.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da dieta rica em carboidratos simples e do treinamento físico de natação sobre a modulação epigenética e expressão gênica de *sirtuínas* no tecido adiposo retroperitoneal de ratos Wistar jovens.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito da dieta rica em carboidratos simples e do treinamento físico sobre o ganho de massa corporal e consumo alimentar.
- ✓ Avaliar o efeito da dieta e do treinamento físico sobre a distribuição dos depósitos de gordura e adiposidade corporal.
- ✓ Avaliar o efeito da dieta e do treinamento físico sobre parâmetros bioquímicos séricos.
- ✓ Analisar a celularidade e o conteúdo lipídico do tecido adiposo retroperitoneal.
- ✓ Avaliar o perfil do conteúdo global de metilação do DNA do tecido adiposo retroperitoneal.
- ✓ Avaliar o perfil de metilação dado pela expressão de metilases e desmetilases.
- ✓ Avaliar o efeito da dieta e do treinamento físico sobre os níveis de expressão de *sirtuínas* no tecido adiposo retroperitoneal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental

3.1.1. Cálculo amostral, animais e dieta

Ratos Wistar machos recém-desmamados (40–60g) com 21 dias de idade, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP, foram alojados em gaiolas individuais sob condições de luz e temperatura ($24,0 \pm 2,0$ °C) controladas, com água e dietas fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Ética em Cuidados de Animais Experimentais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob o protocolo nº 2014/45.

Os animais dos grupos controles foram alimentados com ração comercial para ratos (Nuvilab CR1, Colombo, Brasil) (Tabela 2), enquanto que, os ratos dos grupos experimentais foram tratados com uma dieta rica em carboidratos simples (68% de carboidratos), composta por 33% de ração comercial (Nuvilab CR1, Colombo, Brasil), 33% de leite condensado e 7% de açúcar (DE QUEIROZ et al., 2014) durante os períodos de 4 e 8 semanas.

Para o cálculo da estimativa amostral foi utilizado o teste de comparação de médias do programa Biostat versão 5.0. O cálculo foi baseado na atividade da creatina quinase que apresentou diferenças mínimas entre as médias de 63 e erro padrão da média de 27. Foram utilizados nível de significância (α) de 0,05 e poder de teste de 0,95 (SAKR, 2013), a estimativa amostral foi de no mínimo 7 repetições por grupo.

Ao completarem 28 dias de idade, 46 ratos foram divididos em quatro grupos: 1) ratos sedentários tratados com uma dieta controle (SDC, N = 12), 2) ratos sedentários tratados com uma dieta rica em carboidratos simples (SCS, N = 12), 3) ratos treinados e tratados com uma dieta controle (TDC, N = 11), 4) ratos treinados e alimentados com uma dieta rica em carboidratos simples (TCS, N = 11). Estes grupos foram subdivididos em dois períodos distintos de alimentação com a dieta rica em carboidratos simples juntamente com o treinamento físico de natação com carga de trabalho: 4 semanas (N = 24) e 8 semanas (N = 22).

Tabela 2: Composição básica da ração Nuvilab CR-1.

Composição	Quantidade
Umidade	125 g/kg
Proteína Bruta	220 g/kg
Extrato Etereo	40 g/kg
Materia mineral	90 g/kg
Fibras	70 g/kg
Cálcio	10-14 g/kg
Fósforo	8 mg/kg
Vitamina A	13000 UI/kg
Vitamina D3	2000 UI/kg
Vitamina E	34 UI/kg
Vitamina K3	3 UI/kg
Vitamina B1	5 mg/kg
Vitamina B2	6 mg/kg
Vitamina B6	7 mg/kg
Vitamina B12	22 mcg/kg
Niacina	60 mg/kg
Pantotenato de cálcio	20 mg/kg
Ácido Fólico	1 mg/kg
Biotina	0,05 mg/kg
Colina	1900 mg/kg
Ferro	50 mg/kg
Sódio	2700 mg/kg
Manganês	60 mg/kg
Zinco	60 mg/kg
Cobre	10 mg/kg
Iodo	2 mg/kg
Selênio	0,05 mg/kg
Cobalto	1,5 mg/kg
Flúor	80 mg/kg
Lisina	12 g/kg
Metionina	4000 mg/kg
Butil-hidroxitolueno	100/kg

3.1.2. Treinamento físico de natação com carga de trabalho

Durante o período de 4 e 8 semanas os animais foram treinados em piscina de azulejo do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, em água morna na temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. O treinamento físico regular começou com um período de adaptação. A primeira sessão durou 15 minutos, sendo aumentados diariamente (30 e 45 minutos) até atingir 60 minutos, após essa semana de adaptação, os animais treinaram sem sobrecarga, diariamente durante 60 minutos, cinco dias por semana. Após o período de

treinamento sem carga, as cargas confeccionadas com fio de solda foram adicionadas à cauda do animal para realização do treinamento (MARIANA A. V. CARMO et al., 2017) (Tabela 3).

Tabela 3: Esquema de sobrecarga de peso durante o treinamento físico de natação: 4 e 8 semanas.
TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

Grupo (TDC e TCS)		
Acréscimo de carga (% em relação à massa corporal)		
Semana	4 semanas	8 semanas
1^a	-	-
2^a	-	-
3^a	2	2
4^a	3	2
5^a	-	3
6^a	-	3
7^a	-	3
8^a	-	3

3.2. Determinação do consumo alimentar e evolução do ganho de massa corporal

O consumo alimentar dos animais foi mensurado durante todo o período experimental. A ingestão calórica foi calculada multiplicando-se o consumo alimentar pela densidade energética da dieta controle (3,06 kcal/g) e dieta rica em carboidratos simples (2,87 kcal/g) (BARBOSA DE QUEIROZ et al., 2017).

Os animais foram pesados semanalmente, e o ganho de massa foi calculado subtraindo-se a massa corporal final da inicial (PERERA et al., 2018).

3.3. Parâmetros biométricos

Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados, e os tecidos adiposos marrom, epididimal, inguinal, retroperitoneal e o sangue foram coletados para análise. O peso relativo dos tecidos adiposos (PERERA et al., 2018), o Índice de Lee (LEE, 1929) e o Índice de Adiposidade (COX et al., 1985; LEVIN, 1992) foram calculados como se segue:

$$\text{Peso relativo do órgão (g/100g)} = [\text{peso órgão (g)} * 100] / \text{peso corporal (g)}$$

$$\text{Índice de Lee} = [\text{peso corporal (g)}]^{1/3} / \text{comprimento naso-anal (cm)} \times 1000$$

$$\text{Índice de Adiposidade} = 100 \times [\text{soma das massas dos depósitos de gordura (g)} / \text{peso corporal (g)}]$$

3.4. Análise dos parâmetros bioquímicos

Os níveis séricos de glicose, triglicérides, colesterol total, HDL-colesterol (cHDL) e LDL-colesterol (cLDL), ureia, creatinina, ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) foram dosados em um analisador automático (Wiener Lab, CM 200, São Paulo, Brasil), com kits (Bioclin, Minas Gerais, Brasil) pelo Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (LAPAC/UFOP), seguindo as recomendações do fabricante.

3.4.1. Dosagem de Insulina

Os níveis de insulina foram determinados pelo método de imunoenensaio do tipo ELISA sanduíche utilizando o *Kit Rat / Mouse Insulin (Millipore, USA)*, conforme recomendações do fabricante. O método se baseia na captura da insulina presente no soro por anticorpos monoclonais de insulina de rato. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro e utilizada para determinar a concentração de insulina que foi calculada

a partir da construção de uma curva padrão de função logarítmica de quatro parâmetros nas concentrações de (0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 ng/mL) (Figura 7).

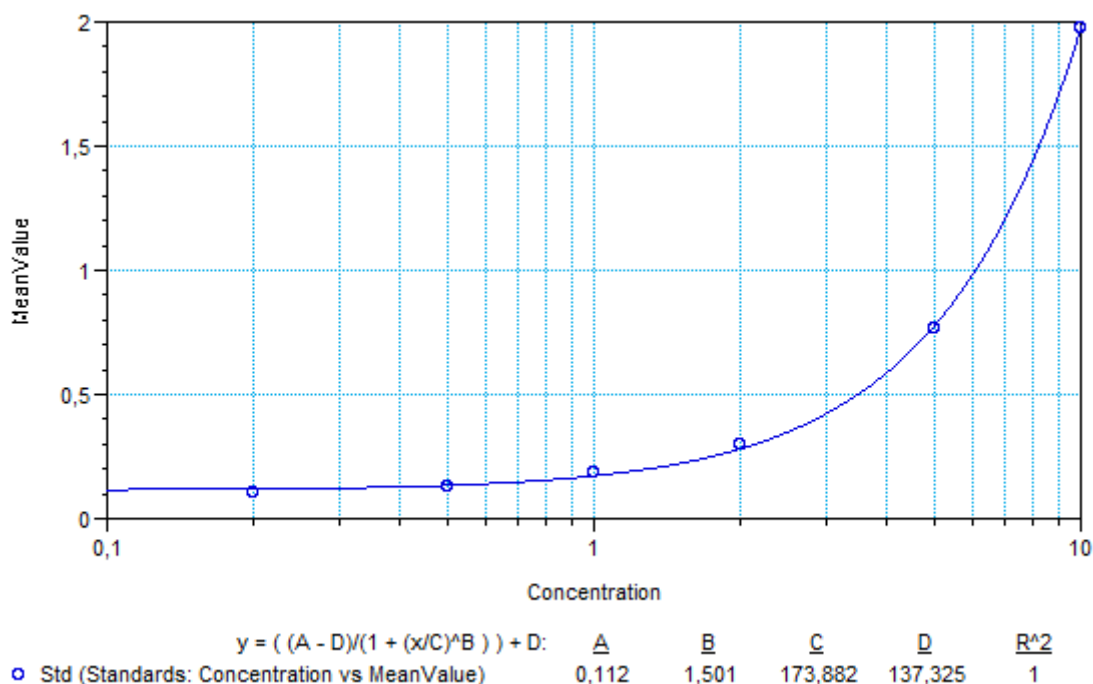


Figura 7: Curva padrão referente a dosagem de insulina no soro de ratos. Em X estão demonstrados os valores da leitura de absorvância de 6 diluições de padrões de insulina e em Y os valores de concentração correspondentes.

Para análise da resistência à insulina e função das células beta pancreáticas, foram feitos os cálculos de HOMA-IR e HOMA- β respectivamente, a partir das seguintes fórmulas (Matthews *et al.*, 1985):

HOMA - IR - Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina

$$HOMA - IR = (IJ \times GJ) / 22,5$$

HOMA - β - Modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional das células β

$$HOMA - \beta = (20 \times IJ) / (GJ - 3,5)$$

IJ = Insulinemia de jejum em mU/L

GJ = Glicemia de jejum em mmol/L

3.5. Análises histológicas

O tecido adiposo retroperitoneal foi fixado em metanol-DMSO (8:2) submetido ao processamento, inclusão e microtomia (4mm de espessura). Os cortes histológicos foram corados por hematoxilina-eosina e a análise de morfometria foi realizada para avaliar o processo de hipertrofia e hiperplasia. Foi realizado o teste de estabilidade da amostra (NOGUEIRA-PAIVA et al., 2014) para determinar o número médio de adipócitos a serem analisados por animal, dessa forma, foram analisadas as áreas de 25 adipócitos por animal (média de 125 adipócitos por grupo) (QUEIROZ et al., 2014). As lâminas foram visualizadas e as imagens digitalizadas através da objetiva de 40x e da microcâmara *Leica DFC340FX* associada ao microscópio *Leica DM5000B* alocados no Laboratório Multiusuário de Microscopia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. A medida da área dos adipócitos foi realizada com auxílio do *software ImageJ (1.38)* e uma estimativa do número de adipócitos foi realizada utilizando o *software Leica Qwin V3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha.)*

3.6. Extração de lipídeos

O conteúdo lipídico do tecido adiposo retroperitoneal foi determinado como descrito pelo método de *Folch* (FOLCH et al., 1957). Aproximadamente 100 mg de tecido foram homogeneizados com 1266 µL de clorofórmio em um homogeneizador do tipo Politron e, em seguida foram adicionados 0,660 µL de uma solução de clorofórmio-metanol (2:1). O conteúdo foi transferido para um tubo de vidro e homogeneizado com auxílio de vórtex por 3 minutos. Foram adicionados 400 µL de metanol e essa mistura permaneceu em incubação à temperatura ambiente por 30 minutos, a seguir, foi centrifugado por 10 minutos à 3370 *xg*. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de vidro previamente pesado e foram adicionados 800 µL de clorofórmio e 640 µL de NaCl 0,73%. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex por 1 minuto e centrifugado por 10 minutos a 3370 *xg*. O sobrenadante foi descartado e a parede do tubo foi lavada por 3 vezes com 600 µL de solução de *Folch* [clorofórmio-metanol-água (3:48:47)]. O sobrenadante foi descartado e os vestígios de solvente foram secos em estufa semiaberta a 40°C até completa evaporação. O tubo foi

novamente pesado e os lipídeos foram ressuspensos em 500 µL de isopropanol. A quantidade de lipídios extraída foi calculada, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ lipídios} = [\text{massa de lipídios (g)} / \text{massa da amostra (g)}] \times 100$$

3.6.1. Dosagem do conteúdo lipídico do tecido adiposo retroperitoneal

A determinação da variedade de lipídeos no tecido adiposo retroperitoneal foi realizada através das dosagens de colesterol e triglicérides utilizando os kits comerciais da Labtest (Lagoa Santa–MG, Brasil), conforme instruções do fabricante. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro.

3.7. Extração de gDNA

A extração de DNA genômico do tecido adiposo retroperitoneal foi realizada utilizando-se a metodologia do CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) (SAMBROOK), no qual 100 mg de tecido foram macerados em nitrogênio líquido em um gral de porcelana. Posteriormente, os macerados foram transferidos para tubos tipo *ependorf* e foram adicionados 1200 µL de tampão TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5), 100 µL de solução de N- lauril sarcosinato de sódio a 10%, 10 µL de solução de proteinase k (20 mg/mL). Os tubos foram então vigorosamente homogeneizados em vórtex por 1 minuto e incubados por 16 horas a 55°C. Após esse procedimento, foram adicionados 100 µL de cloreto de sódio (NaCl) (5 M) em cada tubo, seguido de agitação em vórtex por 1 minuto. Em seguida, 80 µL de solução de CTAB/NaCl (10% de CTAB em 0,7 M de NaCl) foram adicionados em cada amostra, seguido de homogeneização por inversão dos tubos (10 vezes). Após incubação por 10 minutos a 65°C, o volume de cada tubo foi igualmente dividido em dois tubos e adicionou-se igual volume de clorofórmio, seguido de agitação em vórtex por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas a 12000 *xg* por 15 minutos, 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com subsequente adição de igual volume de clorofórmio, seguido de homogeneização em vórtex por 1 minuto. Após centrifugação a 12000 *xg* por 15 minutos a 4°C, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo, adicionou-se igual volume de

isopropanol e homogeneizou-se cada amostra por inversão do tubo (5 vezes). Após incubação por 30 minutos à -20°C, as amostras foram centrifugadas a 12000 *xg* por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. O *pellet* de DNA foi lavado por duas vezes com 1 mL de etanol a 70% e centrifugação a 12000 *xg* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram deixadas para secar a temperatura ambiente até não haver vestígios de álcool. O *pellet* de DNA foi ressuscitado em 20 µL de tampão TE contendo 2,0 µL de RNAase (10 mg/mL). Após incubação à temperatura ambiente por 30 minutos, as amostras foram ressuscitadas em banho-maria à 37°C por 2 horas e quantificadas por meio de reação de fluorescência utilizando o kit *Qubit™ dsDNA HS Assay e o Fluorímetro Qubit® 3.0* da *Thermo Fisher Scientific*. A qualidade do DNA genômico extraído foi avaliada em gel de agarose 0,6 % (Figura 8). O DNA extraído foi armazenado a 8°C até seu uso.

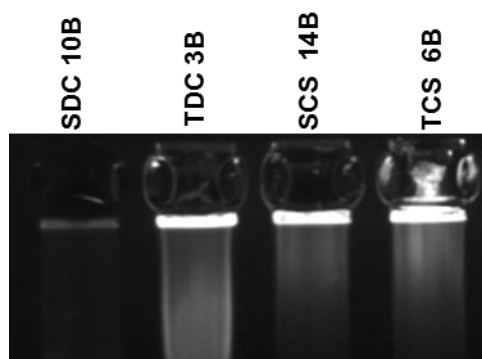


Figura 8: Análise da qualidade do gDNA em gel de agarose a 0,6 %. 500 ng de gDNA foram aplicados em um gel de agarose, em tampão TBE e corados com brometo de etídio. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples. B- 8 semanas

3.8. Quantificação da metilação global do DNA no tecido adiposo retroperitoneal por Imunoensaio Enzimático (ELISA) dos animais tratados por 8 semanas

O ensaio de quantificação de metilação do DNA foi realizado por meio do kit *5-mC DNA ELISA (ZYMO RESEARCH)*, segundo as orientações do fabricante. Este ensaio foi realizado em triplicata, inicialmente foi preparada uma curva padrão contendo controles positivos (DNA metilado) e controles negativos (DNA não metilado) (Tabela 4) e os valores de absorvância obtidos foram plotados versus a porcentagem de 5- metilcitosina de cada controle. As leituras foram realizadas em 450 nm no aparelho VICTOR™ X3 e para determinar as porcentagens de 5-metilcitosina para as amostras foi utilizada a equação

derivada da regressão logarítmica de segunda ordem, obtida pela curva padrão (Figura 9). As amostras e os controles foram ajustados para a concentração de 100ng/100µL e submetidos à desnaturação.

**Tabela 4: Preparação utilizando controles negativo e positivo para construção da curva padrão. %5-mC-
%5 - metilcitosina**

% 5-mC	Controle negativo	Controle positivo
0 %	10 µL (100ng/ µL)	0 µL
0,5 %	9,95 µL (100ng/ µL)	1 µL (5ng/ µL)
1,0 %	9,9 µL (100ng/ µL)	2 µL (5ng/ µL)
2,5 %	9,75 µL(100ng/ µL)	5 µL (5ng/ µL)
5 %	9,5 µL (100ng/ µL)	0,5 µL (100ng/ µL)
10 %	9,0 µL (100ng/ µL)	1,0 µL (100ng/ µL)

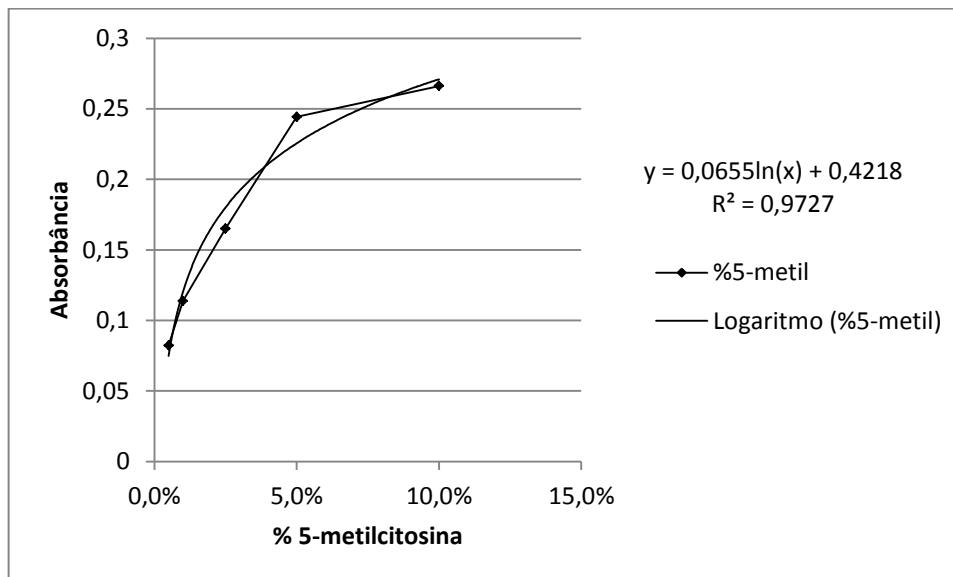


Figura 9: Curva padrão referente à preparação de DNA metilado e não metilado. Em X estão demonstrados os valores de porcentagem de 5-metilcitosina e em Y os valores de absorbância correspondes a cada preparação. Os valores de *slope* e de coeficiente de linearidade estão representados a direita do gráfico.

3.9. Análise da expressão gênica

3.9.1. Extração de RNA

O RNA total foi extraído do tecido adiposo retroperitoneal utilizando Trizol® (*Invitrogen*, São Paulo, Brasil) e clorofórmio (*Sigma-Aldrich*), foi purificado através do kit (*SV Total RNA Isolation System - Promega*). Um homogeneizador tipo Politron foi utilizado para homogeneizar 100 mg de tecido com 1 mL de Trizol em 3 a 4 pulsos por 30 segundos com intervalo de 1 minuto no gelo. O homogenato permaneceu em incubação por 16 horas à 4°C. Após esse período de incubação, foi deixado em temperatura ambiente por 5 minutos e a ele foi adicionado 400 µl de clorofórmio. Essa mistura foi homogeneizada por 1 minuto com auxílio de um agitador tipo vórtex, seguido de uma incubação por 25 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada centrifugação dos homogenatos a 12000 *xg* por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante aquoso foi transferido para um novo tubo tipo *ependorf* e foi adicionado novamente 400 µl de clorofórmio seguido de nova homogeneização em vórtex e centrifugação por 2 minutos a 12000 *xg*, 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado com 600 µl etanol 95% (*Sigma ST. Louis, MO, USA*) por inversão do tubo e, posteriormente foi transferido para a coluna de retenção de ácidos nucleicos proveniente do kit. Em seguida, o RNA foi purificado conforme instruções do fabricante e quantificado através do aparelho *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer® (ThermoFischer SCIENTIFIC)* no qual também foi verificado o grau de pureza pela relação 260/280. Razões acima de 1,8 foram aceitas para a síntese de cDNA, a qualidade do RNA foi avaliada por gel de agarose a 1,2% (Figura 10).

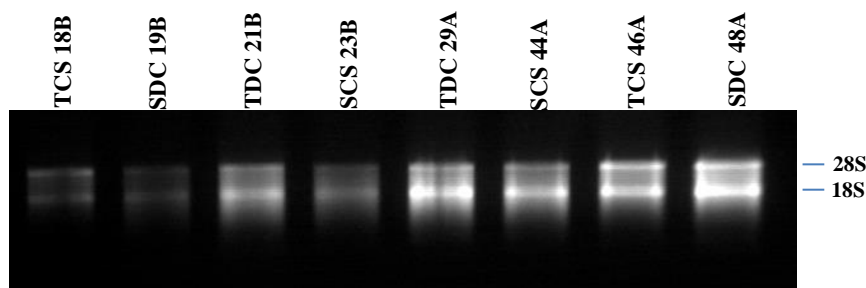


Figura 10: Gel de agarose 1,2% representativo da qualidade do RNA. 1 a 2 ug de RNA total foram desnaturados e aplicados em um gel de agarose, em tampão TBE e corados com brometo de etídio. SDC - sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples. A - 4 semanas, B - 8 semanas.

3.9.2. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 µg de RNA total e o kit *High-Capacity cDNA RT-Applied* seguindo os protocolos do fabricante. À reação total foi adicionado água livre de nuclease (volume final 10 µL), 2 µL tampão RT 10x, 2 µL *Random Primer* 10x, 0,8 µL dNTP 25x e 1 µL da enzima *Multiscribe Reverse Transcriptase*, em um volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, e após esse período a enzima foi inativada à 85°C por 5 minutos. As amostras foram armazenadas em -80°C.

3.9.3. Seleção do controle endógeno

A expressão do gene normalizador deve ser constante entre as amostras analisadas e com abundância semelhante ao gene alvo. Para a escolha desse gene foi realizada a análise dos dados da expressão gênica para três controles endógenos: *Gapdh*, *rRNA18s* e *Hprt1*. Os resultados foram analisados utilizando o software *NormFinder*, que estima a variação na expressão dos genes. Quanto maior a estabilidade do gene, menor o valor gerado (ANDERSEN et al., 2004). O gene que apresentou menor variação foi o *rRNA18s*, porém tem expressão relativamente alta em relação aos alvos, por essa razão, o gene normalizador que se mostrou mais apropriado e que foi utilizado nesse trabalho foi o *Hprt1*.

3.9.4. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real

A amplificação por PCR foi realizada utilizando *Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix* que contém a enzima *Taq* DNA polimerase, dNTPs e *SYBR Green* como corante intercalante. Para a reação foram adicionados 3 µL de primer, 2 µL de cDNA (100 µg) e 5 µL de *SYBR*. As análises foram realizadas em triplicata, utilizando o gene *Hprt1* como normalizador, as sequências dos *primers* são apresentadas na Tabela 5.

As reações foram submetidas às mesmas condições de análise e a quantificação gênica relativa foi determinada no aparelho 7300 *Real-Time PCR (Applied Biosystems)* onde, a intensidade do amplicon é comparada à referência passiva ROX. O resultado expresso em

valor de CT se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção.

Os níveis de expressão relativa foram calculados a partir do Δ CT relacionado ao gene normalizador (*Hprt1*). Para detectar as alterações na expressão gênica nos grupos submetidos à ingestão de dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação os valores de Δ CT para cada amostra foram comparados com o nível médio de Δ CT do grupo sedentário dieta controle (grupo calibrador), calculando assim o ($2^{-\Delta\Delta CT}$). O grupo calibrador foi considerado expresso 1x, assim as expressões relativas aos outros grupos foram consideradas n-vezes (*fold change*) em relação ao grupo calibrador.

Tabela 5: Primers, número de acesso no GenBank, e sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.

Gene	Número de acesso no GenBank	Sequência
<i>Hprt1</i>	NM_012583.2	<i>Forward:</i> GCA GAC TTT GCT TTC CTT GG <i>Reverse:</i> ATC CAA CAC TTC GAG AGG TCC
<i>Dnmt1</i>	NM_053354.3	<i>Forward:</i> GAG CCC AGC CCA GAG TAT GC <i>Reverse:</i> ATG GCA GAA GGA GGA ACA GT
<i>Dnmt3a</i>	XM_017594268.1	<i>Forward:</i> CTG GCA AGG CTG TGG AGG TG <i>Reverse:</i> GGT GGG GGT GGG GCA TAA GC
<i>Dnmt3b</i>	NM_001003959.1	<i>Forward:</i> GCT GGT GGC TCT GGG TCT GT <i>Reverse:</i> AGG GCG GCT GGG GAA GGT CT
<i>Tet2</i>	XM_227694.8	<i>Forward:</i> CCC AGG AAA GCA CAG ACA TAG <i>Reverse:</i> AGC ACC ATT AGG CAT TAG CAC
<i>Tet3</i>	XM_006236793.3	<i>Forward:</i> TCA GCA ACA CCT TCA TCA CAA <i>Reverse:</i> TTT TCC TTG GGT GGT TTG TCA
<i>Sirt1</i>	XM_008772947.2	<i>Forward:</i> GGT TGC AGG AAT CCA AAG G <i>Reverse:</i> CCA CGA ACA GCT TCA CAA TC
<i>Sirt2</i>	XM_006228676.3	<i>Forward:</i> CAC GAT GAG CTG GAT GAA AG <i>Reverse:</i> CGG GCT TTA CCA CAT TCT G
<i>Sirt3</i>	XM_008759981.2	<i>Forward:</i> GGG TCC TTT GCT CTG AGT CC <i>Reverse:</i> TCC ACC AGC CTT TCC ACA C
<i>Sirt4</i>	XR_595327.2	<i>Forward:</i> TTG ATT TCA TCC GCA GTG <i>Reverse:</i> CCC AAG TTT CTC CCA GTT
<i>Sirt5</i>	XM_006253802.2	<i>Forward:</i> AAC GCA AAG CAC ATA GTC AT <i>Reverse:</i> AGC AAA GGC CAG AGG AGT
<i>Sirt6</i>	XM_017594720.1	<i>Forward:</i> GCC GTC TGG TCA TTG TCA <i>Reverse:</i> AGC CTT GGG TGC TAC TGG
<i>Sirt7</i>	XM_017599391.1	<i>Forward:</i> AGC ACG GCA GCC TCT ATC <i>Reverse:</i> AGG TCG GCA GCA CTC ACA

3.10. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 6 for Windows, (Inc., San Diego, CA, USA)*. As análises dos dados foram realizadas utilizando o teste estatístico (ANOVA two-way, seguido do pós-teste Bonferroni). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da dieta rica em carboidratos simples e do treinamento físico de natação sobre os parâmetros biométricos e bioquímicos

O consumo alimentar e a ingestão calórica foram mensurados conforme descrito anteriormente, houve um aumento do consumo alimentar e da ingestão calórica pelos animais que consumiram a dieta rica em carboidratos simples por 4 semanas, e no consumo alimentar pelos animais que se alimentaram com a mesma dieta por 8 semanas. Quando se compara o período de consumo da dieta houve um aumento do consumo alimentar e da ingestão calórica pelos animais de 8 semanas. Já o treinamento físico de natação impediu que esse aumento ocorresse em 4 e 8 semanas (Tabela 6).

Tabela 6: Consumo alimentar (g) e Ingestão calórica (Kcal) no período de 4 e 8 semanas.

Grupo N=6	Consumo	Ingestão calórica	Consumo	Ingestão
	alimentar (g)	(Kcal)	alimentar (g)	calórica (Kcal)
	4 semanas		8 semanas	
SDC	16,2 ± 0,4	49,8 ± 1,8	24,8 ± 0,9 ^a	76,6 ± 3,4 ^a
SCS	18,0 ± 1,0 [#]	51,5 ± 2,2 [#]	27,6 ± 0,8 ^{#b}	77,6 ± 3,7 ^b
TDC	16,8 ± 0,9	52,0 ± 3,4	23,8 ± 1,6 ^c	73,2 ± 5,2 ^c
TCS	16,3 ± 0,5*	47,3 ± 0,5*	23,4 ± 2,1* ^d	67,4 ± 7,6 ^d

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

[#] Diferenças significativas em comparação com o grupo SDC (período de 8 semanas)

* Diferenças significativas em comparação com o grupo SCS (período de 8 semanas)

^a Diferenças significativas em comparação com o grupo SDC (período de 4 semanas)

^b Diferenças significativas em comparação com o grupo SCS (período de 4 semanas)

^c Diferenças significativas em comparação com o grupo TDC (período de 4 semanas)

^d Diferenças significativas em comparação com o grupo TCS (período de 4 semanas)

O período de consumo alimentar induziu um ganho de massa corporal esperado, devido ao crescimento dos animais, independente da dieta consumida, o treinamento físico de natação impediu o excesso de ganho de massa corporal nos animais treinados que consumiram a dieta rica em carboidratos simples por 8 semanas (Figura 11).

Tabela 7: Ganho de massa corporal dos animais submetidos a 4 semanas de ingestão da dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação com carga.

	4 semanas		
	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Ganho de massa (g)
Grupo (N=6)	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD
SDC	81,6 ± 9,3	181,6 ± 33,7	100,0 ± 31,2
SCS	74,4 ± 8,8	197,4 ± 15,7	123,0 ± 13,9
TDC	77,2 ± 8,9	178,0 ± 35,7	100,8 ± 32,2
TCS	71,4 ± 5,7	161,6 ± 15,5	90,2 ± 19,0

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

Tabela 8: Ganho de massa corporal dos animais submetidos a 8 semanas de ingestão da dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação com carga.

	8 semanas		
	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Ganho de massa (g)
Grupo (N=5)	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD
SDC	84,4 ± 16,0	326,2 ± 15,8 ^a	241,8 ± 15,9 ^a
SCS	78,4 ± 6,7	353,0 ± 26,7 ^b	274,6 ± 30,3 ^b
TDC	82,0 ± 13,4	281,2 ± 20,0 ^c	199,2 ± 31,1 ^c
TCS	84,8 ± 12,4	282,4 ± 44,4 ^{*d}	197,6 ± 46,1 ^{*d}

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo SCS 8 semanas

^a $p < 0,05$ em relação ao grupo SDC 4 semanas

^b $p < 0,05$ em relação ao grupo SCS 4 semanas

^c $p < 0,05$ em relação ao grupo TDC 4 semanas

^d $p < 0,05$ em relação ao grupo TCS 4 semanas

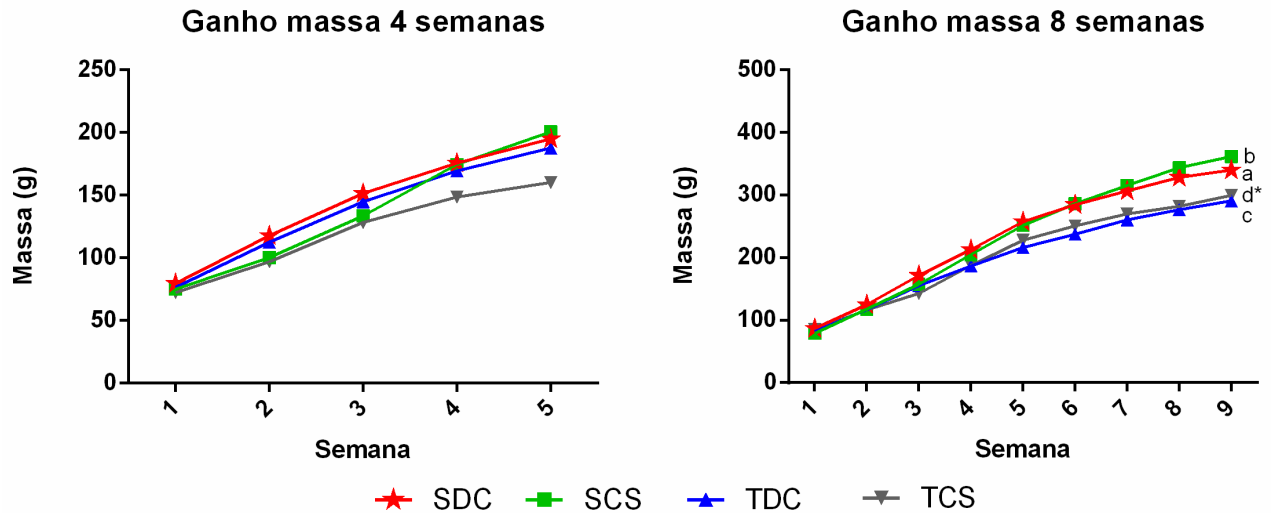


Figura 11: Ganho massa corporal de animais alimentados com dieta rica em carboidratos simples e submetidos ao treinamento físico durante 4 e 8 semanas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

- * Diferença significativa em comparação com o grupo SCS (período de 8 semanas)
- ^a Diferença significativa em comparação com o grupo SDC (período de 4 semanas)
- ^b Diferença significativa em comparação com o grupo SCS (período de 4 semanas)
- ^c Diferença significativa em comparação com o grupo TDC (período de 4 semanas)
- ^d Diferença significativa em comparação com o grupo TCS (período de 4 semanas)

O treinamento físico de natação impediu o aumento dos depósitos de gordura retroperitoneal nos animais treinados por 8 semanas (Tabela 9) e induziu um aumento no depósito de gordura marrom nos animais de 4 e 8 semanas independente da dieta consumida (Tabela 9). Houve um efeito temporal no uso da dieta rica em carboidratos simples que induziu um aumento na massa dos coxins retroperitoneal e epididimal (Tabela 9), além de aumentar os índices de Lee e adiposidade nos animais alimentados por 8 semanas quando comparado aos animais tratados por 4 semanas (Tabela 11).

Tabela 9: Massa relativa dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal, inguinal e epididimal dos animais no período de 4 e 8 semanas.

	4 semanas			8 semanas		
	Retroperitoneal (g)	Inguinal (g)	Epididimal (g)	Retroperitoneal (g)	Inguinal (g)	Epididimal (g)
Grupo (N=6)	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD
SDC	0,38 ± 0,24	1,24 ± 0,30	0,59 ± 0,20	1,40 ± 0,54 ^a	1,76 ± 0,40	1,29 ± 0,36 ^a
SCS	0,67 ± 0,14	1,53 ± 0,37	0,68 ± 0,35	1,72 ± 0,48 ^b	2,16 ± 0,66	1,21 ± 0,14 ^b
TDC	0,39 ± 0,14	1,11 ± 0,38	0,55 ± 0,05	0,63 ± 0,24 [#]	1,14 ± 0,33	0,84 ± 0,21
TCS	0,51 ± 0,43	1,27 ± 0,50	0,57 ± 0,35	0,95 ± 0,39 [*]	1,48 ± 0,26	1,00 ± 0,22

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de p<0,05 foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

[#]p<0,05 em relação ao grupo SDC 8 semanas

^{*}p<0,05 em relação ao grupo SCS 8 semanas

^ap<0,05 em relação ao grupo SDC 4 semanas

^bp<0,05 em relação ao grupo SCS 4 semanas

Tabela 10: Massa relativa do tecido adiposo marrom (TAM) dos animais no período de 4 e 8 semanas.

Grupo (N=6)	4 semanas	8 semanas
	TAM (g)	TAM (g)
	Média ± SD	Média ± SD
SDC	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,02
SCS	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01
TDC	0,19 ± 0,04 [*]	0,18 ± 0,03 [†]
TCS	0,23 ± 0,03 [#]	0,21 ± 0,05 ^a

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de p<0,05 foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

^{*}p<0,05 em relação ao grupo SDC 4 semanas

[#]p<0,05 em relação ao grupo SCS 4 semanas

[†]p<0,05 em relação ao grupo SDC 8 semanas

^ap<0,05 em relação ao grupo SCS 8 semanas

Tabela 11: Índice de Lee e índice de adiposidade dos animais no período de 4 e 8 semanas.

Grupo (N=6)	4 semanas		8 semanas	
	Índice de Lee	Adiposidade	Índice de Lee	Adiposidade
SDC	Média ± SD 0,30 ± 0,04	Média ± SD 2,3 ± 0,6	Média ± SD 0,34 ± 0,03	Média ± SD 4,3 ± 1,2
SCS	Média ± SD 0,28 ± 0,02	Média ± SD 2,9 ± 0,4	Média ± SD 0,36 ± 0,02 ^a	Média ± SD 5,3 ± 1,2 ^a
TDC	Média ± SD 0,29 ± 0,005	Média ± SD 2,1 ± 0,7	Média ± SD 0,30 ± 0,08	Média ± SD 2,6 ± 0,7
TCS	Média ± SD 0,31 ± 0,009	Média ± SD 2,6 ± 1,2	Média ± SD 0,34 ± 0,03	Média ± SD 3,4 ± 0,9

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

^a $p < 0,05$ em relação ao grupo SCS 4 semanas

Os dados relacionados aos parâmetros bioquímicos são apresentados nas Tabelas 12 e 13. A dieta rica em carboidratos simples induziu uma redução nos níveis de ureia nos animais de 4 e 8 semanas, houve um efeito temporal sobre a concentração de glicose sérica apesar de não haver diferença entre os grupos experimentais, enquanto que os níveis séricos de insulina e o HOMA-IR foram aumentados pela dieta rica em carboidratos simples nos animais alimentados por 8 semanas. O treinamento físico de natação aumentou os níveis de AST e ALT nos animais treinados por 8 semanas.

Tabela 12: Parâmetros bioquímicos induzidos por treinamento físico de natação e dieta rica em carboidratos simples nos animais no período de 4 semanas.

Parâmetros N=6	4 semanas				p-valor			
	SDC	SCS	TDC	TCS	Efeito DRCS	Efeito TFN	Interação	Efeito do tempo
Glicose (mmol/L)	8,7 ± 1,7	7,6 ± 2,2	8,9 ± 1,3	8,6 ± 1,4	0,345	0,407	0,595	0,009
Insulina (ng/mL)	16 ± 13	36 ± 31	27 ± 34	17 ± 14	0,609	0,751	0,171	0,978
HOMA-IR	5 ± 4	13 ± 14	11 ± 13	7 ± 5	0,665	0,967	0,199	0,614
HOMA-β	80 ± 81	136 ± 111	43 ± 42	67 ± 51	0,236	0,118	0,626	0,087
Colesterol total (mg/dL)	109 ± 16	96 ± 13	112 ± 29	110 ± 25	0,432	0,341	0,555	0,570
LDLc (mg/dL)	47 ± 15	31 ± 17	59 ± 30	43 ± 20	0,082	0,201	0,971	0,396
HDLc (mg/dL)	43 ± 6,6	41 ± 4	37 ± 7	45 ± 6	0,289	0,648	0,075	0,681
VLDLc (mg/dL)	17 ± 5	24 ± 7	18 ± 4	24 ± 11	0,058	0,766	0,904	0,327
Triglicérides (mg/dL)	86 ± 17	119 ± 35	93 ± 19	105 ± 39	0,074	0,761	0,376	0,193
Uréia (mg/dL)	62 ± 15	38 ± 5*	62 ± 16	53 ± 10	0,005	0,140	0,169	0,309
Creatinina (mg/dL)	0,5 ± 0,08	0,5 ± 0,08	0,6 ± 0,11	0,6 ± 0,11	0,823	0,274	0,823	0,060
AST (U/L)	314 ± 64	293 ± 139	336 ± 69	426 ± 136	0,445	0,097	0,224	0,479
ALT (U/L)	109 ± 22	94 ± 15	103 ± 12	100 ± 21	0,235	0,998	0,434	0,817

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. DRCS – Dieta rica em carboidratos simples, TFN – Treinamento físico de natação com carga de trabalho, SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo SDC 4 semanas

Tabela 13: Parâmetros bioquímicos induzidos por treinamento físico de natação e dieta rica em carboidratos simples nos animais no período de 8 semanas.

Parâmetros N=5	8 semanas				p-valor		
	SDP	SCS	TDP	TCS	Efeito DRCS	Efeito TFN	Interação
Glicose (mmol/L)	6,5 ± 0,9	7 ± 0,2	7,5 ± 1,6	7,4 ± 0,8	0,595	0,171	0,549
Insulina (ng/mL)	27 ± 18	68 ± 52	16 ± 16	43 ± 27	0,029	0,206	0,637
HOMA-IR	7 ± 4	21 ± 17	5 ± 5	14 ± 10	0,022	0,316	0,663
HOMA-β	211 ± 191	380 ± 274	110 ± 140	209 ± 125	0,137	0,133	0,689
Colesterol total (mg/dL)	109 ± 26	84 ± 17	102 ± 15	93 ± 15	0,067	0,885	0,346
LDL (mg/dL)	49 ± 18	26 ± 10	42 ± 13	37 ± 19	0,064	0,758	0,237
HDL (mg/dL)	38 ± 8	38 ± 5	37 ± 3	37 ± 8	0,811	0,738	0,972
VLDLc (mg/dL)	21 ± 5	21 ± 5	20 ± 5	20 ± 5	0,443	0,449	0,348
Triglicérides (mg/dL)	106 ± 23	103 ± 28	99 ± 27	101 ± 28	0,374	0,470	0,440
Uréia (mg/dL)	52 ± 6	44 ± 8	61 ± 10	47 ± 9	0,013	0,115	0,385
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,04	0,6 ± 0	0,6 ± 0,05	0,6 ± 0,08	0,688	0,058	0,238
AST (U/L)	258 ± 53	260 ± 74	354 ± 59	400 ± 142	0,556	0,009	0,581
ALT (U/L)	99 ± 14	84 ± 14	117 ± 26	105 ± 25	0,146	0,05	0,885

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. DRCS – Dieta rica em carboidratos simples, TFN – Treinamento físico de natação com carga de trabalho, SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

4.2. Efeitos da dieta rica em carboidratos simples e do treinamento físico de natação sobre os parâmetros morfológicos e conteúdo lipídico dos adipócitos

A dieta rica em carboidratos simples induziu hipertrofia nos adipócitos do tecido adiposo retroperitoneal nos animais alimentados por 8 semanas (Figura 12b, c-F), enquanto que o treinamento físico de natação diminuiu o tamanho dos adipócitos nos animais alimentados com essa dieta durante 8 semanas (Figura 12b, c-H). Apesar dessas alterações, não houve diferença significativa no conteúdo lipídico do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 13 a, b).

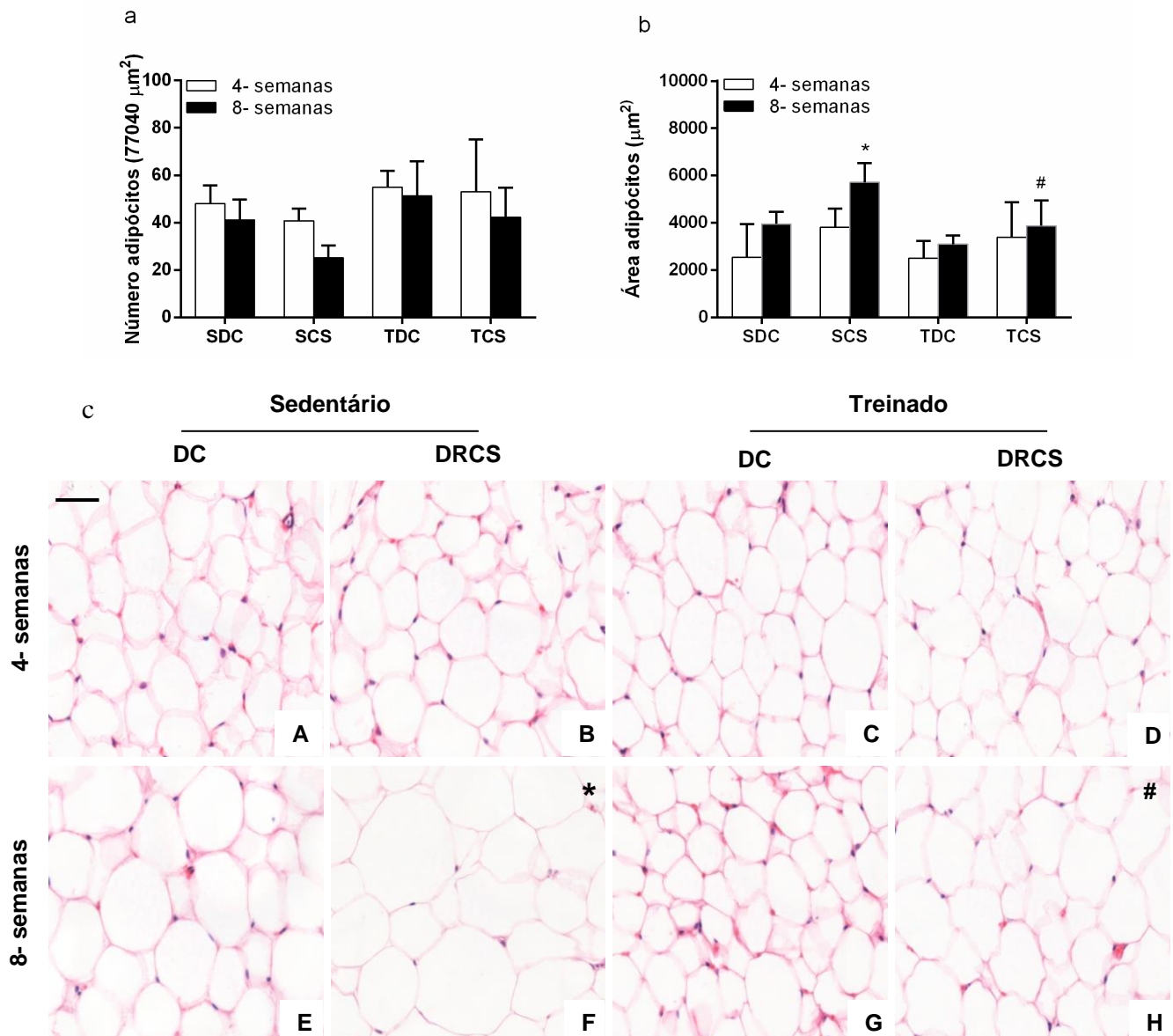


Figura 12: Número e tamanho dos adipócitos do tecido adiposo retroperitoneal dos animais nos períodos de 4 semanas e 8 semanas. a Número de adipócitos; b Tamanho dos adipócitos. Os dados são expressos como média \pm Desvio Padrão. Os efeitos da dieta e/ou treinamento físico foram comparados utilizando ANOVA two-way e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. c Fotomicrografias de seções histológicas do tecido adiposo retroperitoneal. Aspecto histológico normal evidenciando parênquima predominantemente preenchido por células adiposas uniloculares permeadas por estroma conjuntivo em animais que receberam dieta controle (DC) submetidos (C, G) ou não (A, E) à treinamento físico durante 4 (A, C) ou 8 (E, G) semanas; Aspecto histológico normal evidenciando parênquima predominantemente preenchido por células adiposas uniloculares e permeadas por estroma conjuntivo em animais que receberam dieta rica em carboidratos simples (DRCS), submetidos (D) ou não (B) à treinamento físico por 4 semanas; Aspecto histológico normal evidenciando parênquima predominantemente preenchido por células adiposas uniloculares e permeadas por estroma conjuntivo em animais que receberam DRCS submetidos à treinamento físico por 8 semanas (H); Adipócitos uniloculares apresentando hipertrofia em animais que receberam DRCS e não foram submetidos à treinamento físico (sedentário) por 8 semanas (F). Hematoxilina-Eosina. Barra = 50 μm . SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples. *Diferenças significativas em relação ao grupo controle SDC 8 semanas, #Diferenças significativas em relação ao grupo controle SCS 8 semanas.

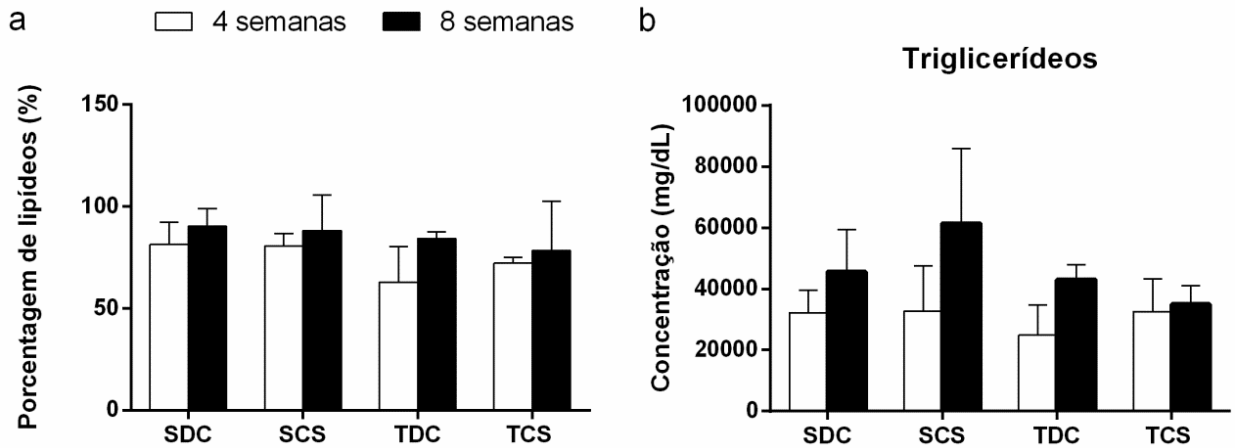


Figura 13: Conteúdo lipídico do tecido adiposo retroperitoneal dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de ingestão da dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação com carga. a. Percentagem de lipídeos; b. Concentração de triglicerídeos. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

4.3. Efeitos epigenéticos induzidos pela dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação sobre o tecido adiposo retroperitoneal

4.3.1. Metilação global do DNA por ELISA

A Figura 14 mostra que não houve diferença significativa na percentagem de 5-metilcitosina metilada induzida pela dieta rica em carboidratos simples ou pelo treinamento físico de natação no período de 8 semanas.

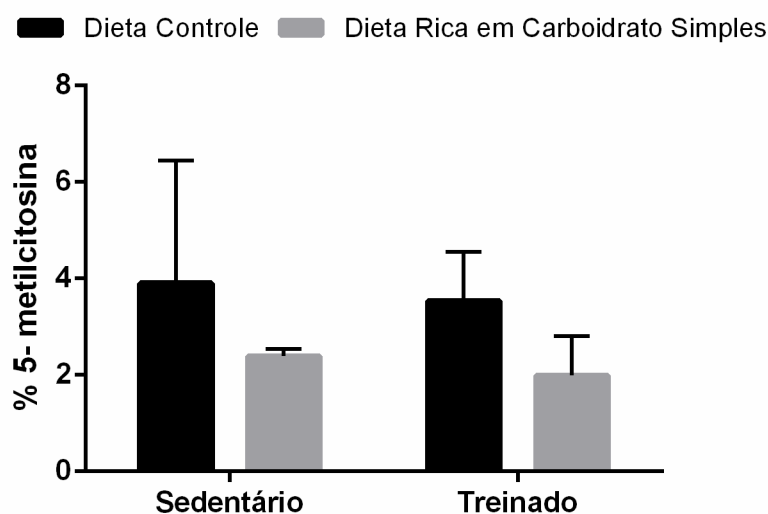


Figura 14: Porcentagem de 5-metilcitosina (5-mC) em 100 ng de DNA extraído do tecido adiposo retroperitoneal de ratos alimentados com a dieta rica em carboidratos simples e submetidos ao treinamento físico de natação durante 8 semanas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

4.3.2. Análise da expressão gênica de *metilases* e *desmetilases* no tecido adiposo retroperitoneal

Pode-se observar que houve um efeito do treinamento físico ($p=0,01$) induzindo uma diminuição dos níveis de expressão de *Tet3* embora o pós-teste de Bonferroni não tenha evidenciado uma diferença entre os grupos (Figuras 15 e 16), além disso, não observamos diferenças significativas na expressão das *metilases* e *Tet2*.

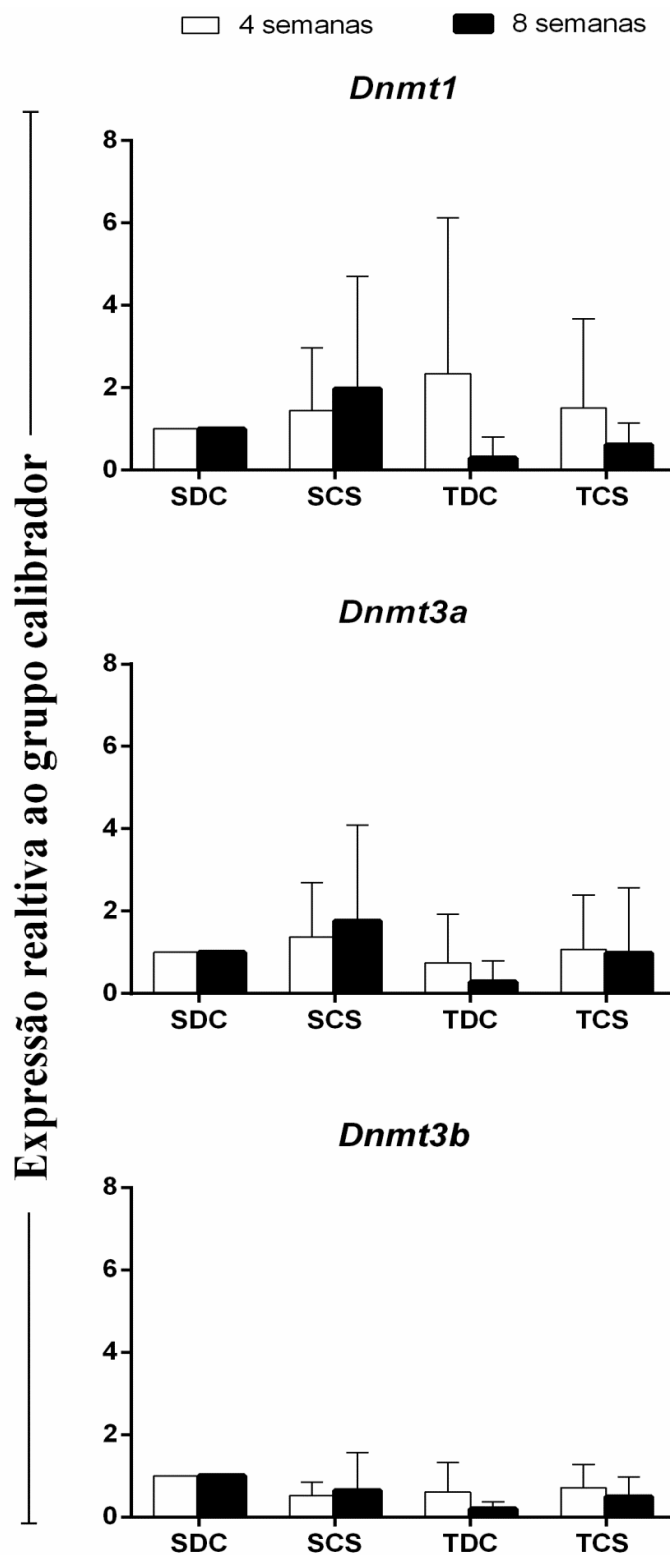


Figura 15- Perfil de expressão mRNA de metilases no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas. Os dados são expressos como valores médios \pm desvio padrão da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador (SDC). As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

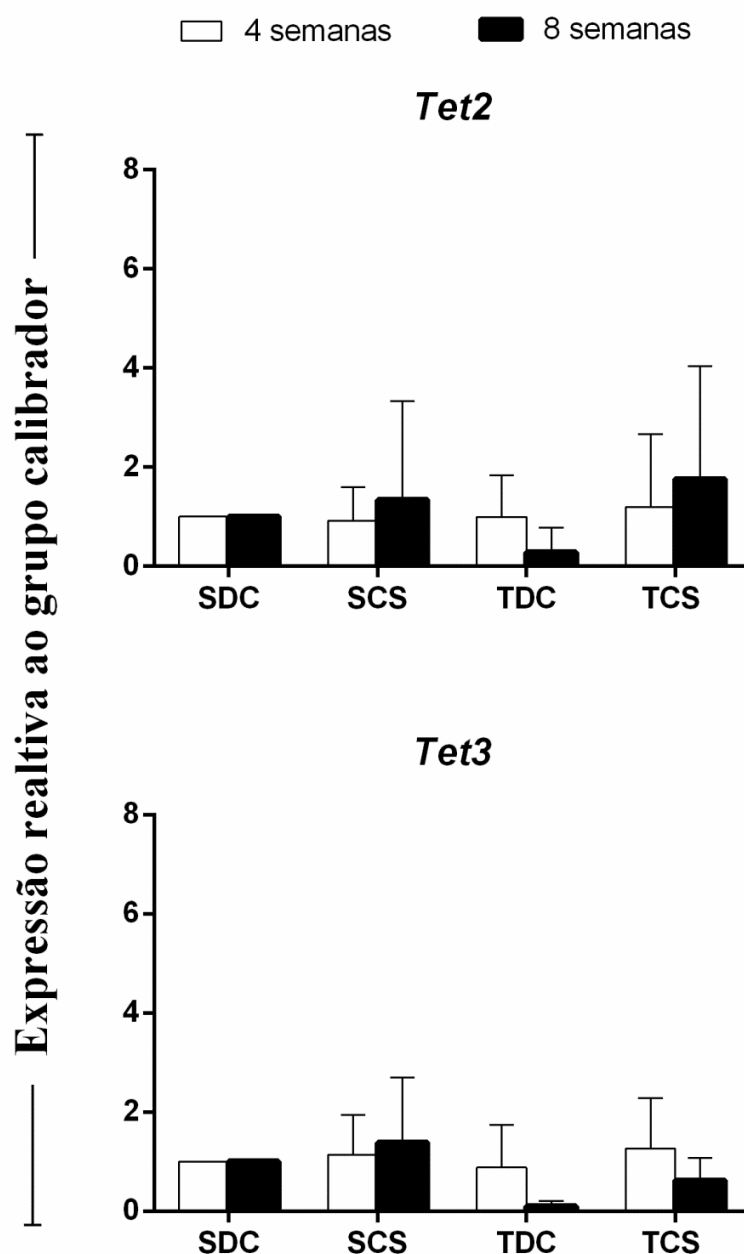


Figura 16: Perfil de expressão mRNA de desmetilases no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas. Os dados são expressos como valores médios \pm desvio padrão da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador (SDC). As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

Para estimar a prevalência de metilação ou demetilação, foi calculada a razão entre as somas de *Dnmt3a* e *Dnmt3b* (enzimas que catalisam a reação de metilação de novo) e a soma de *Tet2* e *Tet3* (Figura 17). Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos.

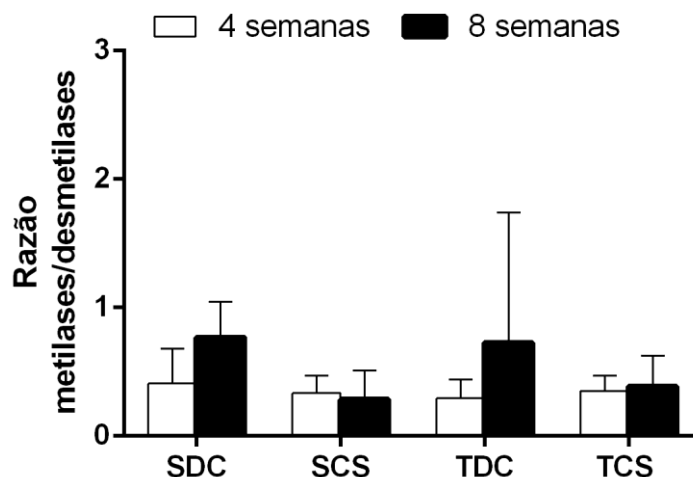


Figura 17: Razão entre as expressões de metilases e desmetilases. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

4.3.3. Análise da expressão gênica de *sirtuínas* no tecido adiposo retroperitoneal

As Figuras 18, 19, 20 e 21 apresentam os níveis de expressão de mRNA das *Sirtuínas* 1-7 no tecido adiposo retroperitoneal. Pode-se observar que houve um efeito temporal ($p=0,004$) e da interação entre dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação ($p=0,02$) inibindo a expressão de *Sirt1*, *Sirt2* (tempo $p < 0,0001$; interação $p=0,02$), *Sirt6* e *Sirt7* nos animais de 8 semanas, assim como o treinamento físico de natação ($p=0,004$) também inibiu a expressão de *Sirt3* nesses animais independente da dieta consumida. Por outro lado, a dieta rica em carboidratos simples induziu um aumento na expressão de *Sirt5* nos animais alimentados por 8 semanas, enquanto que o treinamento físico de natação foi capaz de reverter essa situação.

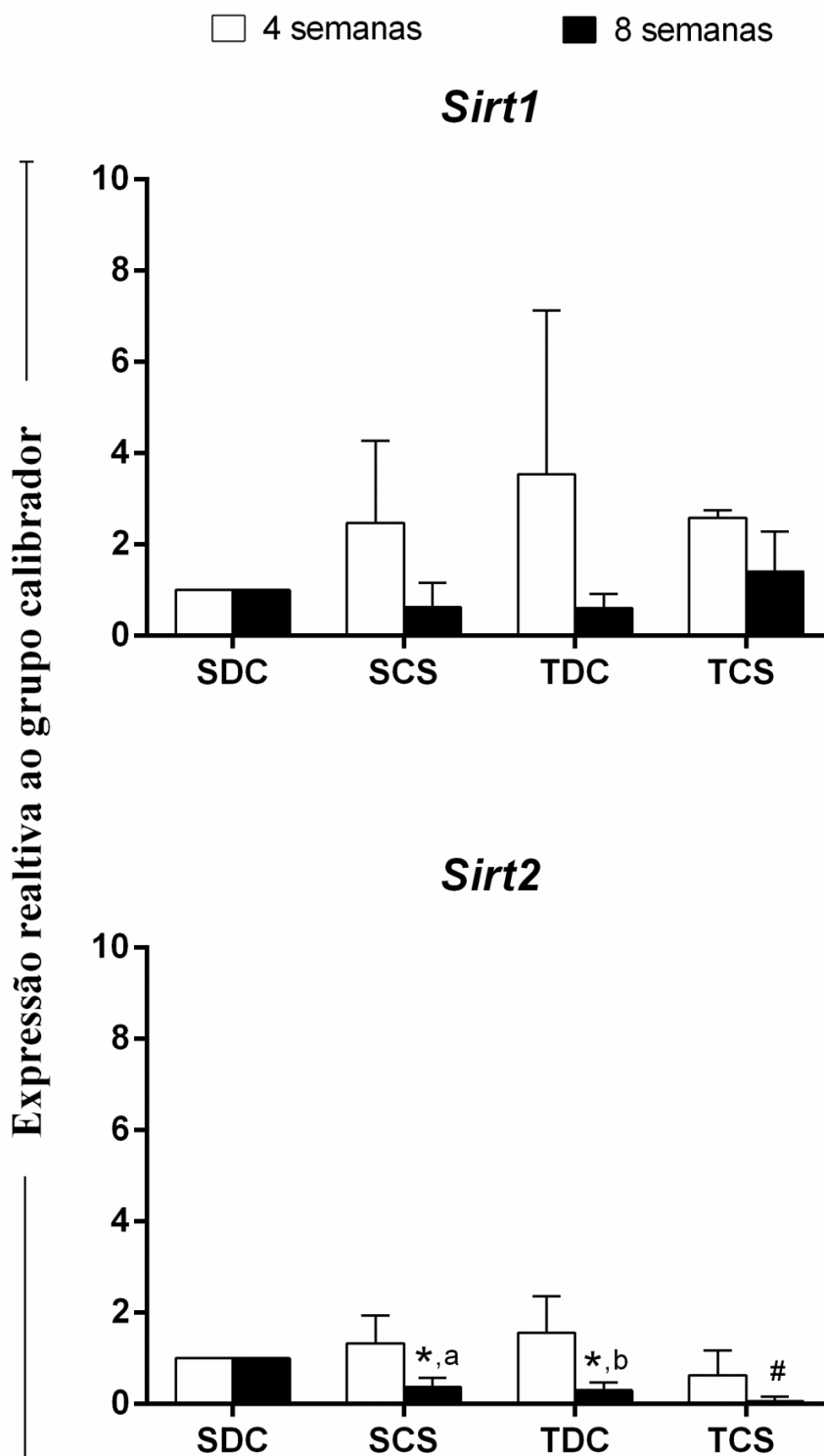


Figura 18: Perfil de expressão mRNA das sirtuínas 1 e 2 no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas. Os dados são expressos como valores médios \pm desvio padrão da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador (SDC). As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. * diferença significativa em comparação ao grupo SDC 8 semanas; # diferença significativa em comparação ao grupo SCS 8 semanas; ^adiferença significativa em comparação ao grupo SCS 4 semanas; ^bdiferença significativa em comparação ao grupo TDC 4 semanas. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

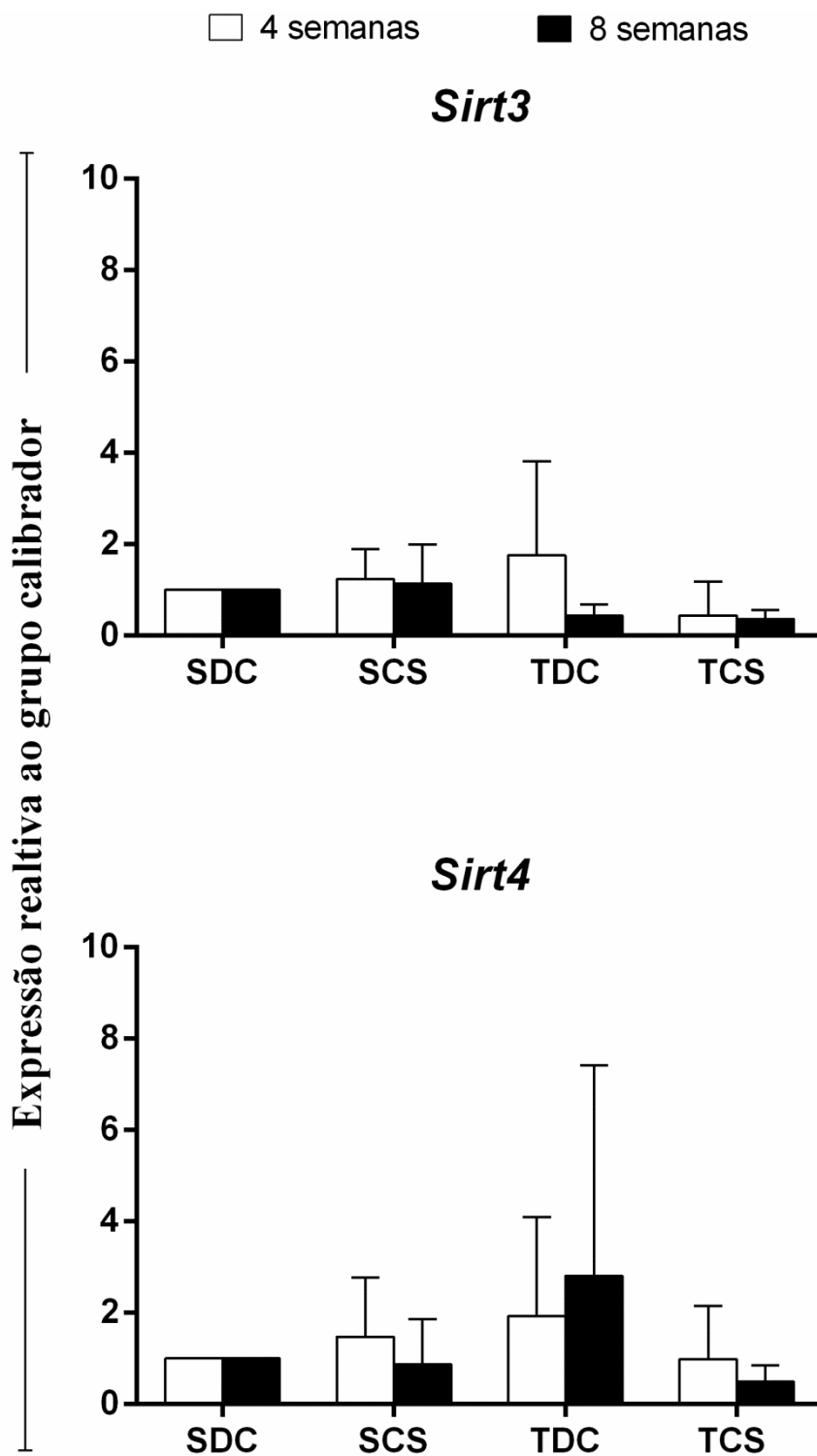


Figura 19: Perfil de expressão mRNA das sirtuínas 3 e 4 no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas. Os dados são expressos como valores médios \pm desvio padrão da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador (SDC). As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. * diferença significativa em comparação ao grupo SDC 8 semanas; # diferença significativa em comparação ao grupo SCS 8 semanas; ^adiferença significativa em comparação ao grupo SCS 4 semanas; ^bdiferença significativa em comparação ao grupo TDC 4 semanas. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

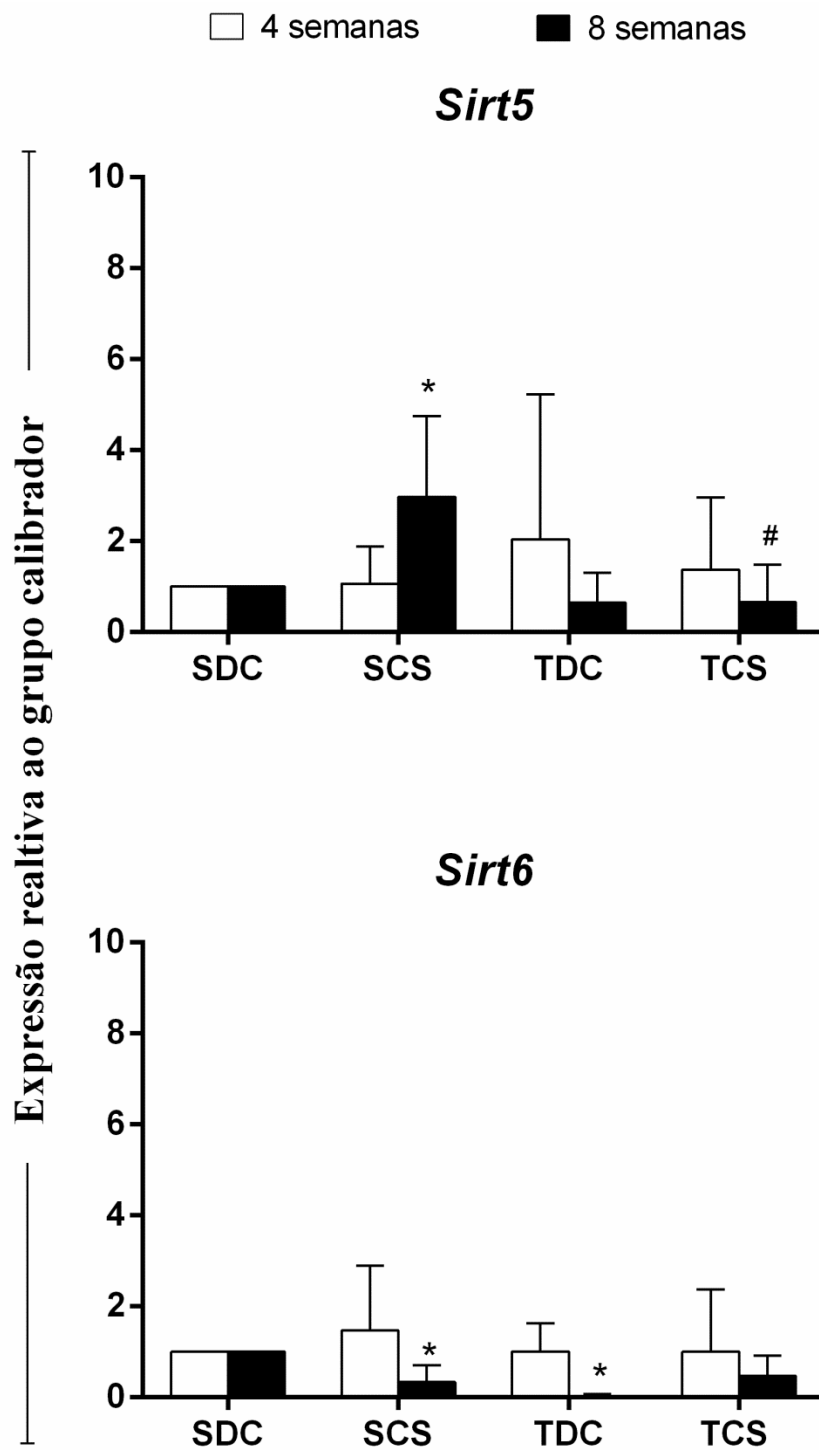


Figura 20: Perfil de expressão mRNA das sirtuínas 5 e 6 no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas. Os dados são expressos como valores médios \pm desvio padrão da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador (SDC). As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. * diferença significativa em comparação ao grupo SDC 8 semanas; # diferença significativa em comparação ao grupo SCS 8 semanas; ^adiferença significativa em comparação ao grupo SCS 4 semanas; ^bdiferença significativa em comparação ao grupo TDC 4 semanas. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

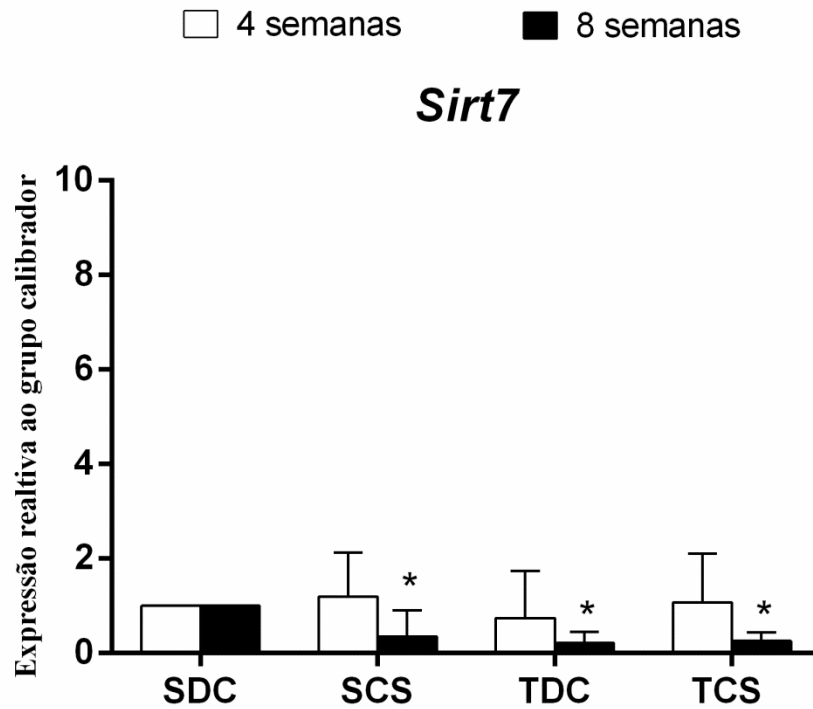


Figura 21: Perfil de expressão mRNA da sirtuína 7 no tecido adiposo retroperitoneal nos períodos de 4 e 8 semanas. Os dados são expressos como valores médios \pm desvio padrão da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador (SDC). As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. * diferença significativa em comparação ao grupo SDC 8 semanas; # diferença significativa em comparação ao grupo SCS 8 semanas; ^adiferença significativa em comparação ao grupo SCS 4 semanas; ^bdiferença significativa em comparação ao grupo TDC 4 semanas. SDC-sedentário dieta controle, SCS - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDC - treinado dieta controle, TCS - treinado dieta rica em carboidratos simples.

5. DISCUSSÃO

Os fatores genéticos explicam em parte o desenvolvimento da obesidade e de doenças associadas, mas não é suficiente para justificar o aumento crescente dessas alterações metabólicas (VAN DIJK et al., 2015). Entretanto, os estudos em epigenética prometem desvendar os mecanismos biológicos que sustentam o aumento na prevalência dessas comorbidades, pois fatores ambientais como a composição nutricional mantida durante períodos pré e pós-natal podem induzir alterações metabólicas permanentes (LEE, 2015). Portanto, o ambiente nutricional vivenciado na primeira infância pode induzir alterações epigenéticas no metabolismo resultando em mudanças na função gênica, além de alterar a distribuição da gordura corporal e o equilíbrio metabólico (VAN DIJK et al., 2015).

Essas alterações estão associadas com a metilação do DNA, modificações pós traducionais de histonas e com a regulação por microRNAs que podem alterar o perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos e carboidratos e com a via de sinalização da insulina. As alterações epigenéticas ocorrem também em outros estágios da vida. Estudos demonstraram que ratos submetidos a uma dieta rica em gordura apresentaram regiões gênicas hipermetiladas quando comparadas com ratos submetidos a dieta controle. Em geral, tem sido demonstrado que pode ocorrer uma reprogramação do epigenoma na vida pós-natal, bem como em qualquer período da vida e que essa reprogramação é reversível (BISHOP E FERGUSON, 2015).

Debates sobre a composição ideal da dieta para a manutenção da saúde e do peso corporal são controversos e as diretrizes atuais indicam dietas com baixo teor de lipídeos, enquanto há um aumento no consumo de dietas com alto índice de carboidratos refinados. No entanto, o consumo exagerado da dieta rica em carboidratos pode induzir alterações no metabolismo da glicose (WALDMAN et al., 2018), na expressão de genes relacionados à lipogênese de novo e diferenciação celular, promovendo o excesso de peso e doenças associadas (VIDA et al., 2014; GIARDINA et al., 2017).

Para confirmar a hipótese de reprogramação do epigenoma, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da dieta isocalórica e rica em carboidratos simples no metabolismo de

ratos jovens, bem como averiguar o efeito da idade e do treinamento físico de natação com carga de trabalho. Também foi foco do nosso trabalho investigar se as alterações metabólicas observadas eram governadas, pelo menos em parte, por mecanismo epigenético.

Os dados obtidos mostram que, apesar de não haver um aumento significativo no ganho de massa corporal, o consumo da dieta rica em carboidratos simples promoveu uma hipertrofia dos adipócitos do tecido adiposo retroperitoneal. Ainda, o treinamento físico de natação com carga de trabalho reverteu esse fenótipo. Quando ocorre um excesso na ingestão calórica, o adipócito armazena lipídeos e aumenta de tamanho, promovendo a hipertrofia celular com aumento do armazenamento de gordura, devido à hiperinsulinemia causada por alimentos com alto índice glicêmico (REILLY E SALTIEL, 2017). Se, no entanto, o gasto energético não for maior que a ingestão calórica, os adipócitos hipertróficos secretam adipocinas, hormônios e fatores de transcrição que induzirão adipogênese por promover a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, causando a hiperplasia do tecido (HACZEYNI et al., 2017).

Resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa também mostraram que a dieta rica em carboidratos simples induz o desenvolvimento do tecido adiposo retroperitoneal causando aumento de massa e hipertrofia das células, sendo a idade um fator importante para a deposição de lipídios nesse tecido. Contudo, nesse mesmo trabalho foi verificado que o treinamento em esteira rolante não foi capaz de reverter os efeitos da dieta (DE QUEIROZ et al., 2014).

Em conjunto, esses dados nos permitem sugerir que a constituição da dieta tem um importante papel no desenvolvimento da obesidade, uma vez que, mesmo sendo isocalórica quando comparada a dieta controle, a dieta rica em carboidratos simples levou a uma hipertrofia dos adipócitos e um aumento da massa do tecido adiposo. Ainda, o tipo de exercício físico parece ser importante para reverter o quadro de alterações metabólicas, já que a natação, mas não o treinamento em esteira, foi eficaz para evitar as modificações promovidas pela dieta.

Dados anteriores do nosso grupo também mostraram que os animais alimentados com a dieta rica em carboidratos simples e exercitados em esteira rolante por 8 semanas apresentaram um aumento no índice de adiposidade e uma menor eficiência energética devido

a uma alteração na expressão gênica de *Ucp1* e *Ucp3*. Também foi demonstrado que o ganho de massa corporal ocorrido nesses animais pode ser devido ao efeito da leptina sobre o tecido adiposo branco, que inibe a lipólise e promove a síntese de triacilgliceróis (DE QUEIROZ et al., 2012; DE QUEIROZ et al., 2014).

Considerando que o exercício em esteira rolante não inibiu os efeitos induzidos pela dieta rica em carboidratos simples, que o exercício físico de natação sem carga de trabalho não impediu o ganho de massa corporal e que a adaptação ao treinamento depende de fatores como regularidade e intensidade, adicionamos carga de trabalho ao treinamento físico de natação, mantendo o mesmo aeróbico para analisar as alterações epigenéticas induzidas pela dieta rica em carboidratos simples e pelo treinamento.

A ativação do metabolismo do tecido adiposo marrom promove a perda de peso e pode estar relacionado à prevenção da obesidade e das doenças associadas. Como esse tecido é innervado pelo sistema nervoso simpático, ocorre um aumento na liberação de norepinefrina que ativa os receptores β -adrenérgicos (SLOCUM et al., 2013) e aumenta a fosforilação oxidativa e a geração de calor (XU et al., 2011). Segundo XIAOHUA XU, et al. (2011), o treinamento físico de camundongos em esteira rolante durante 8 semanas aumentou a população de células progenitoras de adipócitos marrom e diminuiu a adiposidade, além de melhorar as complicações associadas à obesidade. Nosso estudo demonstra que o treinamento físico de natação induziu um aumento da massa do tecido adiposo marrom nos animais treinados por 4 e 8 semanas independente da dieta consumida.

Alguns parâmetros bioquímicos foram analisados para avaliar a função e o metabolismo dos órgãos (BOEHM et al., 2007), levando em consideração se as diferenças estatísticas se traduziriam em alterações clínicas relevantes. Apesar de haver uma diferença significativa nos níveis de ureia plasmática, ela permanece na faixa de normalidade dos valores de referência (C. M. LIMA et al., 2014; HE et al., 2017) e, além disso, a diminuição nos níveis de ureia pode ser atribuída a menor ingestão de proteínas proveniente da dieta rica em carboidratos simples, que contém um menor teor proteico que a dieta controle (BURTIS et al., 2008).

As transaminases séricas (AST e ALT) são enzimas associadas à lesão hepatocelular, porém podem estar alteradas também nas lesões de músculo esqueléticas como aquelas associadas ao exercício físico. SOUZA et al. (2013) mostraram que o exercício físico aumentou AST e ALT no plasma de animais submetidos ao treinamento físico de natação com carga de trabalho de 4% do peso corporal durante seis semanas. Corroborando com este resultado, pode-se observar no presente trabalho que o treinamento físico de natação com carga de trabalho progressiva também aumentou a concentração dessas enzimas séricas nos animais treinados por 8 semanas, independente da dieta consumida.

As análises bioquímicas também mostraram um efeito temporal sobre a concentração de glicose sérica apesar de não haver diferença entre os grupos experimentais. Entretanto, corroborando com os dados de QUEIROZ et al. (2014) a concentração de insulina e o HOMA-IR foram aumentados pela dieta rica em carboidratos simples nos animais alimentados por 8 semanas associado à hipertrofia dos adipócitos através da ação anabólica da insulina nesse tecido.

A resistência periférica à insulina ocorre quando tecidos sensíveis se tornam resistentes e não respondem à ação da insulina como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo e, para compensar, as células- β pancreáticas aumentam a produção de insulina (SAMUEL E SHULMAN, 2016). Juntamente com a adiposidade visceral, a resistência à insulina aparece antes que haja um aumento evidente da glicemia de jejum (RAMOS-ROMERO et al., 2016). Além disso, o estado de resistência à insulina pode induzir o aparecimento de obesidade e diabetes tipo 2, pois o excesso de insulina eleva o ganho de gordura corporal podendo afetar o gasto energético (HRON et al., 2015). O excesso crônico na ingestão de carboidratos refinados causa um pico de glicemia que pode induzir a esse estado de resistência. Estudos com ratos Sprague Dawley e Wistar mostraram uma indução de resistência à insulina após 4-8 semanas de consumo de dietas ricas em sacarose ou frutose (60-70% de sacarose ou frutose como porcentagem de calorias totais) quando comparado a ratos que consumiram dieta controle (PAGLIASSOTTI et al., 1994; D'ANGELO et al., 2005) e uma redução na tolerância à glicose em comparação a ratos alimentados com uma dieta rica em carboidratos complexos (SMALL et al., 2018).

O aumento da adiposidade está associado à disfunção do tecido adiposo, e pode ocorrer durante a infância, e nessa fase já podem ser estabelecidas as doenças associadas como resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia, por esse motivo é essencial o estudo do desenvolvimento da adiposidade desde os processos iniciais. (LANDGRAF et al., 2015). Essas doenças resultam das interações ambientais, genéticas e fisiológicas, dessa forma, o rápido aumento da prevalência dessas doenças metabólicas mostra que os fatores epigenéticos são o alicerce para essa epidemia (VICKERS, 2014). Uma alimentação desbalanceada tem feito com que haja um desequilíbrio na balança energética, sendo que nos últimos 50 anos tem aumentado o consumo de carboidratos refinados (QI, 2014) que podem induzir modificações epigenéticas favorecendo o desenvolvimento das doenças metabólicas, especialmente se esse desequilíbrio ocorrer durante o período de plasticidade fenotípica do desenvolvimento, no qual nossos genes tem a capacidade de alterar estados fisiológicos ou morfológicos em resposta às condições ambientais (JANG E SERRA, 2014).

QUEIROZ et al. (2014) analisou um perfil de genes adipogênicos por PCR Array e mostrou que a dieta rica em carboidratos simples ativou a expressão de 67 genes adipogênicos no tecido adiposo de ratos alimentados por 8 e 12 semanas. Esses resultados nos levaram a levantar a hipótese de que essa alteração na expressão gênica poderia ocorrer pela modificação do perfil de metilação do DNA. Contudo, nossos dados mostraram que não houve alteração significativa na metilação global do tecido adiposo retroperitoneal entre os grupos. Corroborando com esses achados, também não observamos alterações no padrão de expressão de *Dnmts* e *Tets* entre os grupos, bem como na relação *Dnmt/Tets*. Esses resultados sugerem que o mecanismo epigenético de metilação do DNA não tem um papel importante na alteração dos perfis de expressão dos genes adipogênicos observados por QUEIROZ et al. (2014) nos animais alimentados com a dieta por 8 semanas. Contudo, a investigação da metilação dos promotores desses genes será essencial para comprovar essa hipótese.

Como os resultados sugerem que a alteração da expressão gênica induzida por dieta rica em carboidratos simples não é proveniente de uma alteração no perfil global de metilação, nós investigamos o perfil de expressão de sirtuínas que são enzimas que deacetilam proteínas relacionadas ao metabolismo celular.

As sirtuínas são enzimas dependentes do substrato enzimático (NAD⁺) e atuam como sensores celulares para detectar a disponibilidade de energia e modular processos metabólicos, elas são ativadas pelo aumento desse substrato durante a restrição calórica (JUKARAINEN et al., 2016). O consumo e a biossíntese de NAD⁺ modulam sua disponibilidade intracelular e o metabolismo da glicose fornece elétrons que são armazenados nas formas reduzidas NADH e FADH para geração de ATP durante a glicólise (WU et al., 2016). Essas enzimas desempenham funções importantes na longevidade e no metabolismo celular (SINGH et al., 2017). Várias alterações metabólicas ocorrem devido a modificações no tecido adiposo subcutâneo, como disfunção mitocondrial e adipogênese prejudicada (JUKARAINEN et al., 2016).

Nesse estudo, os genes dos sete membros da família *sirtuínas* foram expressos no tecido adiposo retroperitoneal dos ratos Wistar. A dieta rica em carboidratos simples diminuiu a expressão de *Sirt1*. A expressão dessa enzima está relacionada à melhoria da intolerância a glicose e da resistência à insulina e previne a obesidade (CHALKIADAKI E GUARENTE, 2012; ZHOU et al., 2016). Nesse sentido, o aumento da insulina sérica assim como a hipertrofia dos adipócitos dos animais alimentados com esta dieta por 8 semanas podem ser justificadas pela diminuição da expressão de *Sirt1*. Esses resultados corroboram com CHALKIADAKI E GUARENTE (2012) que mostraram em um estudo que animais nocaute para o gene *Sirt1* apresentavam intolerância à glicose e resistência à insulina quando alimentados com uma dieta rica em gordura, em adição, YOSHIZAKI et al. (2009) demonstraram que a depleção por RNA de interferência de *Sirt1 in vitro*, em adipócitos 3T3-L1 inibe a captação de glicose e translocação de GLUT-4, e que na presença de ativadores de *Sirt1* obteve-se uma melhora da resistência à insulina levando a uma maior captação de glicose, além disso, SIRT1 inibe a adipogênese em células mesenquimais pela deacetilação de β -catenina, promovendo a sua acumulação no núcleo, e assim induz a transcrição de genes que bloqueiam a adipogênese (ZHOU et al., 2016).

Sirt2 também inibe a adipogênese por mecanismo sugerido de deacetilação da proteína FOXO1, que se liga e reprime PPAR γ , um dos principais fatores de transcrição necessários à adipogênese (JOKINEN et al., 2017) e ainda é *up* regulada no tecido adiposo e rim de camundondos em situações de restrição calórica (WANG et al., 2007). SIRT6 também desacetila FOXO1, o que leva ao aumento da expressão de GLUT2, dessa forma melhora a

detecção da glicose nas células beta pancreáticas e regula a secreção de insulina (SONG MY 2016), além disso, SIRT6 inibe a gliconeogênese hepática e a síntese de triglicerídeos e reduz a adiposidade corporal (BAE, 2017). Nós observamos que a expressão de *Sirt2* e *Sirt6* é inibida pela dieta rica em carboidratos simples nos animais alimentados por 8 semanas e que o treinamento físico de natação não reverteu esse efeito.

Sirt3 atua na produção de energia mitocondrial e na homeostase metabólica, principalmente regulando o metabolismo de ácidos graxos (LOMBARD E ZWAANS, 2014) e, além disso, regula o ciclo da ureia favorecendo a utilização de aminoácidos através da ativação da enzima glutamato desidrogenase. Foi observado que *Sirt3* está ativada nessas vias durante o jejum ou restrição calórica, levando a ativação de genes do metabolismo mitocondrial e secreção de insulina (OSBORNE et al., 2016). Nesse trabalho, o treinamento físico de natação inibiu a expressão desta sirtuína no tecido adiposo retroperitoneal dos animais treinados por 8 semanas independente da dieta consumida, entretanto, PORTER LC, (2018) mostraram que camundongos nocaute para *Sirt3* mantiveram o metabolismo de lipídeos e glicose sem alterações mesmo quando alimentados com uma dieta rica em lipídeos, portanto esses pesquisadores sugerem que a perda de função da sirtuína 3 no tecido adiposo branco não implica em alterações metabólicas.

As sirtuínas 4 e 5 são reguladores da homeostase lipídica, que reprimem a oxidação de ácidos graxos e promovem o anabolismo lipídico (ZHOU et al., 2014). Em nosso estudo, observamos que a dieta rica em carboidratos simples induziu um aumento na expressão de *Sirt5* no tecido adiposo retroperitoneal de animais alimentados por 8 semanas sugerindo a participação dessa enzima no acúmulo de lipídeos causando hipertrofia desse tecido, enquanto que o treinamento físico de natação inibiu a expressão dessa enzima e impediu o anabolismo lipídico.

SIRT7 é a enzima menos estudada da família, estudos recentes, porém contraditórios mostraram uma função relacionada ao metabolismo da glicose e de lipídeos (YE et al., 2017) Dois estudos observaram que camundongos nocaute para o gene de *Sirt7* apresentaram a expressão de genes lipogênicos aumentados, esteatose hepática e aumento de triglicerídeos plasmáticos (SHIN et al., 2013; RYU et al., 2014). Em outro estudo, foi obtido dados contraditórios aos obtidos por SHIN et al. (2013). Nos animais nocaute para *Sirt7* a dieta rica

em gordura não induziu ganho de peso corporal nem obesidade, além disso, esses camundongos não apresentaram esteatose hepática, nem intolerância à glicose e insulina, ocorreu uma diminuição na expressão de genes envolvidos na síntese de triglicerídeos e na massa do tecido adiposo epididimal. Esses animais também apresentaram um aumento na expressão gênica de *Ucp1* envolvida na termogênese e na massa do tecido adiposo marrom (YOSHIZAWA et al., 2014).

Os resultados de FANG et al. (2017), indicam que *SIRT7* inibe a ativação autocatalítica de *SIRT1*, dessa forma, como *SIRT1* é uma enzima anti-adipogênica, eles observaram que camundongos nocautes para *SIRT7* obtiveram uma diminuição do tecido adiposo branco devido à diminuição da acetilação de *SIRT1*, aumentando sua atividade e por sua vez inibindo *PPAR γ* . Essa redução na expressão contribui para inibir a adipogênese e impedir o aumento do tecido adiposo nos animais nocautes alimentados com a dieta rica em gordura.

Nossos achados mostram que o treinamento físico de natação reduziu a expressão de *Sirt7* no tecido adiposo retroperitoneal, o tamanho dos adipócitos, a massa desse tecido e impediu o ganho de peso corporal e a ocorrência de resistência à insulina, além de induzir um aumento na massa do tecido adiposo marrom. Dessa forma, nós sugerimos que os efeitos benéficos do treinamento físico observados nesse trabalho seja, pelo menos em parte, mediado pela diminuição da expressão de *Sirt7* e, conseqüentemente, a ativação enzimática de *SIRT1*. Para confirmar esse dado será necessário avaliar a atividade das enzimas *SIRT1* e *SIRT7*.

A dieta rica em carboidratos simples também reduziu a expressão de *Sirt7* no tecido adiposo retroperitoneal deixando a enzima *SIRT1* mais ativa, sugerimos que esse seja o mecanismo pelo qual essa dieta induziu uma hipertrofia dos adipócitos, porém sem causar hiperplasia, entretanto, esse mecanismo não foi suficientemente capaz de impedir as alterações metabólicas induzidas pela dieta.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, mostramos que a composição dietética modula a expressão gênica de *sirtuínas* relacionadas à adipogênese e ao metabolismo do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 22). A dieta rica em carboidratos simples reduziu a expressão de *Sirt 1, 2, 6 e 7* nesse tecido, e o período de ingestão da dieta foi um fator importante para promover um aumento nas massas dos coxins gordurosos retroperitoneal e epididimal além de induzir resistência à insulina relacionado à hipertrofia dos adipócitos nos animais alimentados por 8 semanas, sem entretanto observar alterações na glicemia, ou seja, em 8 semanas de ingestão da dieta os ratos jovens apresentam características que levam a doenças metabólicas, pois uma alimentação rica em carboidratos simples na infância pré-dispõe o organismo a desenvolver doenças metabólicas na fase adulta. Portanto, as alterações metabólicas observadas podem ser um reflexo da diminuição da expressão dessas enzimas. Surpreendentemente, o treinamento físico de natação com carga de trabalho também inibiu a expressão das *sirtuínas* e, portanto, não foi capaz de reverter o efeito da dieta rica em carboidratos simples sobre a expressão dessas enzimas. Contudo, o treinamento foi eficaz em impedir as alterações metabólicas observadas nos animais sedentários que consumiram a dieta rica em carboidratos simples. Entretanto, não observamos alterações na metilação global do DNA assim como na expressão gênica das enzimas envolvidas nesse processo, dessa forma, a reprogramação epigenética deve ocorrer através de outros mecanismos de regulação, inclusive a deacetilação de histonas promovidas pelas *sirtuínas*, já que observamos alterações na expressão gênica dessas enzimas.

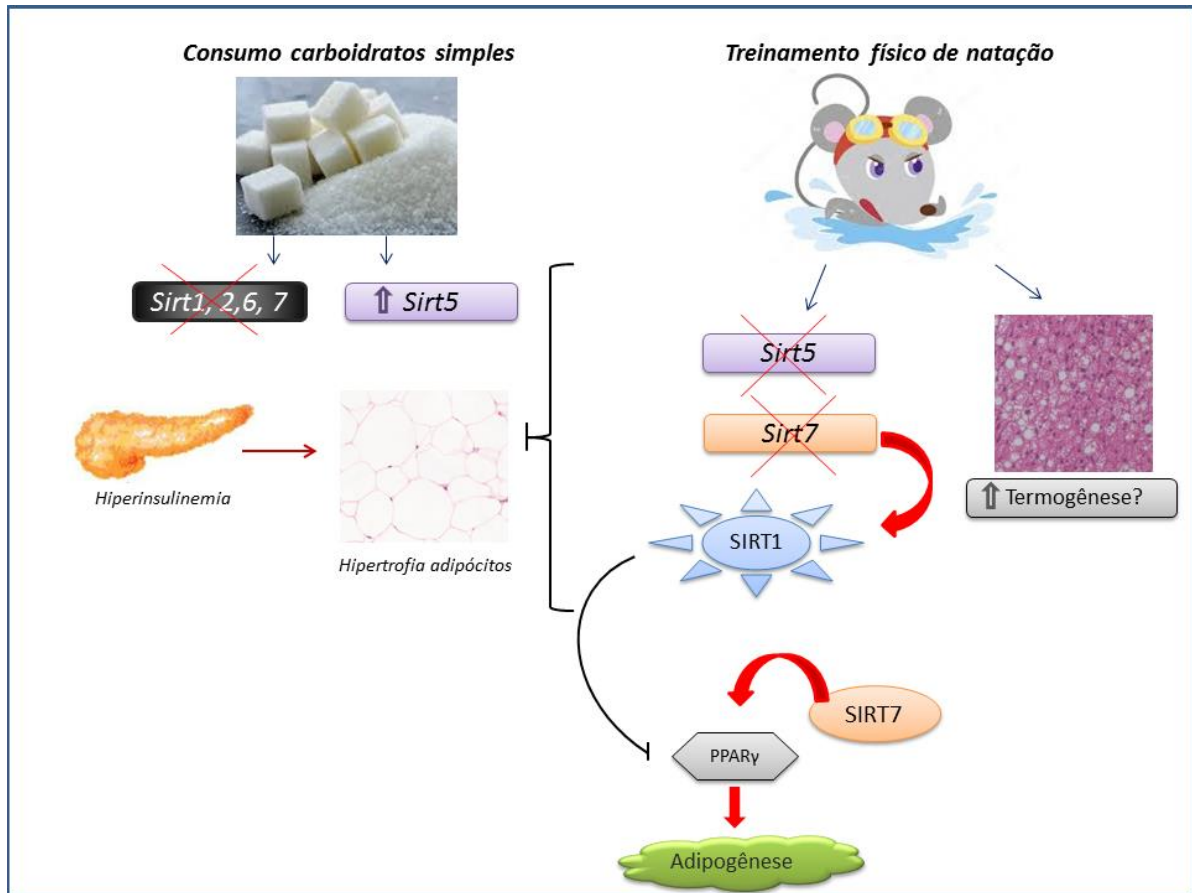


Figura 22: Efeitos da dieta rica em carboidratos simples e do treinamento físico de natação com carga de trabalho sobre o tecido adiposo retroperitoneal de ratos alimentados e treinados por 8 semanas. A dieta rica em carboidratos simples reduziu a expressão de *Sirt 1, 2, 6 e 7* no tecido adiposo retroperitoneal, promoveu um aumento na massa, além de induzir resistência à insulina relacionada à hipertrofia dos adipócitos. O treinamento físico de natação impediu as alterações metabólicas observadas nos animais sedentários que consumiram a dieta. SIRT7 inibe a ativação autocatalítica de SIRT1. A menor expressão de *Sirt7* impediu a hipertrofia dos adipócitos com consequente hiperplasia devido a diminuição da acetilação de SIRT1 e aumento de sua atividade que, por sua vez inibe PPAR γ .

7. REFERÊNCIAS

(NCD-RISC), N. R. F. C. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. **Lancet**, v. 390, n. 10113, p. 2627-2642, Dec 2017. ISSN 1474-547X.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res**, v. 64, n. 15, p. 5245-50, Aug 2004. ISSN 0008-5472.

ANDRICH, D. E. et al. Altered Feeding Behaviors and Adiposity Precede Observable Weight Gain in Young Rats Submitted to a Short-Term High-Fat Diet. **J Nutr Metab**, v. 2018, p. 1498150, 2018. ISSN 2090-0724.

ATTWOOD, J. T., YUNG, R. L., RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2002, 59(2), 241–257.

BAE, E. J. Sirtuin 6, a possible therapeutic target for type 2 diabetes. **Arch Pharm Res**, v. 40, n. 12, p. 1380-1389, Dec 2017. ISSN 0253-6269.

BARBOSA DE QUEIROZ, K. et al. Physical activity prevents alterations in mitochondrial ultrastructure and glucometabolic parameters in a high-sugar diet model. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0172103, 2017. ISSN 1932-6203.

BARRÈS, R.; ZIERATH, J. R. The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. **Nat Rev Endocrinol**, v. 12, n. 8, p. 441-51, 08 2016. ISSN 1759-5037.

BISHOP, K. S.; FERGUSON, L. R. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 922-47, Jan 2015. ISSN 2072-6643.

BLANK, M. F.; GRUMMT, I. The seven faces of SIRT7. **Transcription**, v. 8, n. 2, p. 67-74, Mar 2017. ISSN 2154-1272.

BOEHM, O. et al. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. **Biol Chem**, v. 388, n. 5, p. 547-54, May 2007. ISSN 1431-6730.

BORTOLIN, R. C. et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and

gut microbiota disruption. **Int J Obes (Lond)**, v. 42, n. 3, p. 525-534, Mar 2018. ISSN 1476-5497.

BRINGMAN-RODENBARGER, L. R. et al. Emerging Roles for SIRT5 in Metabolism and Cancer. **Antioxid Redox Signal**, v. 28, n. 8, p. 677-690, 03 2018. ISSN 1557-7716.

BURTIS, C.; ASHWOOD, E.; BRUNS, D. E. **Tietz fundamentos de química clínica**. 6. ed. 2008. 959.

BUYKEN, A. E. et al. Association between carbohydrate quality and inflammatory markers: systematic review of observational and interventional studies. **Am J Clin Nutr**, v. 99, n. 4, p. 813-33, Apr 2014. ISSN 1938-3207.

BÄCKESJÖ, C. M. et al. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. **J Bone Miner Res**, v. 21, n. 7, p. 993-1002, Jul 2006. ISSN 0884-0431.

C. M. LIMA, A. K. L., M. G. D. MELO et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes **SCIENTIA PLENA**, v. 10, n. 3, 2014.

CANNON, B. and J. NEDERGAARD, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(1): p. 277-359.

CHALKIADAKI, A.; GUARENTE, L. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. **Cell Metab**, v. 16, n. 2, p. 180-8, Aug 2012. ISSN 1932-7420.

CHANG, H. C.; GUARENTE, L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 3, p. 138-45, Mar 2014. ISSN 1879-3061.

CHEN, B. et al. The chemical biology of sirtuins. **Chem Soc Rev**, v. 44, n. 15, p. 5246-64, Aug 2015. ISSN 1460-4744.

CHENG, Z.; ZHENG, L.; ALMEIDA, F. A. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond. **J Nutr Biochem**, v. 54, p. 1-10, Apr 2018. ISSN 1873-4847.

CHOE, S. S. et al. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 7, p. 30, 2016. ISSN 1664-2392.

COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Arch Med Sci**, v. 9, n. 2, p. 191-200, Apr 2013. ISSN 1734-1922.

COX, J. E.; LAUGHTON, W. B.; POWLEY, T. L. Precise estimation of carcass fat from total body water in rats and mice. **Physiol Behav**, v. 35, n. 6, p. 905-10, Dec 1985. ISSN 0031-9384.

D'ANGELO, G. et al. Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in Sprague-Dawley rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 806-11, Oct 2005. ISSN 1524-4563.

DE LUCA, A. et al. Nutriepigenomics and malnutrition. **Epigenomics**, v. 9, n. 6, p. 893-917, 06 2017. ISSN 1750-192X.

DE QUEIROZ, K. B. et al. Endurance training increases leptin expression in the retroperitoneal adipose tissue of rats fed with a high-sugar diet. **Lipids**, v. 49, n. 1, p. 85-96, Jan 2014. ISSN 1558-9307.

DE QUEIROZ, K. B. et al. Endurance training blocks uncoupling protein 1 up-regulation in brown adipose tissue while increasing uncoupling protein 3 in the muscle tissue of rats fed with a high-sugar diet. **Nutr Res**, v. 32, n. 9, p. 709-17, Sep 2012. ISSN 1879-0739.

ETCHEGARAY, J. P.; MOSTOSLAVSKY, R. Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. **Mol Cell**, v. 62, n. 5, p. 695-711, 06 2016. ISSN 1097-4164.

FANG, J. et al. Sirt7 promotes adipogenesis in the mouse by inhibiting autocatalytic activation of Sirt1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 40, p. E8352-E8361, Oct 2017. ISSN 1091-6490.

FARMER, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metab**, v. 4, n. 4, p. 263-73, Oct 2006. ISSN 1550-4131.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957. ISSN 0021-9258.

GAGGINI, M.; CARLI, F.; GASTALDELLI, A. The color of fat and its central role in the development and progression of metabolic diseases. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 31, n. 1, Sep 2017. ISSN 1868-1891.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol**, v. 316, n. 2, p. 129-39, Mar 2010. ISSN 1872-8057.

GIARDINA, S. et al. Modulation of Human Subcutaneous Adipose Tissue MicroRNA Profile Associated with Changes in Adiposity-Related Parameters. **Mol Nutr Food Res**, Oct 2017. ISSN 1613-4133.

GILLUM, M. P. et al. SirT1 regulates adipose tissue inflammation. **Diabetes**, v. 60, n. 12, p. 3235-45, Dec 2011. ISSN 1939-327X.

HACZEYNI, F.; BELL-ANDERSON, K. S.; FARRELL, G. C. Causes and mechanisms of adipocyte enlargement and adipose expansion. **Obes Rev**, Dec 2017. ISSN 1467-789X.

HE, Q. et al. Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0189837, 2017. ISSN 1932-6203.

HERNÁNDEZ-AGUILERA, A. et al. Epigenetics and nutrition-related epidemics of metabolic diseases: Current perspectives and challenges. **Food Chem Toxicol**, v. 96, p. 191-204, Oct 2016. ISSN 1873-6351.

HRON, B. M. et al. Relationship of insulin dynamics to body composition and resting energy expenditure following weight loss. **Obesity (Silver Spring)**, v. 23, n. 11, p. 2216-22, Nov 2015. ISSN 1930-739X.

JANG, H.; SERRA, C. Nutrition, epigenetics, and diseases. **Clin Nutr Res**, v. 3, n. 1, p. 1-8, Jan 2014. ISSN 2287-3732.

JANKE, R.; DODSON, A. E.; RINE, J. Metabolism and epigenetics. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 31, p. 473-496, 2015. ISSN 1530-8995.

JIA, G. et al. Vascular stiffness in insulin resistance and obesity. **Front Physiol**, v. 6, p. 231, 2015.

JOKINEN, R. et al. Adipose tissue NAD⁺-homeostasis, sirtuins and poly(ADP-ribose) polymerases -important players in mitochondrial metabolism and metabolic health. **Redox Biol**, v. 12, p. 246-263, Aug 2017. ISSN 2213-2317.

JUKARAINEN, S. et al. Obesity Is Associated With Low NAD(+)/SIRT Pathway Expression in Adipose Tissue of BMI-Discordant Monozygotic Twins. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 101, n. 1, p. 275-83, Jan 2016. ISSN 1945-7197.

KUMAR, S.; LOMBARD, D. B. Functions of the sirtuin deacylase SIRT5 in normal physiology and pathobiology. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 53, n. 3, p. 311-334, Jun 2018. ISSN 1549-7798.

KURYLOWICZ, A. In Search of New Therapeutic Targets in Obesity Treatment: Sirtuins. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 4, Apr 2016. ISSN 1422-0067.

LANDGRAF, K. et al. Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1249-61, Apr 2015. ISSN 1939-327X.

LEE, H. S. Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9492-507, Nov 2015. ISSN 2072-6643.

LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. . **Am. J. Physiol**, v. 89, p. 24-33, 1929.

LEVIN, B. E. Intracarotid glucose induced norepinephrine response and the development of diet induced obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 16, n. 6, p. 451-7, Jun 1992.

LI, D. et al. TET Family of Dioxygenases: Crucial Roles and Underlying Mechanisms. **Cytogenet Genome Res**, v. 146, n. 3, p. 171-80, 2015. ISSN 1424-859X.

LOMBARD, D. B.; ZWAANS, B. M. SIRT3: as simple as it seems? **Gerontology**, v. 60, n. 1, p. 56-64, 2014. ISSN 1423-0003.

LUZ, A. B. S. et al. Adipocytes and intestinal epithelium dysfunctions linking obesity to inflammation induced by high glycemic index pellet-diet in. **Biosci Rep**, v. 38, n. 3, Jun 2018. ISSN 1573-4935.

MA, X. et al. Control of adipocyte differentiation in different fat depots; implications for pathophysiology or therapy. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 1, 2015. ISSN 1664-2392.

MARIANA A. V. CARMO , A. B. G. P., KARINA B. QUEIROZ ,; RENATA G. SÁ , M. E. S., WANDERSON G. LIMA , EMERSON C.; OLIVEIRA , L. K. B. Swimming Exercise Did Not Ameliorate the Adverse

Effects of High-Sugar Diet in Young Rats. **Journal of Exercise Physiology**, v. 20, n. 3, p. 177-183, 2017.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-9, Jul 1985. ISSN 0012-186X.

MEI, Z. et al. Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 35, n. 1, p. 182, Dec 2016. ISSN 1756-9966.

MILAGRO, F. I. et al. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 4, p. 782-812, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 1872-9452.

MILNE, J. C. et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. **Nature**, v. 450, n. 7170, p. 712-6, Nov 2007. ISSN 1476-4687.

MN, M. et al. Differential response of rat strains to obesogenic diets underlines the importance of genetic makeup of an individual towards obesity. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 9162, Aug 2017. ISSN 2045-2322.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, Jan 2013. ISSN 1740-634X.

MORRIS, M. J. et al. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 58, p. 36-45, Nov 2015. ISSN 1873-7528.

NOGUEIRA-PAIVA, N. C. et al. Myenteric plexus is differentially affected by infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains in Beagle dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 51-60, Feb 2014. ISSN 1678-8060.

NOGUEIRAS, R. et al. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. **Physiol Rev**, v. 92, n. 3, p. 1479-514, Jul 2012. ISSN 1522-1210.

OSBORNE, B. et al. The role of mitochondrial sirtuins in health and disease. **Free Radic Biol Med**, v. 100, p. 164-174, 11 2016. ISSN 1873-4596.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011. ISSN 1474-1741.

PAGLIASSOTTI, M. J.; SHAHROKHI, K. A.; MOSCARELLO, M. Involvement of liver and skeletal muscle in sucrose-induced insulin resistance: dose-response studies. **Am J Physiol**, v. 266, n. 5 Pt 2, p. R1637-44, May 1994. ISSN 0002-9513.

PARIHAR, P. et al. Mitochondrial sirtuins: emerging roles in metabolic regulations, energy homeostasis and diseases. **Exp Gerontol**, v. 61, p. 130-41, Jan 2015. ISSN 1873-6815.

PELLEGRINELLI, V.; CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, v. 59, n. 6, p. 1075-88, Jun 2016. ISSN 1432-0428.

PENG, Y. et al. MicroRNAs: emerging roles in adipogenesis and obesity. **Cell Signal**, v. 26, n. 9, p. 1888-96, Sep 2014. ISSN 1873-3913.

PEPPLER, W. T. et al. Subcutaneous inguinal white adipose tissue is responsive to, but dispensable for, the metabolic health benefits of exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, p. ajpendo.00226.2017, Oct 2017. ISSN 1522-1555.

PERERA, T. et al. Effect of fluoride on major organs with the different time of exposure in rats. **Environ Health Prev Med**, v. 23, n. 1, p. 17, May 2018. ISSN 1347-4715.

PORTER LC , F. M., PIETKA T , YAMAGUCHI S , LIN JB , SASAKI Y , VERDIN E , APTE RS , YOSHINO J . NAD + -dependent deacetylase SIRT3 in adipocytes is dispensable for maintaining normal adipose tissue mitochondrial function and whole-body metabolism., 2018.

POUDYAL, H. et al. Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 12, p. E1472-82, Jun 2012. ISSN 1522-1555.

QI, L. Personalized nutrition and obesity. **Ann Med**, v. 46, n. 5, p. 247-52, Aug 2014. ISSN 1365-2060.

QUEIROZ, K. B. D. et al. Molecular mechanism driving retroperitoneal adipocyte hypertrophy and hyperplasia in response to a high-sugar diet. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 58, n. 12, p. 2331-2341, 2014.

RAMOS-ROMERO, S. et al. The combined action of omega-3 polyunsaturated fatty acids and grape proanthocyanidins on a rat model of diet-induced metabolic alterations. **Food Funct**, v. 7, n. 8, p. 3516-23, Aug 2016. ISSN 2042-650X.

REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 11, p. 633-643, Nov 2017. ISSN 1759-5037.

RIPPE, J. M.; ANGELOPOULOS, T. J. Added sugars and risk factors for obesity, diabetes and heart disease. **Int J Obes (Lond)**, v. 40 Suppl 1, p. S22-7, Mar 2016a. ISSN 1476-5497.

RIPPE E ANGELOPOULOS. Relationship between Added Sugars Consumption and Chronic Disease Risk Factors: Current Understanding. **Nutrients**, v. 8, n. 11, Nov 2016b. ISSN 2072-6643.

RODRÍGUEZ, A. et al. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 309, n. 8, p. E691-714, Oct 2015. ISSN 1522-1555.

RYU, D. et al. A SIRT7-dependent acetylation switch of GABP β 1 controls mitochondrial function. **Cell Metab**, v. 20, n. 5, p. 856-69, Nov 2014. ISSN 1932-7420.

SAKR, H. F. Modulation of metabolic and cardiac dysfunctions by swimming in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet: possible role of adiponectin. **J Physiol Pharmacol**, v. 64, n. 2, p. 231-40, Apr 2013. ISSN 1899-1505.

SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual* /Fritsch, Edward F. Maniatis, Thomas -2nd ed. ISBN 0-87969-309-6.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. **J Clin Invest**, v. 126, n. 1, p. 12-22, Jan 2016. ISSN 1558-8238.

SCHUG, T. T.; LI, X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. **Ann Med**, v. 43, n. 3, p. 198-211, May 2011. ISSN 1365-2060.

SHIN, J. et al. SIRT7 represses Myc activity to suppress ER stress and prevent fatty liver disease. **Cell Rep**, v. 5, n. 3, p. 654-665, Nov 2013. ISSN 2211-1247.

SINGH, C. K. et al. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. **Antioxid Redox Signal**, Oct 2017. ISSN 1557-7716.

SLOCUM, N. et al. Responses of brown adipose tissue to diet-induced obesity, exercise, dietary restriction and ephedrine treatment. **Exp Toxicol Pathol**, v. 65, n. 5, p. 549-57, Jul 2013. ISSN 1618-1433.

SMALL, L. et al. Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: what have high-fat and high-calorie diets revealed? **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 314, n. 3, p. E251-E265, Mar 2018. ISSN 1522-1555.

SONG MY , W. J., KA SO , BAE EJ , PARK BH. Insulin secretion impairment in Sirt6 knockout pancreatic β cells is mediated by suppression of the FoxO1-Pdx1-Glut2 pathway. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

SOUZA, W. M. et al. Effects of creatine supplementation on biomarkers of hepatic and renal function in young trained rats. **Toxicol Mech Methods**, v. 23, n. 9, p. 697-701, Nov 2013. ISSN 1537-6524.

STANFORD, K. I.; GOODYEAR, L. J. Exercise regulation of adipose tissue. **Adipocyte**, v. 5, n. 2, p. 153-62, 2016 Apr-Jun 2016. ISSN 2162-3945.

STANFORD, K. I.; MIDDELBECK, R. J.; GOODYEAR, L. J. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Being and Metabolic Adaptations. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2361-8, Jul 2015. ISSN 1939-327X.

STEPHENS, J. M. The fat controller: adipocyte development. **PLoS Biol**, v. 10, n. 11, p. e1001436, 2012. ISSN 1545-7885.

STOVER, P. J. et al. Emerging concepts on the role of epigenetics in the relationships between nutrition and health. **J Intern Med**, v. 284, n. 1, p. 37-49, Jul 2018. ISSN 1365-2796.

TSILOULIS, T.; WATT, M. J. Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 135, p. 175-201, 2015. ISSN 1878-0814.

VAN DIJK, S. J. et al. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 66, 2015. ISSN 1868-7083.

VASSILOPOULOS, A. et al. The human sirtuin family: evolutionary divergences and functions. **Hum Genomics**, v. 5, n. 5, p. 485-96, Jul 2011. ISSN 1479-7364.

VICKERS, M. H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. **Nutrients**, v. 6, n. 6, p. 2165-78, Jun 2014. ISSN 2072-6643.

VIDA, M. et al. CB1 blockade potentiates down-regulation of lipogenic gene expression in perirenal adipose tissue in high carbohydrate diet-induced obesity. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e90016, 2014. ISSN 1932-6203.

WALDMAN, H. S. et al. A shift toward a high-fat diet in the current metabolic paradigm: A new perspective. **Nutrition**, v. 46, p. 33-35, Feb 2018. ISSN 1873-1244.

WANG, F. et al. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. **Ageing Cell**, v. 6, n. 4, p. 505-14, Aug 2007. ISSN 1474-9718.

WU, J. et al. Sources and implications of NADH/NAD(+) redox imbalance in diabetes and its complications. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 9, p. 145-53, 2016. ISSN 1178-7007.

WU, X.; ZHANG, Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. **Nat Rev Genet**, v. 18, n. 9, p. 517-534, 09 2017. ISSN 1471-0064.

XU, X. et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 5, p. R1115-25, May 2011. ISSN 1522-1490.

YE, X. et al. Sirtuins in glucose and lipid metabolism. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 1845-1859, Jan 2017. ISSN 1949-2553.

YOSHIZAKI, T. et al. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 5, p. 1363-74, Mar 2009. ISSN 1098-5549.

YOSHIZAWA, T. et al. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. **Cell Metab**, v. 19, n. 4, p. 712-21, Apr 2014. ISSN 1932-7420.

ZHOU, Y.; PENG, J.; JIANG, S. Role of histone acetyltransferases and histone deacetylases in adipocyte differentiation and adipogenesis. **Eur J Cell Biol**, v. 93, n. 4, p. 170-7, Apr 2014. ISSN 1618-1298.

ZHOU, Y. et al. SIRT1 suppresses adipogenesis by activating Wnt/ β -catenin signaling in vivo and in vitro. **Oncotarget**, v. 7, n. 47, p. 77707-77720, Nov 2016. ISSN 1949-2553.

8. ANEXOS



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICIEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2014/45, intitulado "Efeito da dieta rica em carboidrato simples sobre a modulação metabólica e cardiovascular em ratos treinados por natação", que tem como responsável a Profa. Dra. Renata Guerra Sá Cota, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP.

Este certificado expira em 22/08/2016.

Ouro Preto, 18 de setembro de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP

Anexo I: Certificado de aprovação do protocolo nº. 2014/45, intitulado "Efeito da dieta rica em carboidratos simples sobre a modulação metabólica e cardiovascular em ratos treinados por natação.