

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

PPG CBIOL

Dissertação

**Avaliação do conteúdo
global de metilação do DNA
e expressão de sirtuínas no
pulmão de ratos wistar**

Luciene dos Santos Pereira

Ouro Preto
2020



UFOP

Luciene dos Santos Pereira

Avaliação do conteúdo global de metilação do DNA e expressão de sirtuínas no pulmão de ratos Wistar

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: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota

Co-orientadora: Dra. Natália Rocha Barboza

Ouro Preto – MG

2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P436a Pereira, Luciene dos Santos .
Avaliação do conteúdo global de metilação do DNA e expressão de sirtuínas no pulmão de ratos Wistar. [manuscrito] / Luciene dos Santos Pereira. - 2019.
67 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Renata Guerra.
Coorientadora: Dra. Natália Barboza.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto.
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Pulmões. 2. Carboidratos. 3. Enzimas. 5. Educação física. I. Barboza, Natália. II. Guerra, Renata. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.24

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Lutz - CRB6 1589



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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 16 dias do mês de dezembro do ano de 2019, às 14:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Luciene dos Santos Pereira, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota (Presidente - UFOP), pela Profa. Dra. Sílvia de Paula Gomes (Membro - UFOP), pelo Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima (Membro - UFOP) e pela Profa. Dra. Natália Rocha Barboza (Co-Orientadora - Externo). 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 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Avaliação do Conteúdo Global de Metilação do Dna e Expressão de Sirtuínas no Pulmão de Ratos Wistar", 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 0 minutos para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro Profa. Dra. Sílvia de Paula Gomes; segundo Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima; terceiro Profa. Dra. Natália Rocha Barboza; quarto Profa. Dra. 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, 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, 16 de dezembro de 2019.

Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota

Presidente

Profa. Dra. Natália Rocha Barboza

Profa. Dra. Sílvia de Paula Gomes

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima

Mestranda

Trabalho desenvolvido no Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB/UFOP) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) associado ao NUPEB/UFOP, no Biotério Centro de Ciência Animal da UFOP (CCA), e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

**Olho algum jamais viu, ouvido algum nunca ouviu e mente nenhuma imaginou
o que Deus dispôs para aqueles que o amam. ”**

(1 Coríntios 1:9)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jesus por me amar tanto assim e por sempre me conduzir pelo melhor caminho; suprimindo todas as minhas necessidades e cumprindo todas as suas promessas em minha vida.

À minha família, Kayran, Márcia, Maria, Maya e mãe por serem meu alicerce em todos os momentos e pelo amor incondicional.

À Francisca, por ser minha filha e companheira estando sempre ao lado da mamãe.

Minhas amadas, Grazi, Talita, Ingrydi, eu amo muito vocês.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFOP: Dainane Severino, Daiane, Isabela, Regina, Victor, Ester, Thales, Polyana, France Anne, Mônica, Joana, Virgínia, Helen e Yuri. Em especial à Deborah e Viviano pelo trabalhoso cuidado com os animais no biotério.

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

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

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

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

À Carol técnica pelo Laboratório Multiusuários de Microscopia do NUPEB/UFOP, pela parceria.

Aos colegas de 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

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 O epigenoma e a metilação do DNA	17
2.2 A metilação do DNA no pulmão.....	22
2.3 A família das sirtuínas.....	23
2.4 Expressão de sirtuínas no pulmão.....	25
2.5 A influência do meio-ambiente sobre as modificações epigenéticas.....	27
2.6 O desequilíbrio redox nos pulmões	32
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	35
4. OBJETIVO	37
4.1 Objetivos Específicos	37
5. MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 Desenho Experimental.....	38
5.2 Treinamento aeróbico de natação com carga de trabalho	40
5.3 Análises histológicas.....	41
5.4 Extração de gDNA.....	42
5.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	43
5.6 Quantificação da metilação global do DNA no pulmão por Imunoensaio Enzimático (ELISA) dos animais no período de 18 semanas.....	44
5.7 Análise da expressão gênica	44
5.7.1 <i>Extração de RNA</i>	44
5.7.2 <i>Síntese de cDNA</i>	45
5.3.1 <i>Seleção do controle endógeno</i>	45
5.7.4 <i>Análise da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR)</i>	46

5.1	Análise Estatística.....	48
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
6.1	Efeito do uso prolongado de uma dieta rica em carboidratos simples associado à atividade física sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	49
6.2	Análise da expressão gênica de sirtuínas no pulmão de ratos Wistar.....	49
6.3	Avaliação do perfil de metilação do DNA do pulmão.....	52
6.3.1	<i>Expressão de metilases do DNA.....</i>	52
6.3.2	<i>Expressão de demetilases do DNA.....</i>	54
6.3.3	<i>Conteúdo global de metilação do DNA.....</i>	56
6.4	Análise de parâmetros morfológicos no pulmão dos animais.....	58
6.5	Avaliação da expressão das enzimas antioxidantes Catalase e SOD no pulmão de ratos Wistar60	
6.6	Avaliação da expressão de citocinas inflamatórias interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF) no pulmão.....	62
6.7	Avaliação da infecção bacteriana no pulmão de animais de 18 semanas.....	66
7.	CONCLUSÃO E LIMITAÇÕES.....	69
8.	PERSPECTIVAS.....	70
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
10.	ANEXOS.....	76
10.1	Parâmetros bioquímicos séricos em ratos Wistar machos após 18 semanas.....	76
10.2	Parâmetros hematológicos dosados no sangue de ratos Wistar machos após 18 semanas de experimento.....	77
10.3	Lista de possíveis bactérias patogênicas encontradas nas fezes dos ratos Wistar, assim como número de cópias do DNA identificadas no sequenciamento em cada animal..	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Os principais mecanismos de modificações epigenéticas	18
Figura 2: Mecanismos de metilação, demetilação e remetilação do DNA	20
Figura 3: Integração de mecanismos regulatórios da cromatina em estudos epigenômicos	21
Figura 4: Membros da família de sirtuínas nos mamíferos e sua localização	24
Figura 5: Fatores que induzem alterações epigenéticas durante a vida	29
Figura 6: Mecanismos epigenéticos de regulação gênica	30
Figura 7: Visão geral das alterações epigenéticas no PGC-1α em um contexto patológico	31
Figura 8: Modelo proposto para patogênese centrada em mitocôndrias em doenças pulmonares induzidas por EROs	34
Figura 9: Mecanismo de neutrofilia exercido pelo tecido adiposo no pulmão	35
Figura 10: Modelo esquemático da distribuição dos ratos Wistar machos com 35 dias de vida em quatro diferentes grupos	38
Figura 11: Análise da qualidade do gDNA em gel de agarose a 0,6%	42
Figura 12: Gel de agarose 1,2% representativo da qualidade do RNA	44
Figura 13: Perfil de expressão mRNA de sirtuínas (1-7) no pulmão dos animais de 18 semanas	51
Figura 14: Perfil de expressão mRNA de metilases no pulmão dos animais de 18 semanas	55

Figura 15: Perfil de expressão mRNA de demetilases no pulmão dos animais de 18 semanas	56
Figura 16: Razão entre as expressões de metilases e desmetilases no pulmão dos animais de 18 semanas	57
Figura 17: Porcentagem de 5-metilcitosina (5-mC) de DNA extraído do pulmão de ratos alimentados com a dieta rica em carboidratos simples e submetidos ao treinamento físico de natação durante 18 semanas	58
Figura 18: Número de células inflamatórias no pulmão dos animais no período de 18 semanas	59
Figura 19: Avaliação quantitativa e qualitativa do processo inflamatório no pulmão de ratos Wistar submetidos ou não à dieta rica em carboidratos simples e ao treinamento físico	60
Figura 20: Perfil de expressão dos genes MnSOD, ZnSOD e Catalase no pulmão dos animais de 18 semanas	62
Figura 21: Perfil de expressão mRNA de IL6 e TNF no pulmão dos animais de 18 semanas	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição básica da ração Nuvilab CR-1. Dieta Controle Nuvilab	39
Tabela 2: Composição básica da dieta. Dieta Rica em Carboidratos Simples	39
Tabela 3: Esquema de sobrecarga de peso durante o treinamento físico de natação por 18 semanas	40
Tabela 4: Sequencias dos primers Forward e Reverse utilizados para análise da expressão gênica	45
Tabela 5: Parâmetros bioquímicos séricos de ratos Wistar machos, após 18 semanas ...	77
Tabela 6: Parâmetros hematológicos dosados no sangue de ratos Wistar machos, após 18 semanas de experimento	78
Tabela 7: Lista de possíveis bactérias patogênicas encontradas nas fezes dos ratos Wistar, assim como número de cópias do DNA identificadas no sequenciamento em cada animal	79

LISTA DE SIGLAS

CAT: Catalase

CCA: Centro de Ciência Animal

CG: Citosina-Guanina

CpG: Citosina-fosfato-guanina

DNMT: Metiltransferase de DNA

DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DNMT: DNA Metiltransferases

DNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio

FOXO: Fator de Transcrição *Forkhead Box*

GAPDH: Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase

GLUT: proteína transportadora de glicose

HDAC's: Desacetilases de Histonas

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade

HPRT1: Hipoxantina Fosforibosiltransferase

HDAC: Desacetilases de Histona da Classe III

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

NAD: Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

OMS: Organização Mundial de Saúde

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

RNA: Ácido Ribonucleico

SAM: S-Adenosil Metionina

SDRC: Sedentário Dieta Rica em Carboidratos Simples

SDC: Sedentário Dieta Controle

SOD: Superóxido Dismutase

SIRT: Sirtuína

SOD: Superóxido Dismutase

TDRC: Treinado Dieta Rica em Carboidratos Simples

TDC: Treinado Dieta Controle

TETs: Enzima Dez-Onze Translocase de DNA

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

RESUMO

A 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, atuam regulando a expressão de genes promovendo a reprogramação do epigenoma. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o consumo de uma dieta rica em carboidratos simples e da associação com um treino aeróbico de natação com carga, durante 18 semanas, seria capaz de induzir uma alteração no conteúdo global de metilação e na expressão de sirtuínas no tecido pulmonar de ratos Wistar. Inicialmente, 40 ratos Wistar com 35 dias de idade foram divididos em quatro grupos: Sedentário dieta controle (SDC), sedentário dieta rica em carboidratos (SDRC), treinado dieta controle (TDC) e treinado dieta rica em carboidratos (TDRC), os animais fizeram uso da dieta e do treinamento e após este período, eutanasiados. Os resultados mostraram que em todos os grupos analisados, independente da dieta consumida e do treinamento, a *Sirtuina (Sirt2)* foi o gene mais expresso, quando comparada à expressão de *Sirt 3, Sirt4, Sirt5, Sirt6 e Sirt 7*. Houve diferença significativa no conteúdo de 5-metilcitosina no tecido pulmão induzida pela SDRC ou pelo treinamento físico de natação ($p < 0,001$). Pode-se observar também, que não houve diferenças estatísticas nos níveis de expressão de enzimas responsáveis pela metilação do DNA (*Dnmt1, Dnmt3a e Dnmt3b*) bem como, das expressões das enzimas que demetilam o DNA (*Tet 2 e Tet 3*). Análises histológicas mostraram que, em todos os grupos avaliados, independente da dieta e do treinamento, a presença de processo inflamatório no parênquima pulmonar, não compatível com pulmão de ratos considerados com uma arquitetura pulmonar normal. Não houve alteração na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo: *Cat, MnSod, ZnSod*, bem como de citocinas inflamatórias: *IL6 e Tnf*, corroborando os resultados das análises histológicas. Foi possível detectar no tecido pulmonar que 30% dos animais dos grupos treinados apresentaram PCR positivo para o gene *rRNA 16S*, enquanto que nos animais sedentários esse percentual subiu para 70%, sugerindo que o treino aeróbico de natação diminuiu a carga bacteriana pulmonar. Em conjunto, os dados obtidos nos permitem concluir que a expressão gênica dos animais está muito heterogênia dentro do mesmo grupo o que não deixou evidente diferenças estatísticas que nos permitissem sugerir mecanismos epigenéticos induzidos pelo ambiente.

Palavras-chave: Carboidratos simples; metilação do DNA; pulmão; sirtuínas; treinamento físico.

ABSTRACT

Epigenetics is defined as the reversible and inheritable changes in the functional genome arising from environmental factors that do not alter the nucleotide sequence of DNA. The epigenetic mechanisms act by regulating the expression of genes promoting the reprogramming of the epigenome. Therefore, the objective of this work was to evaluate whether the consumption of a diet rich in simple carbohydrates and the association with aerobic training of swimming with load, during 18 weeks, would be able to induce a change in the global methylation content and in the expression of sirtuins in the lung tissue of Wistar rats. Initially, 40 Wistar rats aged 35 days were divided into four groups: Sedentary control diet (SDC), sedentary carbohydrate diet (SDRC), trained control diet (TDC) and trained carbohydrate diet (TDRC), animals made use of diet and training and after this period, euthanized. The results showed that in all the groups analyzed, regardless of the diet consumed and the training, Sirtuina (Sirt2) was the most expressed gene, when compared to the expression of Sirt 3, Sirt4, Sirt5, Sirt6 and Sirt 7. There was a significant difference in 5-methylcytosine content in lung tissue induced by SDRC or by swimming physical training ($p < 0.001$). It can also be observed that there were no statistical differences in the levels of expression of enzymes responsible for DNA methylation (Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b) as well as the expression of the enzymes that demethylate DNA (Tet 2 and Tet 3). Histological analyzes showed that, in all groups evaluated, regardless of diet and training, the presence of an inflammatory process in the lung parenchyma, not compatible with the lungs of rats considered to have a normal pulmonary architecture. There was no change in the expression of genes related to oxidative stress: Cat, MnSod, ZnSod, as well as inflammatory cytokines: IL6 and Tnf, corroborating the results of histological analyzes. It was possible to detect in lung tissue that 30% of the animals in the trained groups had positive PCR for the 16S rRNA gene, while in sedentary animals this percentage rose to 70%, suggesting that aerobic swimming training decreased the pulmonary bacterial load. Taken together, the data obtained allow us to conclude that the gene expression of animals is very heterogeneous within the same group, which did not leave evident statistical differences that would allow us to suggest epigenetic mechanisms induced by the environment.

Keywords: Simple carbohydrates; DNA methylation; lung; sirtuins; physical training.

1. INTRODUÇÃO

A epigenética refere-se às alterações herdáveis da função do gene que são produzidas sem a modificação da sequência nucleotídica. Essas mudanças na expressão gênica podem afetar uma célula, um tecido ou todo o organismo, podem persistir ao longo da vida e podem ser transmitidas por várias gerações, conhecida como herança epigenética transgeracional. Uma das formas pelas quais a metilação exerce seus efeitos epigenéticos sobre a atividade gênica é pela ligação de grupos metila a citosinas de um gene específico ou nas proximidades de um gene específico. Contudo, muitos dos efeitos da metilação sobre a expressão gênica são mais indiretos (SZABÓ et al., 2018).

As Dnmts promovem e mantêm a metilação nos genes sujeitos à regulação epigenética. Assim, quando os níveis de Dnmts estão altos, esses genes tendem a ser desativados ou silenciados. Por outro lado, baixos níveis de Dnmts e a consequente metilação reduzida resulta em maior expressão dos mesmos genes (KITADA et al., 2019).

As histonas também sofrem alterações epigenéticas, na qual a acetilação tem sido a alteração mais estudada. Foi demonstrado que a atividade das sirtuínas (membros da nicotinamida adenina dinucleotídeo-desacetilases dependentes) desempenha um papel fundamental em processos relacionados, como expectativa de vida celular, extensão organizacional, homeostase da glicose e diferenciação celular. Alguns processos patológicos ligados a distúrbios metabólicos ou envelhecimento podem estar relacionados à função imunomoduladora da família de sensores metabólicos. Dependendo do membro da família examinado e nas condições experimentais, as sirtuínas exibem propriedades pró ou anti-inflamatórias (GALLÍ, VAN GOOL & LEO, 2011).

Numerosos estudos mostraram os múltiplos papéis fisiológicos das sirtuínas, incluindo SIRT1, SIRT2, SIRT3 e SIRT6, na função celular, como metabolismo da glicose, função mitocondrial e resistência contra estresses celulares, incluindo estresse oxidativo e inflamação. A expressão de moléculas antienvelhecimento como sirtuínas demonstrou ser reduzido no pulmão de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. Embora pesquisas sobre o papel das sirtuínas na inflamação crônica estejam em um estágio muito inicial, evidências crescentes mostram que NAD^+ e transcrição de SIRT e/ou níveis de proteína são persistentemente reduzidos

em tecidos específicos durante um quadro de inflamação (RUTTEN et al., 2015). Diversos estudos epidemiológicos demonstram que escolhas de estilo de vida como dieta saudável e níveis recomendados de atividade física estão associados a risco reduzido de muitas doenças crônicas, incluindo as doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. No entanto, ainda é pouco conhecido como os comportamentos alimentares e estilo de vida induzem respostas ao nível molecular. Neste sentido, a hipótese de que comportamentos considerados como saudáveis têm impacto no risco de desenvolver doenças por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA vem sendo investigado. Todavia, nenhum estudo examinou o impacto de uma intervenção no estilo de vida, incluindo componentes da dieta e da atividade física no padrão de metilação do DNA do pulmão (BARRÓN-CABRERA et al., 2019) .

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O epigenoma e a metilação do DNA

O conjunto de “marcas” epigenéticas em um determinado tipo celular constitui o seu “Epigenoma”. O epigenoma na sua totalidade irá levar a um melhor entendimento de como a função do genoma é regulada na saúde e na doença, e também como a expressão genética é influenciada pela alimentação e pelo ambiente. Passado a era do sequenciamento do genoma humano (publicado em 2004), o esforço atual tem sido depositado em cima do sequenciamento do epigenoma, ou seja, na identificação de todas as citosinas metiladas ao longo do genoma (MOREIRA et al., 2015).

Os genes eram considerados como a única forma pela qual as características biológicas poderiam ser transmitidas através de sucessivas gerações. Entretanto, hoje existem várias evidências moleculares da existência de uma herança não genética. Estudos mostram que variações não-genéticas adquiridas durante a vida de um organismo podem frequentemente ser transmitidas para os descendentes; um fenômeno conhecido como herança epigenética (FANTAPPIE, 2013).

Mudanças no genoma são vagarosas, através de mutações randômicas (ao acaso) e para que um traço genético (ou fenótipo) se instale numa população, isso pode levar muito tempo. O epigenoma, por outro lado, pode mudar rapidamente em resposta aos diversos sinais que a célula pode receber. Nesse sentido, através da herança epigenética um organismo pode ajustar a expressão gênica de acordo com o ambiente onde vive, sem mudanças no seu genoma. Por exemplo, experiências vividas pelos pais (dieta, maus tratos, tratamento hormonal) podem ser transmitidas para as gerações futuras (STRAHL & ALLIS 2000).

Os mecanismos de modificações epigenéticas incluem a metilação do DNA, diferentes modificações não hereditárias de histonas e a regulação de RNAs não codificantes. A atividade gênica é condicionada pela estrutura da cromatina, e o estado permissivo de eucromatina ou restritivo de heterocromatina é mediado por proteínas de remodelação da cromatina, metilação do DNA e várias alterações nas histonas. Em conjunto, esses mecanismos atuam regulando a

expressão de genes promovendo a reprogramação do epigenoma (GARDNER et al. 2011) (Figura 1).

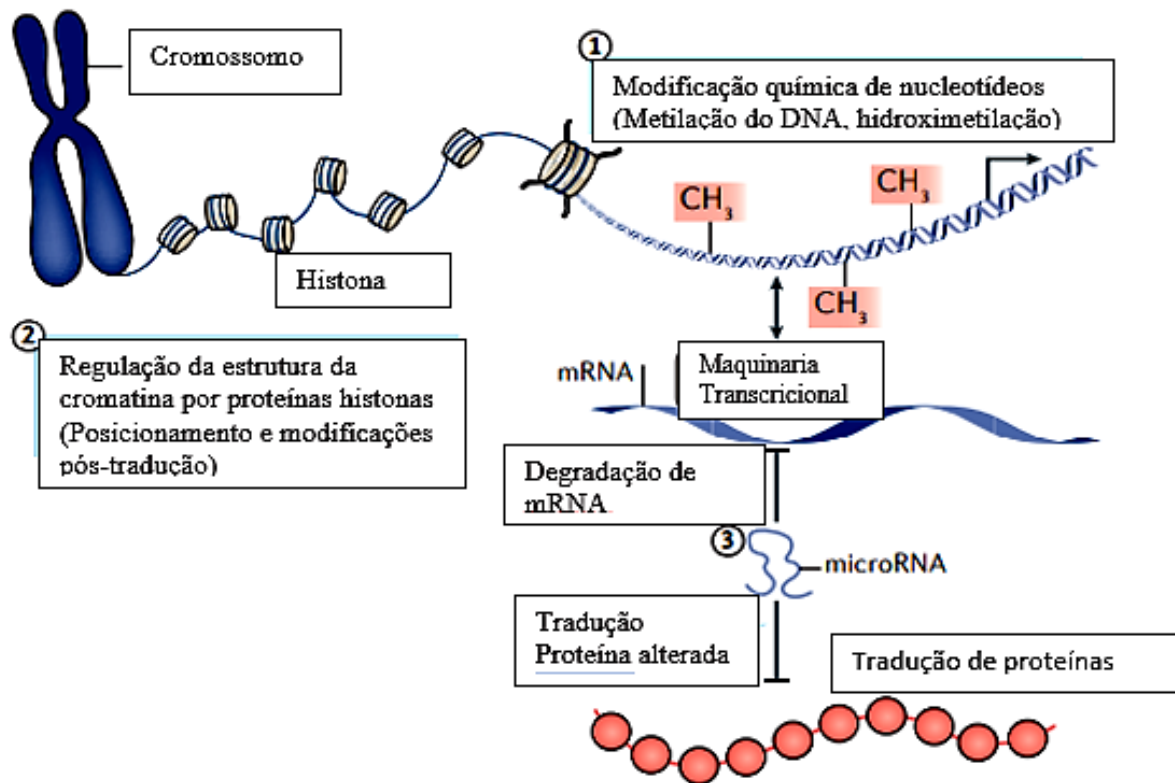


Figura 1: Os principais mecanismos de modificações epigenéticas. (1) Modificação de nucleosídeos no DNA, por metilação e hidroximetilação. (2) modificação pós-traducional da histona proteínas por metilação, acetilação, ubiquitinação, SUMOilação, citrulinação e ADP-ribosilação. (3) Alterações na pequena expressão de RNA não codificante. Nucleosídeo e modificações de histonas regulam a transcrição de genes modulando a conformação da cromatina e o acesso a fatores de ligação ao DNA. Pequenos RNAs não codificantes (como microRNAs) regulam a expressão gênica, promovendo a degradação do RNAm ou modulando tradução de proteínas (Adaptado de BARRÈS & ZIERATH, 2016).

A metilação do DNA envolve a transferência do grupo metil do S-adenosil-L-metionina (SAM) para resíduos de citosina (carbono 5) nos dinucleotídeos CpG. Esta reação é catalisada pelas DNA metiltransferases (Dnmts) e a hipermetilação destas regiões CpG promove o silenciamento transcricional decorrente do impedimento espacial da ligação de fatores de transcrição chaves à expressão, resultando em cromatina condensada e, conseqüentemente, numa inativação gênica. Já um estado de hipometilação significa ativação da expressão gênica (FANTAPPIE, 2015).

A adição de um grupo metil à molécula de DNA leva ao silenciamento de diversos genes, tendo um profundo impacto sobre a forma e a função das células e organismos, sem alterar o DNA correspondente. A metilação, e consequentemente o silenciamento de genes num determinado período do ciclo ou do desenvolvimento celular ou em determinados tipos celulares faz parte da estratégia evolutiva que culminou com o bom funcionamento celular (conhecido por homeostase) e de um organismo sadio. Caso esse padrão de metilação do DNA seja alterado, por exemplo, por agentes químicos afetando a atividade das metilases, um novo padrão de metilação no DNA será instalado, ativando ou inativando genes que deveriam permanecer silenciados, podendo ter efeitos significativos na vida (e na saúde) de um organismo. Esse novo padrão epigenético será passado para as gerações futuras, o que caracteriza uma “memória epigenética” (ZHANG & XUE, 2017).

A formação e manutenção da metilação do DNA são realizadas sob a ação das DNMTs que são compostos por três isoformas (Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b) em humanos (JURKOWSKA; JELTSCH, 2016). A Dnmt1 catalisa e mantém a metilação do DNA durante a replicação; enquanto os Dnmt3a e Dnmt3b desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário, catalisando a metilação de novo (LISTER et al., 2009).

A desmetilação do DNA é realizada principalmente pela família de proteínas Tets (enzima dez-onze translocase de DNA), que catalisam a conversão de metilcitosina (5mC) à hidroximetilcitosina (5hmC). A conversão em 5-metil-citosina do promotor normalmente leva à repressão da atividade transcricional (EGGER et al.2004; Geiman e Robertson 2002). O aumento da transcrição pode ser resultado da presença de 5-hidroximetilcitosina em regiões promotoras, indicando assim um papel na regulação da expressão gênica (JANKE et al., 2015; WU E ZHANG, 2017) (Figura 2).

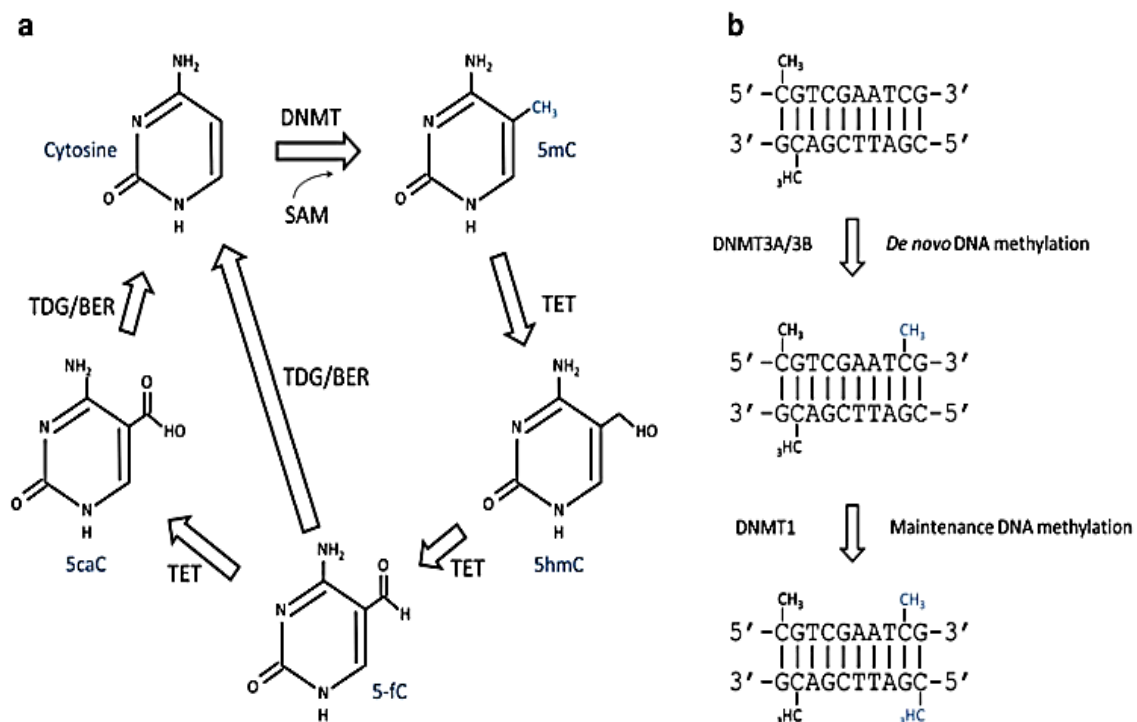


Figura 2: Mecanismos de metilação, demetilação e remetilação do DNA. (a) Ciclo dinâmico de demetilação e remetilação do DNA. DNMT: DNA metiltransferase; SAM: S-adenosilmetionina; 5mC de metilcitosina; 5hmC hidroximetilcitosina; 5fC 5-formilcitosina; 5caC carboxilcitosina; enzima de translocação TET dez-onze; TDG: timina-DNA glicosilase; TDG/BER Reparo por excisão de base mediada por TDG (b) metilação do DNA por DNMTs (DEMURA & SAIJOH, 2017).

Além da metilação do DNA, a modificação da estrutura das histonas (proteínas associadas à molécula de DNA e que determinam a intensidade da compactação da cromatina) também é considerada importante no silenciamento de genes. Uma vez adicionada a radical metila na citosina, ocorre a deacetilação das histonas, tornando a cromatina mais condensada e, portanto, inacessível aos processos de transcrição. As modificações pós-traducionais nas histonas incluem acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. A acetilação e a fosforilação são reversíveis e os efeitos na transcrição de genes são mutuamente antagônicos. A metilação da histona é realizada pela histona metil transferase (HMT), diferentemente do silenciamento da expressão gênica causado pela metilação do DNA, a metilação da histona pode ativar ou inibir a expressão gênica (HE et al., 2015) (Figura 3).

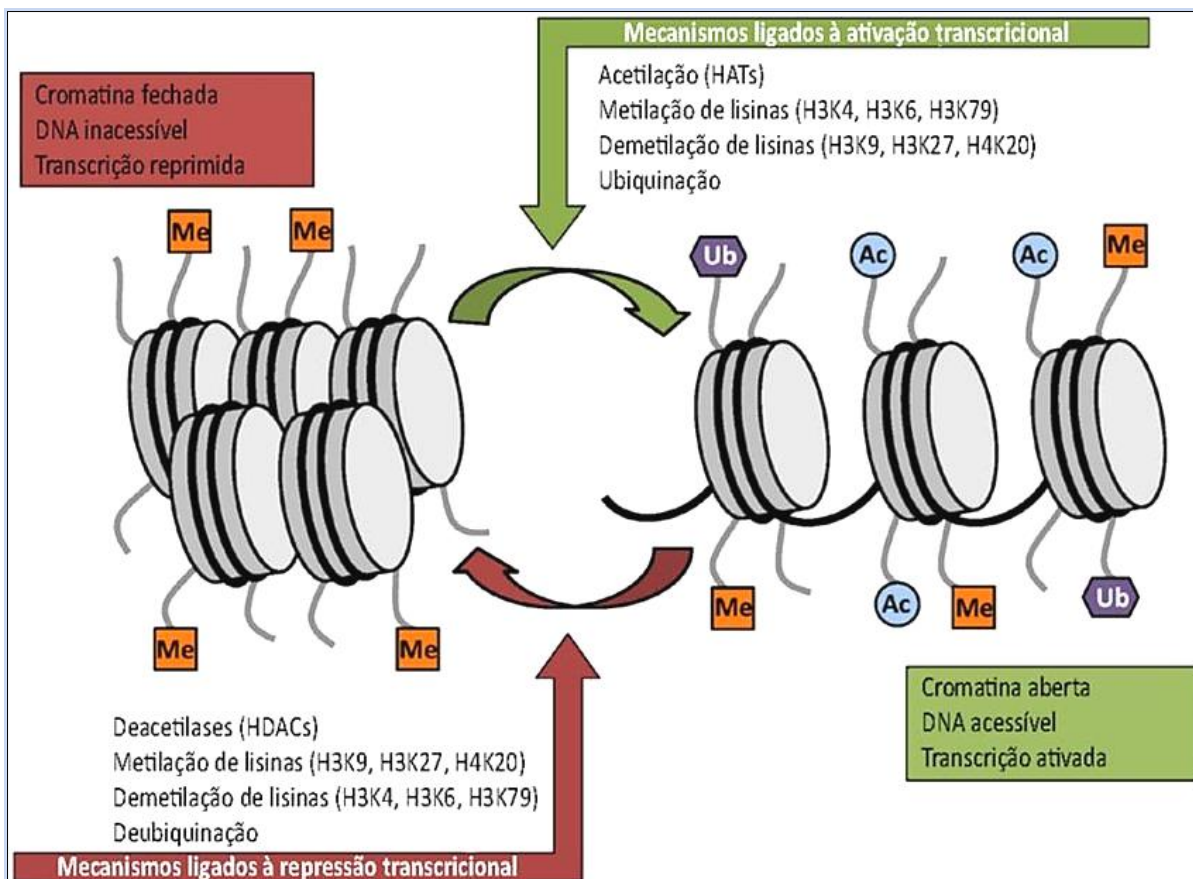


Figura 3: Integração de mecanismos regulatórios da cromatina em estudos epigenômicos. Principais modificações de histonas envolvidas na ativação ou repressão transcricional. Adaptado de Carey e Workman (VIEIRA, 2018).

Histonas metiltransferases (HMTs) são enzimas que adicionam grupos metil em resíduos de lisina e/ou arginina, enquanto as histonas demetilases (HDMs) são responsáveis por removê-los. Por sua vez, histonas acetiltransferases (HATs) catalisam a adição de grupos acetil às lisinas e às histonas desacetilases (HDACs) os removem. As implicações para a transcrição de muitas modificações de histonas permanecem incertas, mas existem boas evidências de que a desacetilação de histonas juntamente com a metilação de resíduos de lisina na (H3K9) e da (H3K27) estão associadas com o silenciamento da expressão gênica. Ao contrário, a acetilação e demetilação de H3K9 e da H3K27 junto com a metilação de H3K4 estão relacionadas à transcrição ativa dos genes associados. (QAZI et al., 2018).

Dessa forma, as modificações no DNA e nas 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; ZIERATH, 2016).

2.2 A Metilação do DNA no pulmão

É possível que a epigenética seja em parte responsável por alterações na expressão gênica que afeta o desenvolvimento de doenças. A regulação epigenética aberrante, como hiper e hipo-metilação em regiões promotoras de genes específicos está relacionada a uma ampla variedade de doenças, incluindo câncer e doença cardiovascular. Estudos demonstraram que doenças fibróticas levam a alterações epigenéticas no pulmão (BROWN et al., 2016).

Muitas doenças podem ter perfis específicos de metilação no DNA. A frequência de hipermetilação é muito maior do que a das mutações genéticas, que igualmente a hipometilação do genoma estão diretamente relacionadas a alterações causadas nas ilhas CpG (DO et al., 2015). A metilação da ilha CpG resultou na diminuição do gene supressor de tumor p14ARF e na super expressão do gene p53. Em pacientes com adenocarcinoma de pulmão pode ocorrer a expressão aumentada de p14ARF (YAN, HERMAN & GUO, 2015).

Do ponto de vista epidemiológico, existe uma possível associação entre estresse causado por alterações ambientais e um aumento da incidência de doenças pulmonares. O câncer é certamente uma doença humana na qual a associação com mecanismos epigenéticos é melhor compreendido. Em linhas gerais, o câncer está associado a uma perda significativa de metilação global do DNA e com a hipermetilação específica de loci, principalmente nas regiões promotoras (ilhas CpG) dos genes supressores de tumores. Estudos anteriores relataram a ocorrência de metilação do promotor em vários genes de reparo do DNA em câncer de pulmão (DO et al., 2015).

Um número crescente de estudos vem demonstrando o papel dos mecanismos epigenéticos, em particular a metilação do DNA, nos aspectos fisiológicos e patológicos, funções das células pulmonares, como na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e função pulmonar, disfunção vascular pulmonar, câncer de pulmão e infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. A relação da metilação do DNA com a etiologia de doenças pulmonares pode estar relacionada à associação de estresse crônico de restrição e perfil anormal de metilação do DNA nas células do pulmão, fornecendo assim evidências para apoiar a hipótese de que a metilação do DNA possa ser uma ponte molecular que liga o estresse comportamental ao câncer de pulmão (CHIDA et al., 2008).

Além de observar como a epigenética afeta o desenvolvimento da doença, há uma grande quantidade de potencial para o uso da epigenética como biomarcadores para o desenvolvimento da doença (HERCEG & VAISSIERE, 2011). Estudos relataram alterações no status de metilação de marcadores de metilação global, coincidindo com aumento da inflamação e disfunção endotelial (BIND et al., 2012). Além disso, a perda da metilação global do DNA está associada ao desenvolvimento de doenças crônicas (JONES & BAYLIN, 2007).

2.3 A família das sirtuínas

As sirtuínas são uma família de proteínas desacetilases evolutivamente conservadas em procariontes e eucariontes, dependentes de NAD^+ que desempenham um papel no controle do envelhecimento e da longevidade em diversos organismos (SATO, IMAI & GUARENTE, 2017). Nos mamíferos, existem sete sirtuínas, denominadas Sirt1 a Sirt7. Elas estão envolvidas em uma variedade de processos e vias celulares com localização e alvos moleculares distintos (DANG, 2014). Além de possuírem função desacetilase, as sirtuínas também evoluíram como mono ADP ribosiltransferases, lipoamidases (Sirt4), desmalonilases e desuccinilases (Sirt 5) (KELLY, 2010).

A família das sirtuínas é agrupada em quatro diferentes classes: a primeira classe das proteínas Sirtuínas NAD^+ desacetilase, compreende as Sirt1, Sirt2 e Sirt3. A Sirt1 tem sua localização no núcleo e no citoplasma, a Sirt2 é uma proteína que tem sua localização no citoplasma e no núcleo, Sirt3 está localizada nas mitocôndrias. A Sirt4 pertence a segunda classe de proteínas e está localizado nas mitocôndrias. Sirt5 é um membro da classe 3 e está localizada nas mitocôndrias. A quarta classe de sirtuínas compreende Sirt6 localizada no núcleo e Sirt7 localizado nos nucléolos (MEI et al., 2016). Essas enzimas desempenham importantes funções nos processos fisiológicos, tais como reparo do DNA, regulação da transcrição gênica, resposta ao estresse, metabolismo energético (SHAIKH, PRABHU & BHANDARY, 2018) (Figura 4).

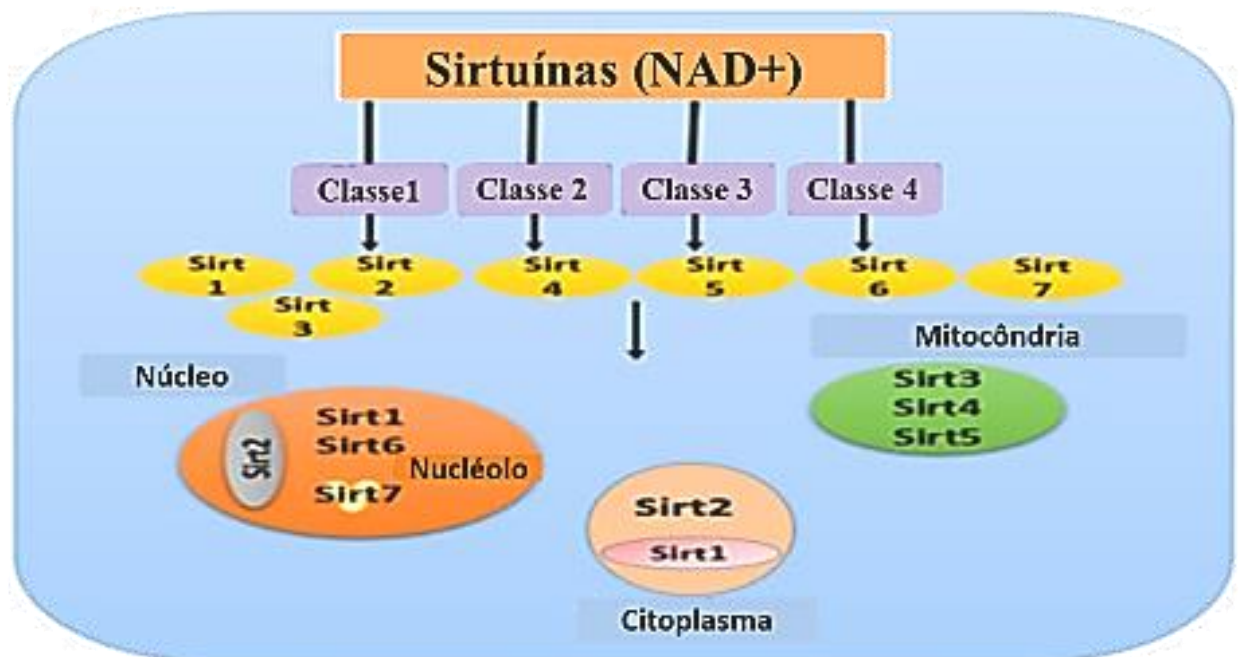


Figura 4: Membros da família de sirtuínas nos mamíferos e sua localização. (SHAIKH, PRABHU & BHANDARY, 2018)

As sirtuínas são reguladores importantes de uma ampla variedade de processos celulares e fisiológicos, tais como proliferação celular, diferenciação, resposta ao stress, estabilidade do genoma, sobrevivência celular, metabolismo e homeostasia energética e processo de envelhecimento. Estas participam também na regulação de diversas doenças, tais como neoplasias, doenças inflamatórias crônicas, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (SHAIKH, PRABHU & BHANDARY, 2018).

Estudos revelaram o envolvimento das sirtuínas em vários processos biológicos críticos, incluindo o metabolismo celular, estabilidade genômica, ciclo celular, divisão celular, diferenciação e regulação transcricional e suas funções na patogênese de uma variedade de doenças, como doenças metabólicas, doenças neurodegenerativas, envelhecimento, doenças cardiovasculares, e câncer (GONG et al., 2018). Os processos fisiológicos normais são acompanhados por alterações em níveis e atividade de sirtuínas. Por exemplo, o ritmo circadiano é controlado pela geração NAD⁺ e ativação e desativação cíclica de *Sirt1* e *Sirt6*, podendo influenciar a inflamação crônica ou aguda (VACHHARAJANI et al., 2016).

As sirtuínas foram inicialmente investigadas como mediadores do aumento da vida útil associado à restrição calórica em leveduras; no entanto, recentes estudos indicam que elas estão

envolvidas em uma variedade de funções, incluindo estabilidade genômica, tumorigênese inflamação e doenças metabólicas. Estudos mostraram que a superexpressão da *Sirt3* pode melhorar efetivamente lesões pulmonares agudas induzidas por hipóxia em camundongos, indicando uma aplicação para terapia genética baseada em *Sirt3* para tratar a síndrome do desconforto respiratório (TIAN & ZHANG, 2018).

Estudos recentes sugeriram que a fibrose pulmonar pode ser causada pela aceleração de mecanismos relacionados ao envelhecimento. As sirtuínas, particularmente *Sirt1*, *Sirt3* e *Sirt6* são mediadores bem conhecidos do envelhecimento. Envelhecimento é reconhecido como um dos fatores de risco para deficiências metabólicas, incluindo resistência à insulina e T2DM. Inflamação, desequilíbrio redox e disfunção mitocondrial são intimamente relacionados ao envelhecimento e à doença metabólica. As sirtuínas regulam o metabolismo através da regulação da inflamação, estresse oxidativo função mitocondrial através de múltiplos mecanismos, resultando na melhoria da resistência à insulina e T2DM (WYMAN et al., 2017).

2.4 Expressão de sirtuínas no pulmão

Nos pulmões, as sirtuínas também tem um importante papel na sua homeostase e estudos demonstraram que a expressão dessas enzimas é diminuída nas células pulmonares de indivíduos com doenças pulmonares crônicas. A *Sirt1* está associada à longevidade e sua expressão parece estar diminuída nos pulmões de pacientes com DPOC, inibindo a senescência celular, inflamação, autofagia, e atividade de metaloproteinases de matriz (RUTTEN et al., 2015).

Ichikawa *et al.* observaram que a expressão do RNAm de *Sirt1* nos pulmões com inflamação estava diminuída quando comparados com os pulmões de ratos controle, indicando os efeitos anti-inflamatórios da *Sirt1* e sua importância na redução da inflamação e na produção de citocinas, uma vez que a expressão diminuída de *Sirt1* aumentou a expressão dos níveis de *IL-6* (TANG et al., 2017).

Embora pesquisas sobre o papel da *Sirt1* na inflamação crônica no geral estejam em um estágio muito inicial, evidências crescentes mostram que NAD^+ e transcrição de *Sirt* e/ou níveis de proteína são persistentemente reduzidos em tecidos específicos durante a inflamação. As sirtuínas estão diretamente relacionadas com processos inflamatórios no pulmão, já que *Sirt1* é

identificada como regulador negativo da atividade de *NF-κB*. Vale ressaltar que a *Sirt1* não apenas desativa a atividade *NF-κB*, mas desempenha um papel na modulação da expressão de genes dependentes de *NF-κB*. Dessa forma, *Sirt1* demonstrou proteger os pulmões contra resposta inflamatória ao desequilíbrio redox (YAO *et al.* 2012). *Sirt1* e *Sirt6* compartilham semelhanças funcionais consideráveis nos pulmões e a expressão diminuída dessas proteínas está associada ao desenvolvimento das doenças pulmonares crônicas. *Sirt1* e *Sirt6* regula a troca metabólica da glicólise para oxidação de ácidos graxos nos monócitos durante a adaptação à inflamação aguda.

A *Sirt2* teve como primeiro substrato conhecido a α -tubulina. Esta regula diversas funções celulares como a progressão do ciclo celular, apoptose e a resposta ao stress (LOMBARD *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que o *Sirt2* desacetila uma variedade de proteínas citoplasmáticas e nucleares e é um modulador essencial dos processos celulares, incluindo ciclo celular, homeostase metabólica, apoptose e mecanismos de defesa antioxidante. Outros estudos também demonstraram que a *Sirt2* reduz a inflamação. Nos pulmões, os níveis de *Sirt2* são inibidos e tem como alvo certos genes apoptóticos como p53. A inibição de *Sirt2* promove a regulação de p53, bem como seu efeito na apoptose. Evidências crescentes mostram que a regulação negativa de *Sirt2* contribui para o câncer de pulmão (LEE *et al.*, 2019).

A *Sirt3* é a principal desacetilase na matriz mitocondrial e desempenha um papel fundamental no metabolismo energético e regulação redox (LOMBARD *et al.*, 2007). Ao contrário de *Sirt1*, a atividade do *Sirt3* é suprimida durante a fibrose no pulmão. Estudos reconheceram a *Sirt3* como uma proteína anti-fibrótica em fibrose e até provou que a atividade de *Sirt3* diminui durante a fibrose de órgãos, desempenhando um papel no dano mitocondrial do DNA durante fibrose pulmonar. Um defeito nos níveis de *Sirt3*, não apenas favorece o desenvolvimento de fibrose no pulmão, mas também desempenha um papel crucial no aumento de danos ao DNA mitocondrial, o que leva à apoptose. A Superexpressão de *Sirt3* inibiu o estresse oxidativo causado pela hipóxia em um modelo de camundongo. Evidência substancial sugere que a *Sirt3* possa ser direcionada para elucidar uma potencial abordagem terapêutica para tratar distúrbios respiratórios (LEE *et al.*, 2019).

A *Sirt3* participa da regulação de diversas funções metabólicas celulares tais como, secreção de insulina e oxidação de ácidos graxos. A depleção de *Sirt4* promove o desenvolvimento de hiperinsulinemia e neoplasia pulmonar (NASRIN *et al.*, 2010).

A *Sirt5* tem atividade de desacetilase que atua na carbamoil fosfato sintase (CPS1) e catalisa a etapa inicial do ciclo da ureia. (DU et al., 2011). As funções da *Sirt5* no metabolismo pulmonar ainda não estão muito claras.

Sirt6 é uma ADP-ribosiltransferase e recentemente foi demonstrado ser capaz de remover o grupo acetil da lisina da cadeia pesada de ácidos graxos de forma a regular a secreção do fator de necrose tumoral (*TNF*). A *Sirt6* participa na regulação da transcrição, estabilidade do genoma, metabolismo e no processo de envelhecimento (JIANG et al., 2013). Estudos provaram que a *Sirt6* é reconhecida como um mediador que promove fibrose, através da regulação negativa das vias de sinalização como TGF- β 1/Smad3. O excesso de concentração de *Sirt6* é responsável pela supressão da senescência celular causada por TGF- β . Níveis excessivos de *Sirt6* nas células epiteliais do pulmão levam a uma elevação senescência celular, bem como proliferação e apoptose no pulmão, além de suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões. *Sirt1* e *Sirt6* estão envolvidas na regulação de citocinas pró-inflamatórias, bem como na fibrose. A *Sirt6* atua como promotor de senescência celular causada por estresse (SHAIKH, PRABHU & BHANDARY, 2018).

A *Sirt7* regula a atividade da RNA polimerase 1 e a biogênese ribossômica e o seu bloqueio induz apoptose em células humanas (FORD et al., 2006). Estudos demonstram que baixos níveis de *Sirt7* são encontrados em pacientes com fibrose e o excesso de concentração de *Sirt7* inibiu as expressões das vias de sinalização Smad3, concluindo que os níveis da expressão de *Sirt7* nos fibroblastos pulmonares são modulados pela expressão de Smad3 e níveis reduzidos de *Sirt7* em fibrose pulmonar promovem a regulação de fibroblastos pulmonares (WYMAN et al., 2017).

2.5 A influência do meio-ambiente sobre as modificações epigenéticas

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a expectativa de vida humana aumentou no século passado na maioria dos países. Fatores ambientais como mudanças no estilo de vida e melhorias na prestação de cuidados de saúde são os principais contribuintes para esse aumento na expectativa de vida de idosos.

As condições ambientais podem afetar os mecanismos moleculares e o epigenoma celular para regular a expressão gênica e controlar o destino celular, o que pode eventualmente contribuir para o agravamento ou alívio de o processo de envelhecimento. Por exemplo, o acúmulo progressivo de alterações epigenéticas associadas ao envelhecimento poderia levar à regulação aberrante da expressão gênica, instabilidade metabólica, senescência de células-tronco e/ou exaustão e desequilíbrio da homeostase tecidual, os quais contribuem ao envelhecimento (ZHANG et al., 2020).

Os diversos tipos celulares respondem de acordo com o ambiente nutricional em que estão inseridos, pois o metabolismo energético se mantém interligado com a 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 aos modificantes ambientais, a exemplo, a diversidade nutricional a que as células são expostas (ETCHEGARAY & MOSTOSLAVSKY, 2016; DE LUCA et al., 2017) (Figura 5).

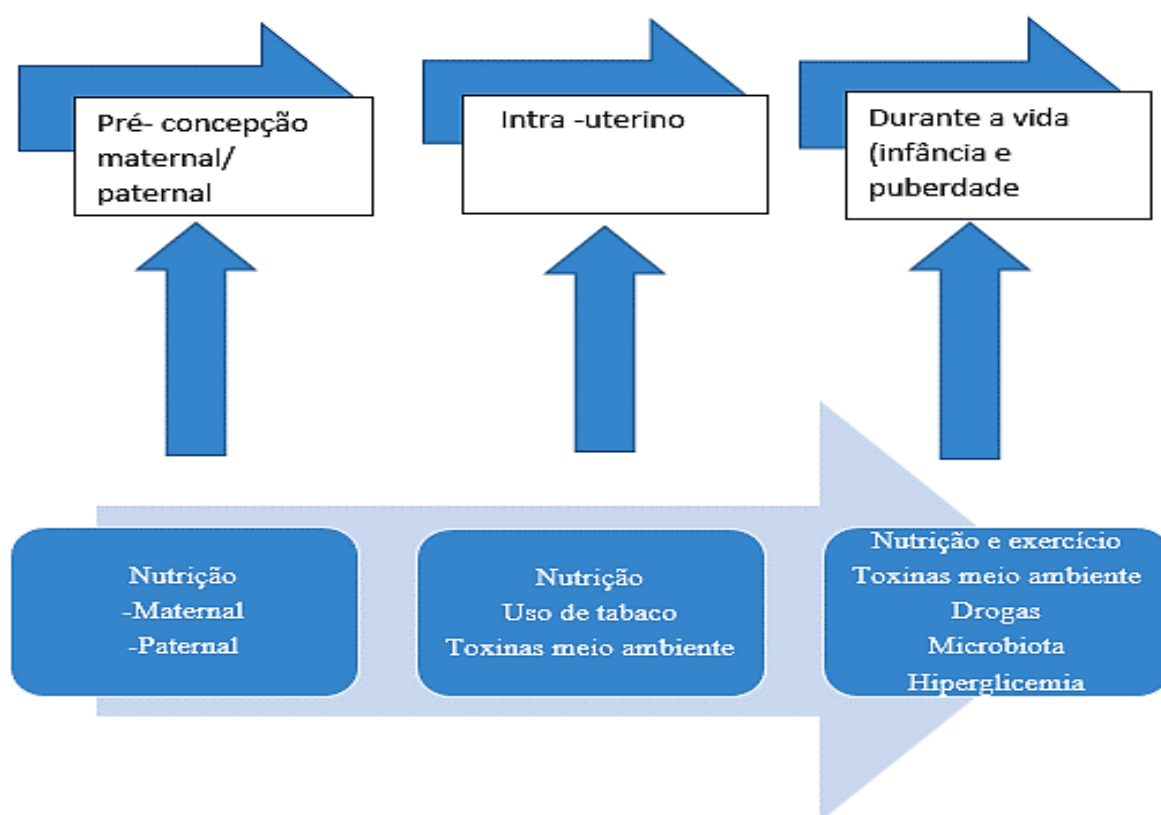


Figura 5: Fatores que induzem alterações epigenéticas durante a vida. (Adaptado de SZABÓ et al., 2018).

Os nutrientes podem alterar o padrão de transcrição gênica por modificações epigenéticas porque são capazes de alterar a disponibilidade dos substratos para as diferentes reações envolvidas nos mecanismos epigenéticos, sugerindo que a intervenção nutricional se torna uma possível forma de "reprogramar" o epigenoma e controlar a saúde. Entretanto, considerando a existência de um epigenoma tecido-específico e de uma sensibilidade diferencial aos componentes nutricionais da dieta, uma maior compreensão dos mecanismos responsáveis pela relação entre dieta-epigenoma-saúde permanecem por serem esclarecidos, bem como identificar quais marcadores epigenéticos são mais susceptíveis a uma alimentação mal equilibrada (TEDESCHI, 2012).

Os efeitos do uso crônico de uma dieta rica em carboidratos simples associado à prática de treino aeróbico de natação podem ter um impacto no perfil de metilação do DNA das células pulmonares de rato. Estudos tem demonstrado que o exercício físico tem um potencial para modular as alterações provocadas pelo treino nas células pulmonares. Dados de um estudo mostraram que o estresse causado por alterações ambientais induziu alterações no perfil de metilação do DNA das células pulmonares de ratos e que isso pode ser modulado por exercício físico (TOFFOLI et al., 2017).

Foi observado um perfil de metilação do DNA global diminuído em ratos submetidos ao estresse, causado por alterações ambientais, porém o exercício demonstrou proteção das células pulmonares contra essa hipometilação relacionada ao estresse. A expressão aumentada do gene *Dnmt1* foi evidenciada em células pulmonares de ratos submetidos ao estresse causado por alterações ambientais, enquanto foi demonstrado que o exercício protege as células pulmonares deste efeito relacionado ao estresse (TOFFOLI et al., 2017) (Figura 6).

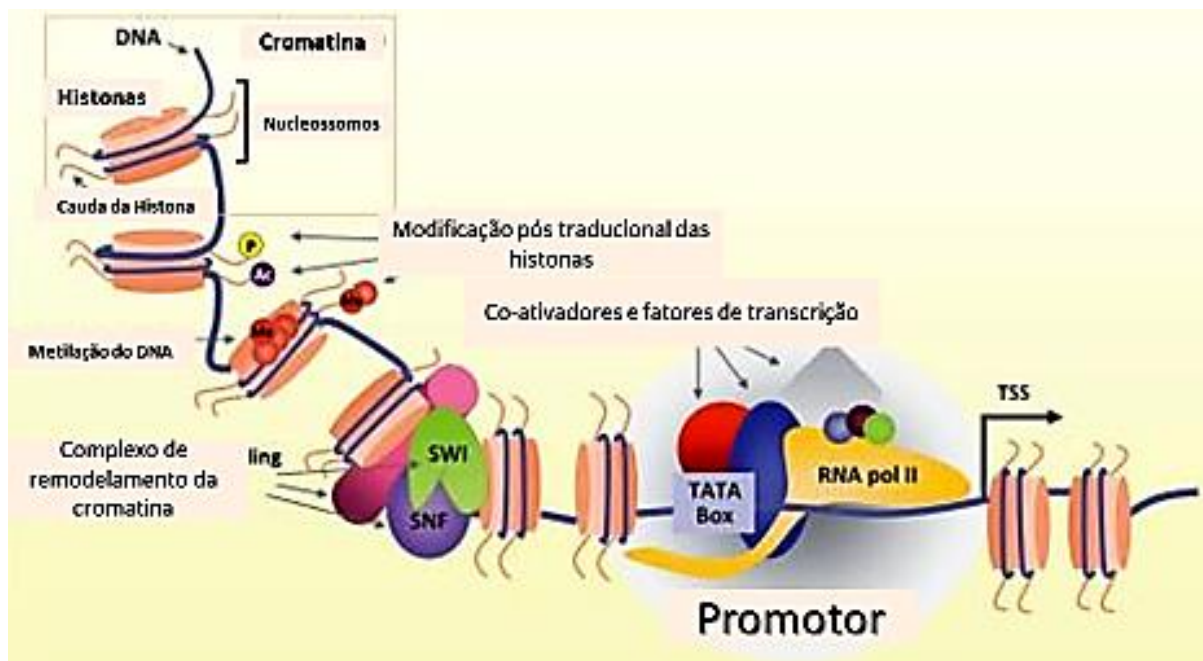


Figura 6: Mecanismos epigenéticos de regulação gênica. O DNA é envolvido em histonas, na qual complexos modificadores remodelam a cromatina e modificam histonas. As caudas de DNA e histonas sofrem modificações pós-traduccionais moldando a arquitetura da cromatina em um ambiente mais ou menos favorável promovendo ou inibindo a transcrição (Adaptado de TEDESCHI, 2012).

A atividade física regular também é capaz de alterar o padrão de transcrição gênica através de modificações epigenéticas, que tem efeitos positivos diretos no metabolismo geral, se tornando uma maneira de prevenir e tratar o risco de doenças como diabetes. O exercício aeróbico ajuda a prevenir o diabetes, promovendo a hipometilação de genes como *PPAR-γ* e *PGC-1α* no músculo esquelético (SANTOS et al. 2014). Além disso, o exercício causa hipometilação do DNA dos genes que codificam GLUT4, aumentando assim a expressão de GLUT4, contribuindo assim para a redução de hiperglicemia (Ntanasis-Stathopoulos et al. 2013).

A concentração de mRNA de *PGC1-α*, *PPAR-δ* e *NRF-1* nas mitocôndrias de células musculares em ratos aumentou durante o exercício aeróbico (SEEBACHER e GLANVILLE, 2010). Entretanto, estudos intervencionistas de curto prazo em humanos não puderam replicar os efeitos benéficos da atividade física. Apenas um exercício aeróbico regular de seis meses encontrou um aumento na metilação do DNA nos adipócitos (TRAVERS et al. 2013).

O exercício aeróbico induz adaptações musculares e alterações na expressão de genes e proteínas contribuem para essas adaptações. Modificações epigenéticas podem ser subjacentes à adaptação induzida pelo exercício aeróbico, que exerce um papel fundamental sobre a metilação do DNA no músculo esquelético. Em seu estudo, Barrès et al. 2016 demonstrou *in vivo* (humanos) e *ex vivo* (ratos) que exercício e contração, respectivamente, induzem a diminuição na metilação do DNA promovendo o aumento de sua expressão genética. Este estudo sugere que o exercício agudo aumenta a expressão de *PGC1* por inibição da metilação do DNA na sua área promotora.

A expressão gênica de *PGC-1α* é fortemente regulada quando alterações fenotípicas de um órgão requerem um aumento da produção de ATP. Uma vez ativado, o *PGC-1α* coordena o complexo e redes transcricionais específicas de tecido que mediam a plasticidade celular. Logo após sua descoberta, mecanismos epigenéticos têm sido associados à ação do *PGC-1α* como um coativador de transcrição. Mais recentemente, alterações epigenéticas foram identificadas por controlar a expressão gênica de *PGC-1α* em contextos fisiológicos e patológicos (KRÄMER & HANDSCHIN, 2019) (Figura 7).

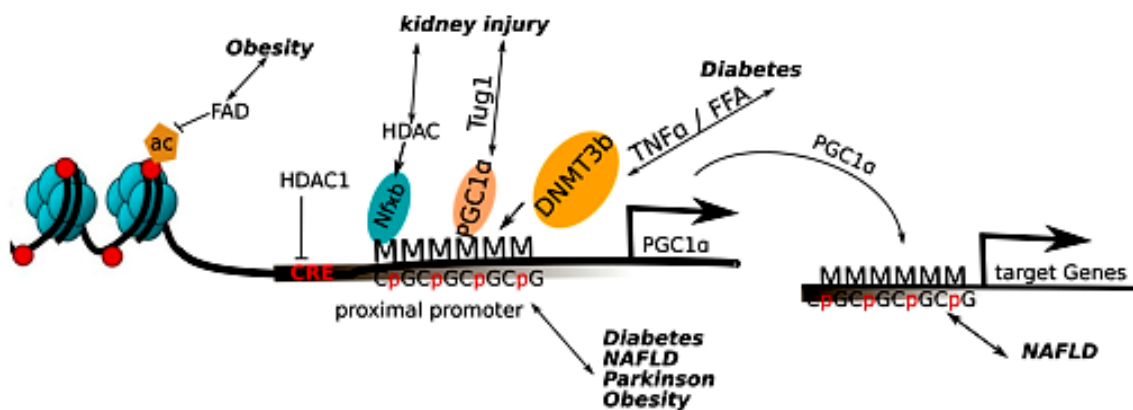


Figura 7: Visão geral das alterações epigenéticas no *PGC-1α* em um contexto patológico. Verificou-se que um aumento da metilação do promotor *PGC-1α* ocorre em obesidade, diabetes, doença gordurosa hepática não-alcoólica (DHGNA) e doença de Parkinson. Obesidade e diminuição do dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) levam a uma perda de acetilação da histona 3 e, portanto, a uma expressão gênica diminuída de *PGC-1α*. A exposição ao TNF ou FFA (ácidos graxos livres) leva a uma hipermetilação do promotor *PGC-1α* pela ativação do DNA metiltransferase 3b (DNMT3b) (KRÄMER & HANDSCHIN, 2019) .

Em função dos distúrbios relacionados com quadros de inflamação no pulmão, tem-se investigado quais os mecanismos envolvidos na alteração desse órgão. Neste contexto, as alterações nos padrões epigenéticos têm sido associadas aos distúrbios metabólicos relacionados à obesidade, síndrome metabólica e asma que estão vinculadas epidemiologicamente e mecanicamente, já que o excesso de gordura pressiona os pulmões (CHUN, 2015).

A obesidade está frequentemente relacionada a alterações na função pulmonar, secundárias a altas necessidades ventilatórias, esforço ventilatório elevado, ineficiência dos músculos respiratórios e complacência pulmonar reduzida. Os efeitos da obesidade na função pulmonar são causados pela presença de excesso de tecido adiposo no tórax e no abdômen, exercendo pressão no tórax, diafragma e pulmões, o que pode condicionar a redução do volume pulmonar e comprometer as trocas gasosas (MEDAROV, STRACHAN & COHEN, 2005).

2.6 O desequilíbrio redox nos pulmões

Inflamação e desequilíbrio redox são conhecidos como causas de danos nos telômeros, passíveis de causar inflamação, favorecendo um ciclo patogênico vicioso. Devido à heterogeneidade da inflamação sistêmica, diversas associações significativas foram observadas entre os marcadores de envelhecimento e marcadores individuais de inflamação sistêmica e a capacidade antioxidante. Em estudos com animais, um papel primordial da capacidade antioxidante para o envelhecimento tem sido demonstrado pela expressão do gene catalase (RUTTEN et al., 2015).

Os pulmões existem em um ambiente com alto teor de oxigênio. Sua grande área de superfície e alto suprimento sangüíneo tornam os pulmões suscetíveis a lesões mediadas pelo desequilíbrio redox. Espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas endogenamente e exogenamente. Durante a exposição exógena às EROs, gases ambientais, como aldeídos, carbonilas, NO₂, SO₂, CO e material particulado transportado pelo ar, assim como a fumaça do cigarro, podem causar desequilíbrio redox e desencadear respostas inflamatórias nos pulmões. Além disso, o comprometimento dos sistemas de defesa antioxidante em células epiteliais pulmonares, macrófagos e outras células inflamatórias pode levar a altos níveis de EROs endógenos nos tecidos. (WANG et al., 2017).

A disfunção mitocondrial induzida por ERO e fragmentos danificados de DNA mitocondrial (mtDNA) estão envolvidos na patobiologia de várias doenças pulmonares degenerativas, fibrose pulmonar e tumorigênese pulmonar. Esses achados implicam que os antioxidantes podem desintoxicar os radicais livres e modular as reações redox de oxigênio para aumentar a biossíntese da glutathione (GSH), melhorar o remodelamento da cromatina e diminuir a inflamação pulmonar (RUTTEN et al., 2015).

A *Sirt3* é uma importante proteína mitocondrial que controla vários aspectos da função mitocondrial por desacetilação de proteínas da matriz mitocondrial, incluindo antioxidantes efetores e proteínas envolvidos na cadeia de transporte de elétrons, portanto, atuando como um supressor de tumor, limitando a produção de ERO. A *Sirt3* é importante para a função mitocondrial, limitando o estresse oxidativo e reduzindo a produção de ERO, o que resulta em uma diminuição no potencial da membrana mitocondrial. Um estudo anterior demonstrou que o *Sirt3* melhorou a expressão de certas proteínas antioxidantes, incluindo a superóxido dismutase (SOD), enzima que catalisa a dismutação ou partição do radical superóxido tóxico em oxigênio molecular comum ou peróxido de hidrogênio. Superóxido é produzido como subproduto do metabolismo do oxigênio e causa vários tipos de danos às células ou tecidos. Assim, o SOD é uma das principais defesas antioxidante em quase todas as células vivas expostas (TIAN & ZHANG, 2018) (Figura 8).

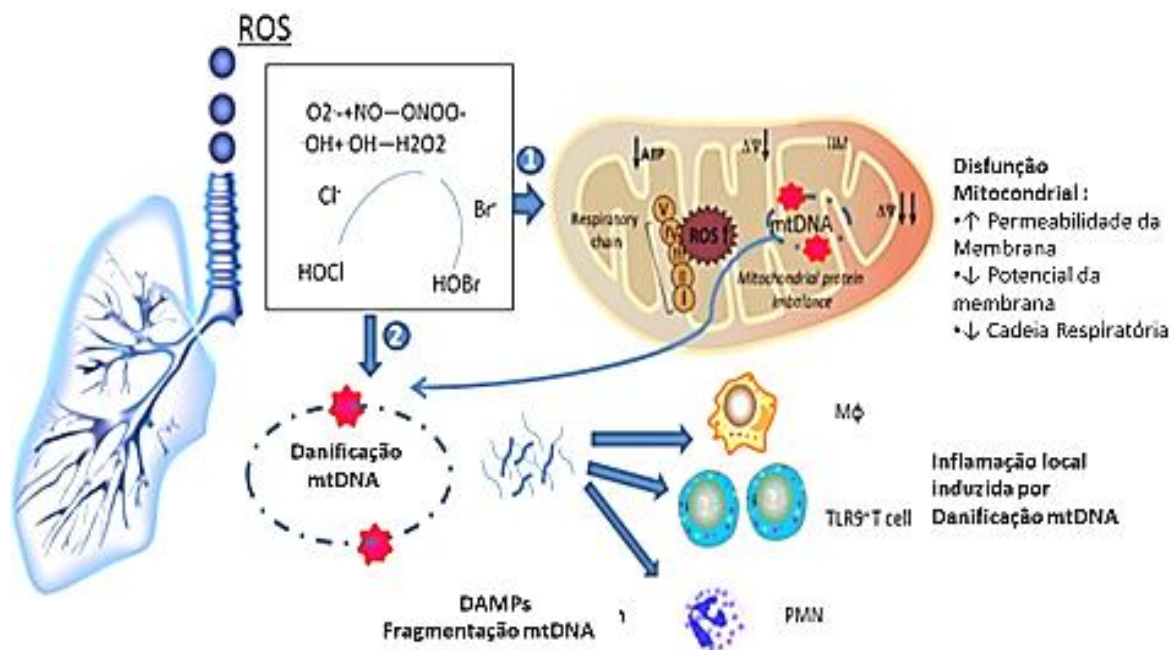


Figura 8: Modelo proposto para patogênese centrada em mitocôndrias em doenças pulmonares induzidas por ERO. Espécies reativas de oxigênio (EROs), comumente de exposição exógena à fumaça e poluição do ar, podem ser inaladas pelos pulmões. O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pode reagir com o NO para formar a molécula de peroxinitrito altamente reativa ($ONOO^-$). Na presença de íons cloreto (Cl^-) e brometo (Br^-), os oxidantes muito prejudiciais: ácido hipocloroso (HClO) e ácido hipobromoso (HBrO) são gerados a partir da peroxidase de hidrogênio (H_2O_2). (1) Disfunção mitocondrial induzida por EROs: quando a concentração de ROS aumenta na mitocôndria, o complexo de transferência de cadeia de elétrons (ETC) torna-se defeituoso e leva à perda de potencial de membrana mitocondrial e à permeabilidade da membrana. (2) Resposta imune associada ao DNA mitocondrial (mtDNA): fragmentos de mtDNA danificados são liberados da mitocôndria. As partículas imunogênicas podem recrutar várias células imunes, como macrófagos, células T $TLR9^+$ e neutrófilos, para a área danificada para iniciar reações inflamatórias e imunológicas (Adaptado de LIU & CHEN, 2017).

As mitocôndrias estão criticamente envolvidas em doenças pulmonares dependentes de espécies reativas de oxigênio (EROs), como fibrose pulmonar, asbestose, doenças crônicas das vias aéreas e câncer de pulmão. O direcionamento do desequilíbrio redox com agentes antioxidantes, como moléculas de tiol, polifenóis e superóxido dismutase (SOD), e a promoção da biogênese mitocondrial devem ser considerados como novas estratégias para o tratamento de doenças pulmonares que atualmente não possuem opções terapêuticas efetivas (LIU & CHEN, 2017). Estudos comprovaram que a prática de natação fornece uma proteção significativa contra o estresse oxidativo e aumenta as defesas antioxidantes protegendo o indivíduo contra doenças (QIN et al., 2016).

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Desde 2008, o nosso grupo de pesquisa vem estudando o efeito de dietas ricas em carboidratos simples no metabolismo de lipídeos e carboidratos. Foi estabelecido um modelo para avaliar os efeitos de uma dieta rica em carboidratos simples, em associação com o treinamento de *endurance*, sobre a distribuição dos depósitos adiposos retroperitoneal (TAR), inguinal (TAI) e marrom (TAM) e sobre níveis plasmáticos de leptina, insulina e ácidos graxos não-esterificados (NEFAs), bem como a expressão relativa de Ucp1 no TAM, e leptina e seu receptor no TAR. Foram observadas alterações na adiposidade corporal induzida pela dieta, bem como o treinamento físico não impediu o desenvolvimento do tecido adiposo em animais alimentados com a dieta rica em carboidratos simples (DE QUEIROZ et al., 2014).

Outro estudo também realizado em nosso laboratório mostrou que o treinamento aeróbico de natação pode reverter os efeitos do ganho de massa corpórea e aumento dos índices de adiposidade provocado pela dieta rica em carboidratos simples em ratos wistar alimentados no período de quatro e oito semanas, sendo que o treino pode apresentar uma relação direta no controle epigenético no tecido adiposo do animal como a *downregulation* dos RNAm das *Sirt 3* e *Sirt 5* (SANTOS, 2018) (Figura 9).

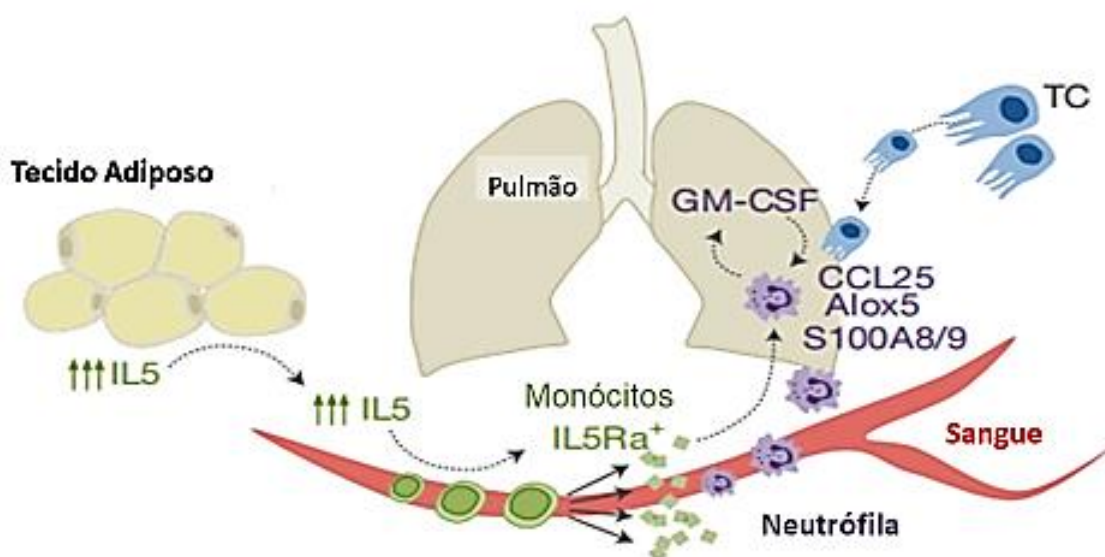


Figura 9: Mecanismo de neutrofilia exercido pelo tecido adiposo no pulmão. O excesso de tecido adiposo no interior da cavidade abdominal promove um aumento da pressão intra-abdominal que provoca um alongamento excessivo do diafragma, conduzindo a uma elevação do mesmo e, por sua vez, a uma diminuição da eficácia do músculo. Este fenômeno é responsável pela compressão do parênquima pulmonar, especialmente nas bases do pulmão (QUAIL et al., 2017).

Estudos comprovam que a função pulmonar prejudicada está associada a componentes individuais da síndrome metabólica (dislipidemia, hiperglicemia de jejum, obesidade abdominal, hipertensão). A obesidade, síndrome metabólica e asma estão vinculadas epidemiologicamente e mecanicamente ao excesso de gordura que pressiona os pulmões. Nas próximas duas décadas, prevê-se que a proporção de mortes e incapacidades decorrentes de doenças pulmonares crônicas aumente significativamente, mas poucos avanços foram feitos para tratar efetivamente a maioria das doenças pulmonares (BAFFI et al., 2016).

Como a obesidade pode estar relacionada a doenças pulmonares e foi verificada a influência da dieta e exercício no padrão de metilação e expressão de sirtuínas no tecido adiposo. A hipótese do nosso trabalho foi que essas variáveis também poderiam promover alterações epigenéticas no tecido pulmonar, favorecendo o surgimento de doenças.

4. OBJETIVO

Avaliar possíveis alterações epigenéticas e a expressão de sirtuínas no pulmão de ratos Wistar alimentados com dieta rica em carboidratos simples e submetidos ao treinamento de natação.

4.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito da dieta e interação treinamento/sedentarismo sobre os níveis de expressão de sirtuínas no pulmão dos animais;
- ✓ Avaliar as expressões de metilases e demetilases no pulmão dos animais, bem como a metilação global nesse órgão;
- ✓ Avaliar o efeito da dieta e interação treinamento/sedentarismo na histologia pulmonar dos animais;
- ✓ Avaliar a expressão das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (Cat) no pulmão dos animais
- ✓ Avaliar a expressão de citocinas inflamatórias *TNF* e *IL-6* no pulmão dos animais;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho Experimental

Ratos machos da linhagem Wistar recém-desmamados ao completarem 35 dias e com massa corporal entre 40 e 65g, foram divididos em quatro grupos: 1) ratos sedentários alimentados com uma dieta controle (SDC, N = 10); 2) ratos sedentários alimentados com uma dieta rica em carboidratos simples (SDRC, N = 10); 3) ratos treinados alimentados com uma dieta controle (TDC, N = 10); 4) ratos treinados alimentados com uma dieta rica em carboidratos simples (TDRC, N =10). O total de 40 animais provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP foi alojado em gaiolas coletivas, não excedendo cinco animais por gaiola, sob condições de luz (12/12h) e temperatura ($24,0 \pm 2,0$ °C) controladas, com água e dietas fornecidas. 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 2016/26. Os pulmões dos ratos Wistar foram cedidos gentilmente pela mestrandia Deborah Campos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFOP (Figura 10).

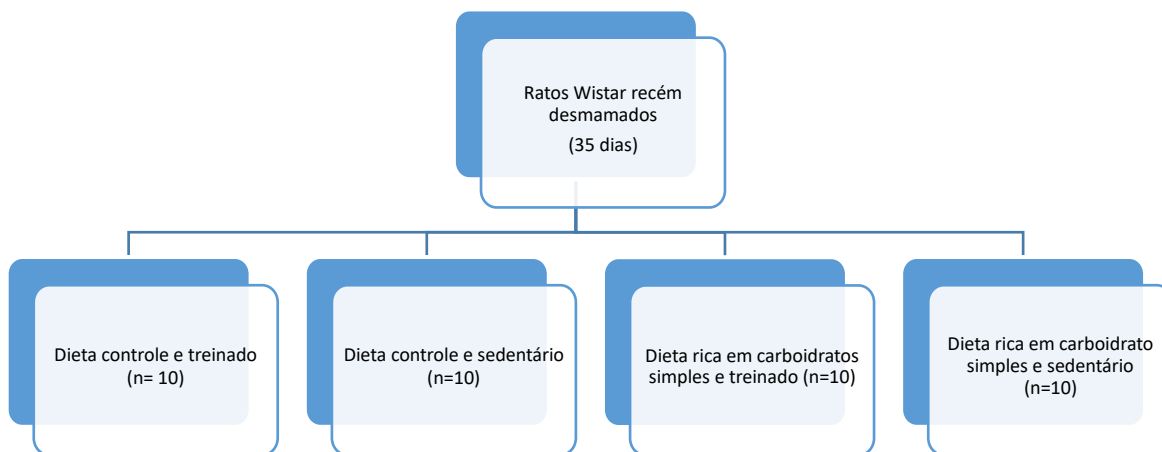


Figura 10: Modelo esquemático da distribuição dos ratos Wistar machos com 35 dias de vida em quatro diferentes grupos.

Os animais dos grupos controles (SDC e TDC) foram alimentados com ração comercial para ratos (Nuvilab CR-1, Colombo, Brasil), (Tabela 1), enquanto que, os animais dos grupos experimentais (SDRC e TDRC) foram alimentados com uma dieta rica em carboidratos simples, porém isocalórica composta por 40,45% de ração comercial (Nuvilab CR1, Colombo, Brasil), 8,58% de açúcar, 40,45% de leite condensado e 10,52% de água (Tabela 2) durante o período de 18 semanas.

Tabela 1: Composição básica da ração Nuvilab CR-1. Dieta Controle Nuvilab

Composição Nutricional	Unidade	Dieta Controle (Nuvilab CR-1)
Calorias	Kcal/100 g	308,52
Carboidratos	g/100g	44,08
Cinzas	g/100g	6,87
Fibra bruta	g/100g	11,43
Gordura Total	g/100g	5,06
Proteína	g/100g	21,67
Umidade	g/100g	10,89

Os cálculos nutricionais foram baseados em análises bromatológicas de ambas as rações. Ração para ratos (Nuvilab CR-1, Colombo, Brasil) e ração rica em carboidratos simples.

Tabela 2: Composição básica da dieta. Dieta Rica em Carboidratos Simples

Composição Nutricional	Unidade	Dieta Rica em Carboidratos Simples
Calorias	Kcal/100 g	286,36
Carboidratos	g/100g	47,86
Cinzas	g/100g	3,63
Fibra bruta	g/100g	5,08
Gordura Total	g/100g	4,85
Proteína	g/100g	12,81
Umidade	g/100g	25,77

Os cálculos nutricionais foram baseados em análises bromatológicas de ambas as rações. Ração para ratos (Nuvilab CR-1, Colombo, Brasil) e ração rica em carboidratos simples.

5.2 Treinamento aeróbico de natação com carga de trabalho

Durante o período de 18 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 (uma semana) os ratos nadaram sem sobrecarga por 15 minutos no primeiro dia, 30 minutos no segundo, 45 minutos no terceiro, 60 minutos no quarto e 60 minutos no quinto e último dia de adaptação. A partir da 2ª semana, os animais foram submetidos às cargas equivalentes ao peso corporal. Esta carga foi acrescida de 0,5% semanalmente até atingir 3% do peso corporal. As cargas foram confeccionadas com fio de solda e foram adicionadas à cauda do animal para realização do treinamento. Os animais foram submetidos a uma hora por dia de treinamento de natação em tanques coletivos, durante cinco dias consecutivos da semana. Para evitar a

diminuição da temperatura corporal, após cada sessão de natação, os ratos foram secados individualmente (CARMO et al., 2017) (Tabela 3).

Tabela 3: Esquema de sobrecarga de peso durante o treinamento físico de natação por 18 semanas.

Grupos (TDC e TDR)		
Acréscimo de carga (% em relação à massa corporal)		
Semana	Tempo por sessão	Carga
1^a (adaptação)	Crescente 15 min – 60 min	0%
2 ^a	60 min	0,5%
3 ^a	60 min	1%
4 ^a	60 min	1,5%
5 ^a	60 min	2%
6 ^a	60 min	2,5%
7 ^a à 18	60 min	3%

TDC - treinado dieta controle, TDR - treinado dieta rica em carboidratos simples.

5.3 Análises histológicas

Fragmentos de pulmão, fixados em solução de Metanol 80%-DMSO 20% foram processados rotineiramente e incluídos em blocos de parafina. Cortes histológicos de aproximadamente 4 μ m de espessura obtidos através da microtomia foram submetidos à coloração de hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram visualizados utilizando-se objetiva de 40X e 30 imagens aleatórias (área de cada imagem/campo = 35.493,7 μ m²) por animal foram digitalizadas através da microcâmera Leica MC170HD associada ao microscópio Leica DM5000B no Laboratório Multiusuários de Microscopia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. O processo inflamatório foi avaliado através da quantificação dos núcleos celulares presentes nas imagens geradas (área total avaliada = 1,06x10⁶ μ m²) com o auxílio do software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3.

5.4 Extração de gDNA

A extração de DNA genômico do pulmão foi realizada utilizando-se o KIT *Wizard Genomics DNA purification* (Promega), no qual 10mg de tecido foram macerados em nitrogênio líquido em um gral de porcelana. Posteriormente, os macerados foram transferidos para tubos tipo *ependorf* e foram adicionados 600µL de *Nuclei Lysis Solution* refrigerada. Os tubos foram então vigorosamente homogeneizados em vórtex por um minuto e incubados por 30 minutos à 65°C. Após esse procedimento, foram adicionados 3µL de *RNAse Solution* em cada tubo homogeneizando com a ponteira e incubados por 30 minutos à 37°C. Em seguida, os tubos permaneceram em temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse procedimento foram adicionados 200µL de *Protein Precipitation Solution* em cada amostra, seguido de homogeneização no vortex por um minuto e incubação por cinco minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas a 13000xg por quatro minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com subsequente adição de 600µL de isopropanol, seguido de homogeneização por inversão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000xg por um minuto a 4°C. Após essa etapa o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e foram adicionados 600µL de etanol 70% à temperatura ambiente e homogeneizados por inversão. As amostras foram centrifugadas a 13000xg por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados para secar à temperatura ambiente em fluxo laminar com luz normal até não haver vestígios de álcool. O *pellet* de DNA foi ressuscitado em 50µL de água milli-q estéril. Após incubação à temperatura ambiente *overnight*, as amostras foram aquecidas à 37°C por 30 minutos e quantificadas através de um espectrofotômetro compacto NanoDrop™ Lite Spectrophotometer® (ThermoFischer SCIENTIFIC) no qual também foi verificado o grau de pureza pela relação 260/280. A qualidade do DNA genômico extraído foi avaliada em gel de agarose 0,6% (Figura 11). O DNA extraído foi armazenado a 4°C até seu uso.

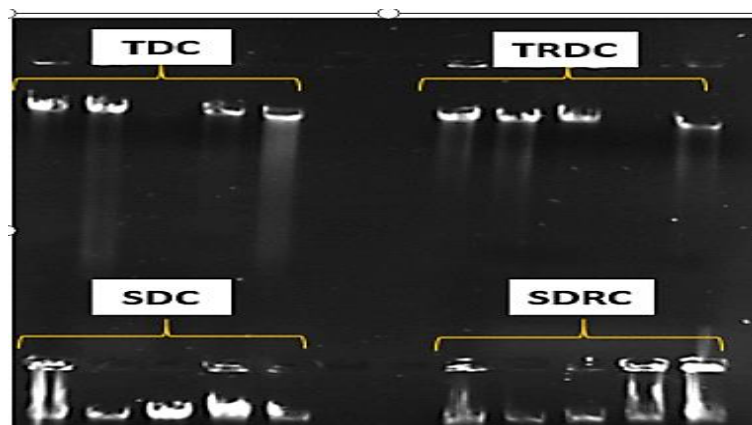


Figura 11: Análise da qualidade do gDNA em gel de agarose a 0,6%. 300ng de gDNA foram aplicados em um gel de agarose, corados com brometo de etídio. A eletroforese ocorreu numa tensão elétrica de 80 Volts por 30 minutos em tampão TBE 0,5X e fotodocumentada em transiluminador UV em comprimento de onda 302 a 312nm. SDC: sedentário dieta controle; SDRC: sedentário dieta rica em carboidratos simples; TDC: treinado dieta controle; TRDC: treinado dieta rica em carboidratos simples.

5.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA extraído foi diluído para uma concentração de 30ng/μL e incubado por 30 minutos à 37°C. Para a preparação do mix foram utilizados 2,5μL do tampão; 0,75μL de MgCl₂; 0,5μL de dNTPs 1,0μL de primer; 0,5μL de Taq polimerase; 16,75μL de água mili-q do KIT da Thermofisher/Brasil e 3μl de DNA, a soma dos reagentes com a água deve conter 25μL. Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizados *primers* correspondentes a região RNA ribossomal (RNAr) de procariotos: oito *Forward* (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) e 1392 *Reverse* (ACG GGC GGT GTG TGT AC) (GILL et al., 2006; LIN et al., 2013). A amplificação foi obtida em termociclador programado para: uma vez 94° C por 5 minutos, 30 ciclos compostos por: 94° C por dois minutos / 50°C 30 segundos / 72° C por um minuto. Em seguida, foi realizada uma etapa adicional de extensão 72° C por nove minutos e uma vez 4° C por tempo indeterminado. Após a PCR, foi realizada a eletroforese, na qual 1 a 3 μL (300ng) de gDNA foram aplicados em um gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídio. A eletroforese ocorreu numa tensão elétrica de 80 Volts por 30 minutos em tampão TBE 0,5X (BAG et al., 2016; SAMBROOK, JOSEPH & MANIATIS, 1987) e fotodocumentada em transiluminador UV comprimento de onda 302 a 312nm.

5.6 Quantificação da metilação global do DNA no pulmão por Imunoensaio Enzimático (ELISA) dos animais no período de 18 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) e os valores de absorbância obtidos foram plotados versus a porcentagem de 5-metilcitosina de cada controle. Os pontos da curva padrão foram: 0%, 0,25%, 0,5%, 1%, 5% e 10% de metilação. As leituras foram realizadas em 450nm 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 $y = 0,1351 \ln(x) + 0,1608$; $R^2 = 0,979$.

5.7 Análise da expressão gênica

5.7.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído do pulmão utilizando Trizol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e clorofórmio (Sigma-Aldrich) e foi purificado através do kit (SV Total RNA Isolation System – Promega). Um homogeneizador tipo Politron foi utilizado para homogeneizar 60mg de tecido com 1mL de Trizol em três pulsos por um minuto com intervalo de um minuto no gelo. O homogenato permaneceu em incubação por 16 horas a 4°C. Após esse período de incubação, foi incubado a temperatura ambiente por cinco minutos e a ele foi adicionado 400µL de clorofórmio. Essa mistura foi homogeneizada por um 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 12000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante aquoso foi transferido para um novo tubo tipo *eppendorf* e foi adicionado novamente 400µL de clorofórmio seguido de nova homogeneização em vórtex e centrifugação por dois minutos a 12000xg, 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado com 600µL 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. Posteriormente, o RNA foi purificado com DNase (Turbo DNase - Invitrogen, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do kit, e então o mesmo foi quantificado através de um espectrofotômetro compacto

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 12).

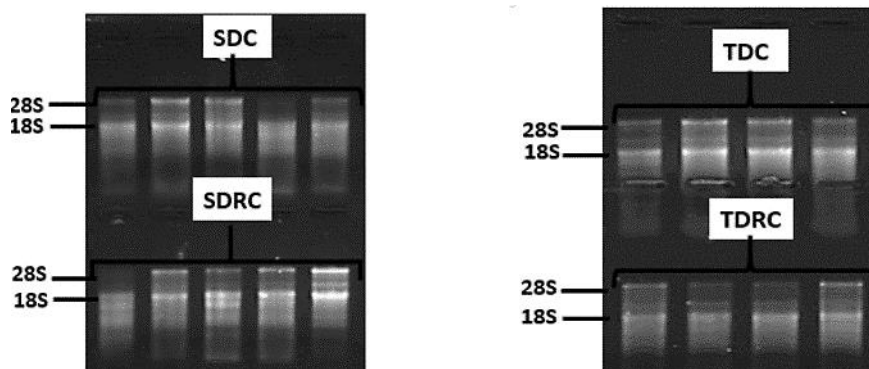


Figura 12: Gel de agarose 1,2% representativo da qualidade do RNA. 1 a 2 μg de RNA total foram desnaturados e aplicados em um gel de agarose, em tampão TBE e corados com brometo de etídio. SDC-sedentário dieta controle, SDRC: sedentário dieta rica em carboidratos simples TDC: treinado dieta controle; TDRC: treinado dieta rica em carboidratos simples.

5.7.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado $1\mu\text{g}$ 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 $10\mu\text{L}$), $2\mu\text{L}$ tampão RT 10x, $2\mu\text{L}$ *Random Primer* 10x, $0,8\mu\text{L}$ dNTPs 25x e $1\mu\text{L}$ da enzima *Multiscribe Reverse Transcriptase*, em um volume final de $20\mu\text{L}$. A reação foi incubada a 25°C por dez minutos, 37°C por 120 minutos, e após esse período a enzima foi inativada a 85°C por cinco minutos. As amostras foram armazenadas em -80°C para utilização posterior.

5.7.3 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 quatro controles endógenos: *Rplp2*, *Hprt1*, *Gapdh*, *rRNA18S* e *Ppia*. 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 *Ppia*.

5.7.4 Análise da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR)

A amplificação por PCR foi realizada utilizando o kit *Promega 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 5 μ L de SYBR, 3 μ L de *primer*, 0,1 μ L de CXR e 2 μ L de cDNA (100 μ g). As amostras foram aplicadas em triplicata na placa, utilizando o *Ppia* como gene normalizador, as sequências dos primers são apresentadas na Tabela 4.

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 (*Ppia*), para detectar as alterações na expressão gênica nos grupos submetidos à ingestão de dieta rica em carboidratos simples e treinamento físico de natação e os resultados foram analisados. A tabela abaixo (Tabela 4) descreve os *primers* utilizados.

Tabela 4: Sequências dos primers Forward e Reverse utilizados para análise da expressão gênica

Gene	Sequência	N de acesso ao GenBank
<i>Ppia</i>	Forward: CAT GGA CAA GAT GCC AGG ACC Reverse: ATG TGC CAG GGT GGT GAC TTC	XM_024302576.1
<i>Sirt1</i>	Forward: GGT TGC AGG AAT CCA AAG G Reverse: CCA CGA ACA GCT TCA CAA TC	XM_008772947.2
<i>Sirt2</i>	Forward: CAC GAT GAG CTG GAT GAA AG Reverse: CGG GCT TTA CCA CAT TCT G	XM_006228676.3
<i>Sirt3</i>	Forward: GGG TCC TTT GCT CTG AGT CC Reverse: TCC ACC AGC CTT TCC ACA C	XM_008759981.2
<i>Sirt4</i>	Forward: TTG ATT TCA TCC GCA GTG Reverse: CCC AAG TTT CTC CCA GTT	XR_595327.2
<i>Sirt5</i>	Forward: AAC GCA AAG CAC ATA GTC AT Reverse: AGC AAA GGC CAG AGG AGT	XM_006253802.2
<i>Sirt6</i>	Forward: GCC GTC TGG TCA TTG TCA Reverse: AGC CTT GGG TGC TAC TGG	XM_017594720.1
<i>Sirt7</i>	Forward: AGC ACG GCA GCC TCT ATC Reverse: AGG TCG GCA GCA CTC ACA	XM_017599391.1
<i>Dnmt1</i>	Forward: GAG CCC AGC CCA GAG TAT GC Reverse: ATG GCA GAA GGA GGA ACA G	NM_052254.3
<i>Dnmt3a</i>	Forward: CTG GCA AGG CTG TGG AGG TG Reverse: GGT GGG GGT GGG GCA TAA GC	XM_017594268.1
<i>Dnmt3b</i>	Forward: GCT GGT GGC TCT GGG TCT GT Reverse: AGG GCG GCT GGG GAA GGT CT	NM_001003959.1
<i>Tet2</i>	Forward: CCC AGG AAA GCA CAG ACA TAG Reverse: AGC ACC ATT AGG CAT TAG CAC	XM_227694.8
<i>Tet3</i>	Forward: TCA GCA ACA CCT TCA TCA CAA	XM_0006236793.3

	Reverse: TTT TCC TTG GGT GGT TTG TCA	
<i>MnSOD</i>	Forward: TGT GTC TGT GGG AGT CCA AG	NC_000006.12
	Reverse: AGG CGG CAA TCT GTA AGC	
<i>ZnSOD</i>	Forward: ATA CAC AAG GCT GTA CCA CTG C	XM_002.445.626
	Reverse: CCT CTC TTC ATC CGC TGG AC	
<i>Cat</i>	Forward: ATT GCC GTC CGA TTC TCC	NC_005102.4
	Reverse: CCA GTT ACC ATC TTC AGT GTA G	
<i>Tnf</i>	Forward TGTGCCTCAGCCTCTTCTC	M_10988
	Reverse GAGCCATTTGGGAACTTCT	
<i>IL6</i>	Forward: CCTGGAGTTGTGAAGAACAAC	AF_005485
	Reverse: GGAAGTTGGGGTAGGAAGGA	

5.8 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 6 for Windows* (Inc., San Diego, CA, USA). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. As análises dos dados não paramétricos com dois grupos foram realizadas pelo teste de *Mann-Whitney*. As análises dos dados não paramétricos com três ou mais grupos foram realizadas pelo teste de *Kruskal wallis* (pós-teste de *Dunn*). As análises dos dados paramétricos foram realizadas utilizando o teste estatístico *two-way* ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito do uso prolongado de uma dieta rica em carboidratos simples associado à atividade física sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos

Fatores metabólicos alterados (ureia, creatinina, colesterol) podem causar prejuízo no funcionamento do sistema respiratório. Para investigar possíveis alterações bioquímicas nos animais avaliados em nosso grupo de pesquisa, ao final do experimento na 18^a semana, durante a eutanásia foram coletadas amostras de sangue e realizadas análises de diferentes metabólitos no soro dos animais em experimentação. Os resultados foram obtidos durante o mestrado da aluna Débora Campos Oliveira (OLIVEIRA, 2019) e os dados estão afixados no Anexo 11.1.

A partir da análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos foi verificado que a dieta rica em carboidratos simples induziu uma redução nos níveis séricos de ureia nos grupos SDRC e TDRC em relação ao grupo SDC, e um aumento nos níveis de triglicérides em relação ao grupo TDC. A redução nos níveis de ureia pode estar relacionada à menor ingestão de proteínas, devido ao fato que a dieta rica em carboidratos simples contém menor conteúdo proteico que a dieta controle.

Quanto ao perfil lipídico, o nível sérico de triglicérides foi aumentado nos grupos que consumiram a dieta rica em carboidratos simples. O treino aeróbico de natação não foi capaz de reverter este parâmetro. Para avaliar o estado de saúde geral dos animais, foi realizada a análise hematológica, na qual foi observada uma diferença significativa na contagem de leucócitos da série branca do hemograma. Contudo estes dados não apresentam significância clínica, já que ainda permanecem dentro da faixa de normalidade dos valores de referência (OLIVEIRA, 2019). Tabela no anexo 11.2.

6.2 Análise da expressão gênica de sirtuínas no pulmão de ratos Wistar

Na última década, o estudo das sirtuínas fez um progresso notável e ampliou o conhecimento acerca destas moléculas. No entanto, a compreensão da biologia e mecanismos de ação das sirtuínas ainda está longe de estar completo e muitas perguntas ainda necessitam de respostas. Os dados atuais sugerem que estas proteínas são reguladas pela dieta e, por sua vez, regulam múltiplas facetas da fisiologia. Entretanto, ainda é necessário realizar mais estudos para elucidar totalmente as suas funções e mecanismos nos diferentes tecidos (HARB & RENZ, 2015). Emergindo da pesquisa sobre as sirtuínas existe uma crescente compreensão de que elas

fazem parte de um sistema de resposta biológica muito complexo, que influencia muitas outras moléculas reguladoras e vias de sinalização. Embora inicialmente identificadas como desacetilases, sabe-se agora que as sirtuínas regulam uma variedade de atividades enzimáticas e processos biológicos, incluindo envelhecimento, transcrição, apoptose, inflamação e estresse oxidativo (LEE et al., 2019).

Dados anteriores do nosso laboratório mostraram que a composição dietética modula a expressão gênica de sirtuínas relacionadas à adipogênese e ao metabolismo do tecido adiposo retroperitoneal. A dieta rica em carboidratos simples reduziu a expressão de Sirt 1, 2, 6 e 7 nesse tecido. O mesmo estudo também mostrou que o treino pode apresentar uma relação direta no controle epigenético no tecido adiposo do animal como a *downregulation* dos RNAm das sirtuínas 3 e 5 (SILVA, 2018). Quando foi investigado a expressão de sirtuínas no tecido renal, os resultados demonstraram que o treino aeróbico de natação com carga associado com a dieta rica em carboidratos simples induziu uma modulação positiva da expressão da *Sirt3*, *Sirt4*, *Sirt5* e *Sirt6*. Já a dieta rica em carboidratos simples induziu uma modulação negativa sob a expressão de *Sirt2*, *Sirt3* e *Sirt7* (OLIVEIRA, 2019).

Diante desses dados, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o uso de uma dieta isocalórica rica em carboidratos simples associada ao treino de natação também poderiam promover alterações epigenéticas no pulmão, investigando se as alterações metabólicas observadas eram governadas, pelo menos em parte, por mecanismo epigenético.

Nossos resultados demonstraram que dentro do grupo SDC o nível de expressão da *Sirt2* está maior quando comparado ao nível de expressão das *Sirt4*, *Sirt5* e *Sirt6*. Por outro lado, quando comparamos os níveis de expressão das Sirtuínas dos animais SDRC ocorreu uma modulação da expressão, a expressão da *Sirt1*, *Sirt3*, *Sirt4*, *Sirt5*, *Sirt6* e *Sirt7* foi menor quando comparada a expressão da *Sirt2*. Também foi observado que o nível de expressão da *Sirt 5* foi menor quando comparado ao nível de expressão das *Sirt1*, *Sirt2*, *Sirt3* e *Sirt7* nos animais do grupo TDC. O nível de expressão da *Sirt2* se mantém aumentado quando comparado com a expressão das *Sirt4*, *Sirt5* e *Sirt6* no grupo de animais TDRC. Além disso, a expressão das sirtuínas no grupo SDRC foi menor quando comparada aos grupos SDC, TDC e TDRC e a expressão da *Sirt2* se manteve elevada quando comparada às demais sirtuínas analisadas, independente da dieta e do treino. Também foi observado que o treinamento aeróbico de natação

induziu um aumento nos níveis de expressão de *Sirt2* nos grupos TDC e TDRC quando comparados aos grupos SDC e SDRC. A Figura 13 apresenta os níveis de expressão de mRNA das sirtuínas 1-7 no pulmão.

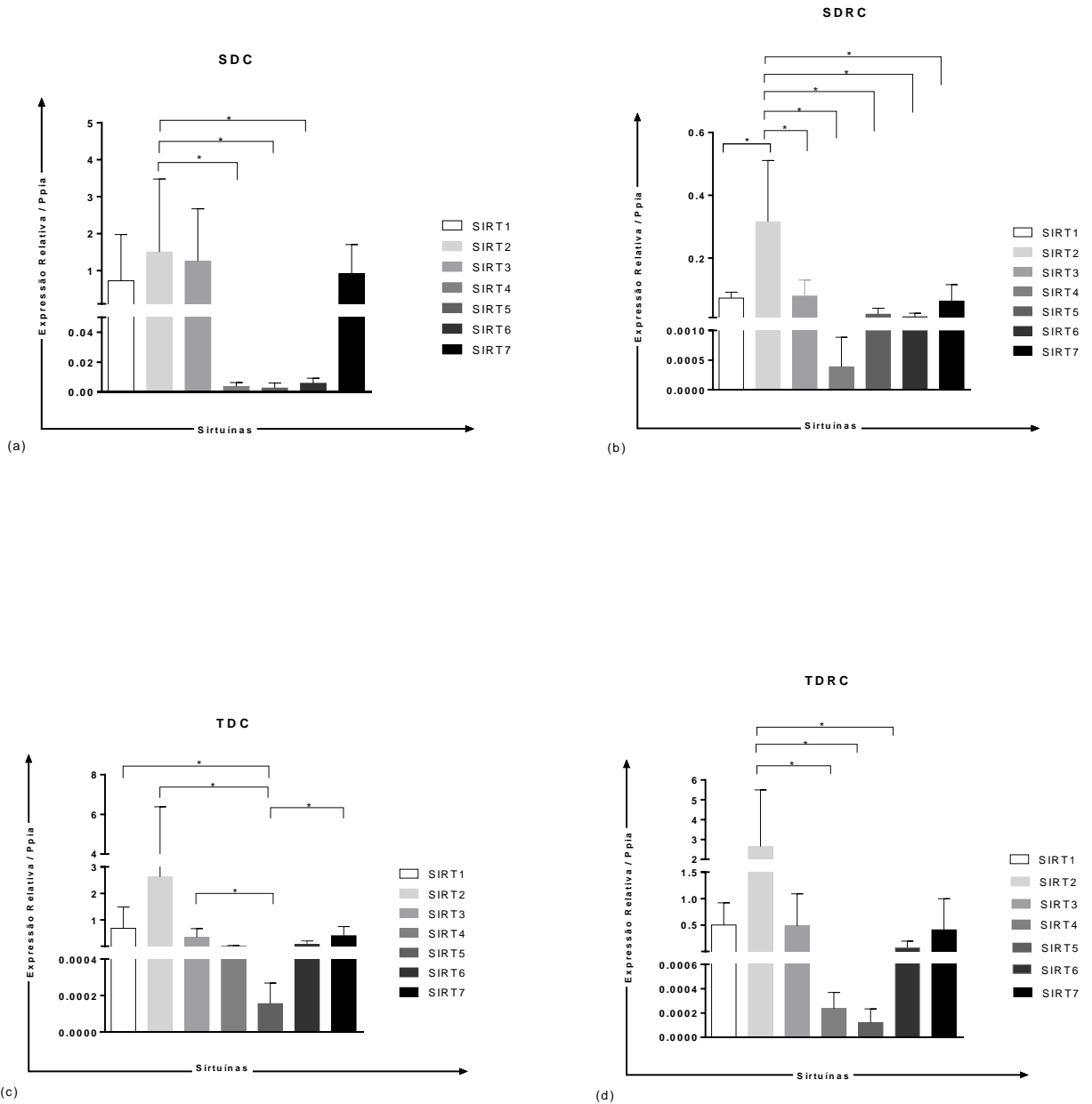


Figura 13: Perfil de expressão mRNA de sirtuínas (1-7) no pulmão dos animais de 18 semanas. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA *Kruskal wallis* (pós-teste de Dunn). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC: sedentário dieta controle (N=7 animais); TDC: treinado dieta controle (N=7 animais); SDRC: sedentário dieta rica em carboidratos simples (N=7 animais); TDRC: treinado dieta rica em carboidratos simples (N=7 animais).

Os dados obtidos são corroborados pelos descritos por Lee et al., 2019 que utilizando um modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas demonstraram que a expressão de Sirt2 regula a inflamação eosinofílica em resposta ao desafio de alérgenos e que, a superexpressão ou inibição de Sirt2 regula a expressão de CCL17 e o recrutamento de monócitos e macrófagos nas vias aéreas após a sensibilização e o desafio de alérgenos. Curiosamente, esse efeito parece ser específico do tecido pulmão, uma vez que neste trabalho Lee et al., 2019 não observaram diferença na expressão da isoforma Sirt2 3/5 nos macrófagos peritoneais ou derivados da medula óssea após a estimulação da IL-4 e que a inibição farmacológica de Sirt2, reduziu o recrutamento celular, diminuindo a expressão de CCL17 e a expressão de marcadores de macrófagos alternativamente ativados. Por outro lado, a superexpressão de Sirt2 usando quimeras da medula óssea ou transferência adotiva de macrófagos pulmonares levou a uma resposta alérgica exacerbada, com produção elevada de CCL17 e hiperplasia celular aumentada (LEE, Y. G. et al 2019).

Vários estudos demonstram que a Sirt2, é uma moduladora chave dos processos de sinalização celular envolvidos na regulação homeostática, divisão celular, morte celular e produção de mecanismos de defesa. Também foi demonstrado anteriormente que o inibidor da sirtuina pan-classe I, o sirtinol, foi eficaz na reversão da inflamação alérgica no modelo murino de exposição ao OVA (WIOLETA, K et al 2016). Em conjunto os dados sugerem que a up-regulation na expressão somente de Sirt2 no modelo experimental em estudo poderia ser um indicativo de inflamação no tecido pulmonar (HARB, H et al 2015).

6.3 Avaliação do perfil de metilação do DNA do pulmão

6.3.1 Expressão de metilases do DNA

Os resultados apresentados na figura 14 mostram que não houve diferença estatística quanto a expressão relativa das metilases do DNA avaliadas nos animais pertencentes aos grupos sedentários independente da dieta na qual foram alimentados. Esse resultado também foi observado nos animais alimentados com a dieta controle submetidos ao treinamento aeróbico de natação. Entretanto pode-se observar que no grupo TDRC houve uma diferença entre a expressão de *Dnmt3a* quando comparada a expressão de *Dnmt3b* (Figura 14).

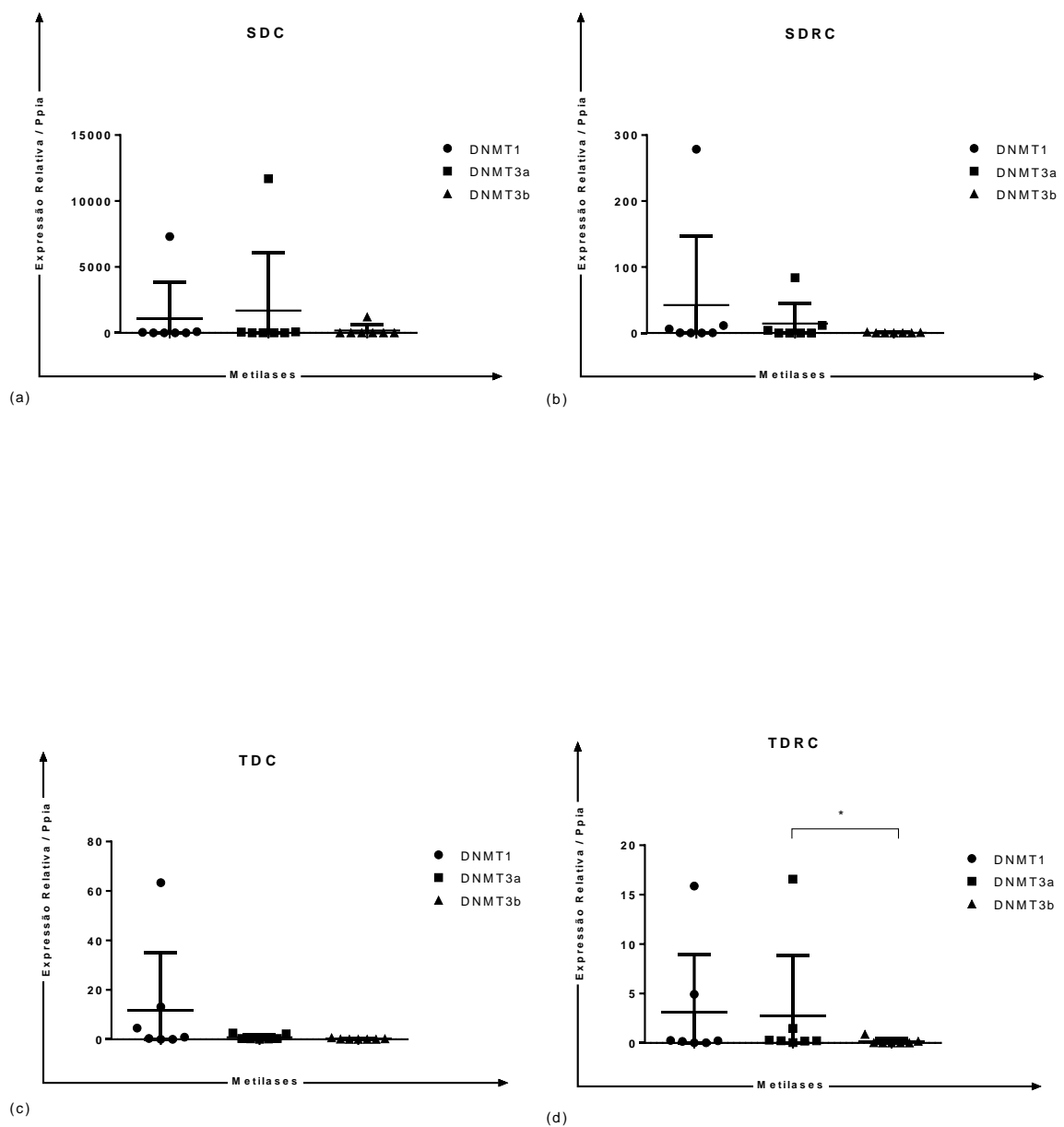


Figura 14: Perfil de expressão mRNA de metilases no pulmão dos animais de 18 semanas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA *Kruskal wallis* (pós-teste Dunn). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC: sedentário dieta controle (N=7 animais); TDC: treinado dieta controle (N=7 animais); SDRC: sedentário dieta rica em carboidratos simples (N=7 animais); TDRC: treinado dieta rica em carboidratos simples (N=7 animais).

6.3.2 Expressão de demetilases do DNA

O resultado da figura 15 referente ao nível de expressão das enzimas demetilases do DNA, demonstrou que não houve diferença significativa das enzimas *Tet2* e *Tet3* nos grupos de animais sedentários e treinados independente da dieta consumida (Figura 15).

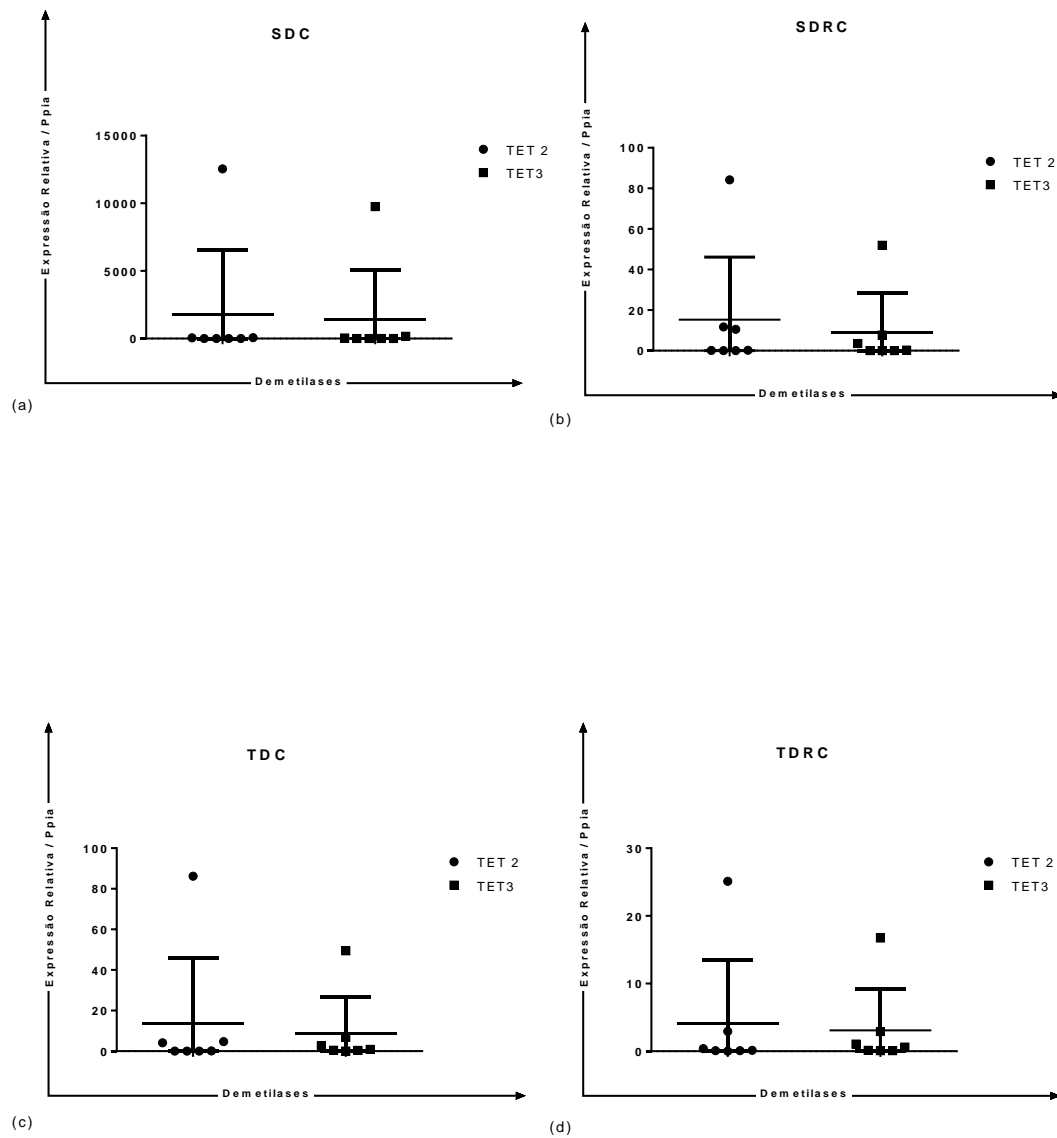


Figura 15: Perfil de expressão mRNA de demetilases no pulmão dos animais de 18 semanas. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *Mann-Whitney*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC: sedentário dieta controle (N=7 animais); TDC: treinado dieta controle (N=7 animais); SDRC: sedentário dieta rica em carboidratos simples (N=7 animais); TDRC: treinado dieta rica em carboidratos simples (N=7 animais).

Para estimar se as variáveis do uso prolongado da dieta e atividade física induziam alteração no percentual de 5metC, foi calculada a razão entre as somas de *Dnmt3a*, *Dnmt3b* e *Dnmt1e* a soma de *Tet2* e *Tet3*, (Figura 16). Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos, sugerindo que não há prevalência de um desses mecanismos. Esses dados foram corroborados com os resultados mostrados pela figura 17 onde se pode observar que não houve diferenças no perfil do conteúdo global de metilação do DNA entre os grupos estudados.

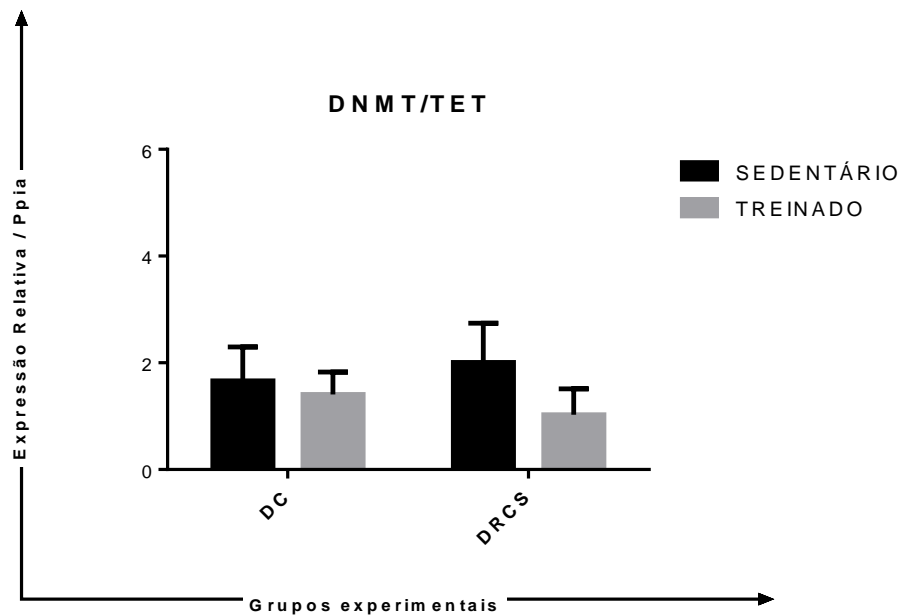


Figura 16: Razão entre as expressões de metilases e desmetilases no pulmão dos animais de 18 semanas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (pós teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. DC: dieta controle (N=10animais); DRCS: dieta rica em carboidratos simples (N=10animais).

6.3.3 Conteúdo global de metilação do DNA

A figura 17 mostra que não houve diferença significativa na porcentagem de 5-metilcitosina induzida pela dieta rica em carboidratos simples ou pelo treinamento físico de natação no período de 18 semanas (Figura 17).

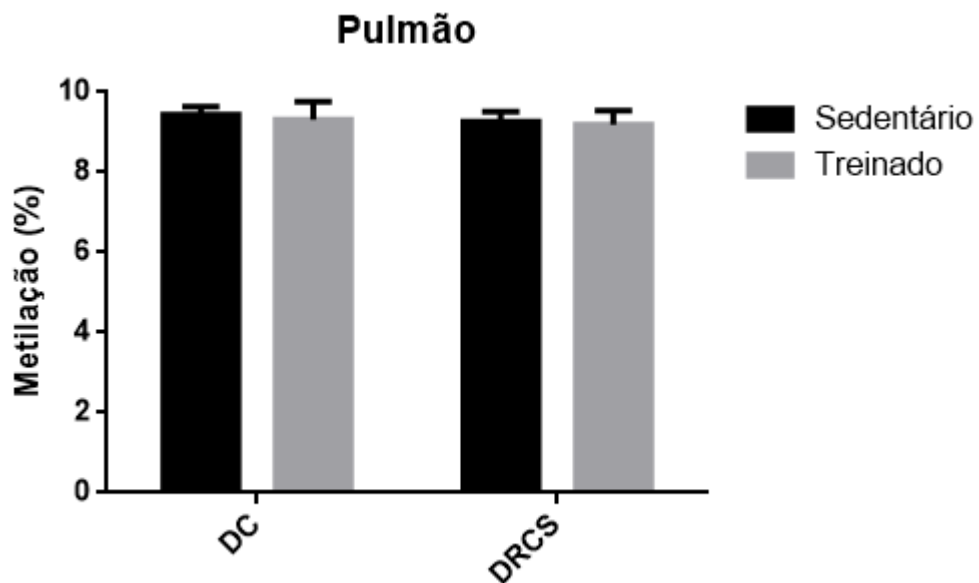


Figura 17: Porcentagem de 5-metilcitosina (5-mC) de DNA extraído do pulmão de ratos alimentados com a dieta rica em carboidratos simples e submetidos ao treinamento físico de natação durante 18 semanas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA *two-way* (pós-teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. DC: dieta controle (N=10animais); DRCS: dieta rica em carboidratos simples (N=10animais).

Dados do nosso laboratório tem demonstrado uma alteração no perfil de metilação do DNA tanto no tecido renal, quanto nos hepatócitos. Esses resultados levaram a hipótese de que alterações na expressão gênica poderia ocorrer pela modificação do perfil de metilação do DNA. A expressão de mRNA de metilases e desmetilases no tecido renal, demonstrou que o treino associado à dieta rica em carboidratos simples aumentou a expressão relativa de *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet2* e *Tet3*. Já o consumo da dieta rica em carboidratos simples em animais sedentários diminuiu a expressão de *Dnmt1* e *Dnmt3b*. Estes resultados sugerem que o treino regular de natação atua prevenindo desenvolvimento de doenças. Contudo, a investigação da metilação dos promotores desses genes será essencial para comprovar essa hipótese.

Na literatura não existe relato do efeito da associação de dieta e treino na expressão das *Dnmt* e *Tets* no tecido pulmonar, além disso, em pesquisas anteriores do nosso laboratório os resultados obtidos mostraram que não houve alteração significativa na metilação global do tecido adiposo retroperitoneal entre os grupos analisados. Também não foram observadas alterações no padrão de expressão de *Dnmts* e *Tets* entre os grupos, bem como na relação *Dnmt/Tets*. (SANTOS, 2018). Corroborando os dados demonstrados por Santos (2018), nossos resultados não mostraram alteração significativa na metilação global do pulmão entre os grupos, como, também não foram observadas alterações no padrão de expressão de *Dnmts* e *Tets* entre os grupos, bem como na relação *Dnmt/Tets*. Apesar disso pode-se observar que houve um efeito da dieta rica em carboidratos simples, já que os níveis de expressão de *Dnmt3a* é maior quando comparada a expressão de *Dnmt3b*, nos animais submetidos ao treinamento aeróbico de natação. Sugerindo uma diferença na ação das metilases, responsáveis pela metilação *de novo*, no DNA das células pulmonares dos animais. Entretanto, será necessária uma investigação para verificar se isso teria algum impacto na metilação *de novo*. Esses resultados sugerem que o mecanismo epigenético de metilação do DNA não tem um papel importante na alteração dos perfis de expressão dos genes no pulmão, ou seja, não há uma prevalência entre os mecanismos de metilação *de novo* e de manutenção.

6.4 Análise de parâmetros morfológicos no pulmão dos animais

As análises morfológicas das imagens no pulmão dos animais demonstraram inflamação em todos os animais, independente da dieta e do treino. Houve diferença significativa no número de núcleos de células inflamatórias entre os grupos analisados quando comparados o número de células presentes no parênquima e estroma do pulmão de animais compatível com o aspecto histológico normal, contudo observamos que havia graus diferentes de inflamação entre os animais avaliados dentro do mesmo grupo (Figura 18).

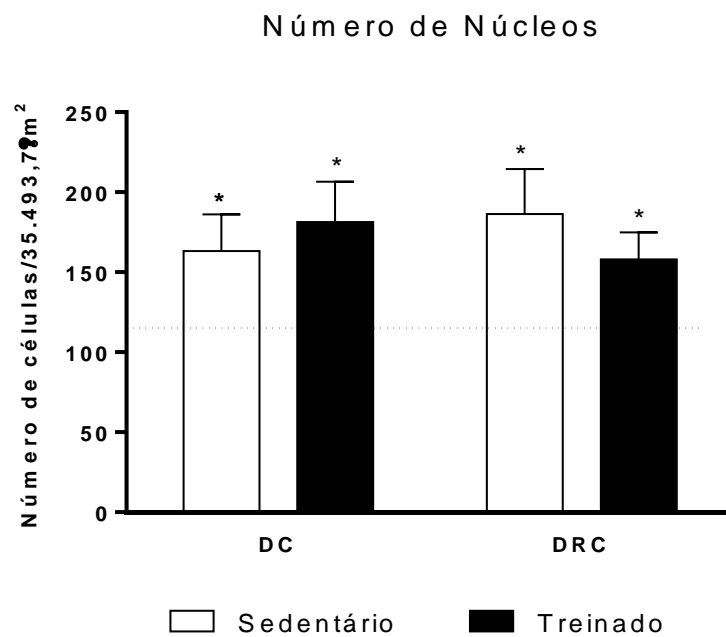


Figura 18: Número de células inflamatórias no pulmão dos animais no período de 18 semanas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA *two-way* (pós-teste de Bonferroni). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle (N=10animais), TDC - treinado dieta controle (N=10animais), SDRC - sedentário dieta rica em carboidratos simples (N=10animais), TDRC- treinado dieta rica em carboidratos simples (N=10animais). *Cut-off* representa o número de células presentes no parênquima e estroma do pulmão de animais compatível com o aspecto histológico normal.

O processo inflamatório é um dos mecanismos mais importantes para o início e progressão de uma doença pulmonar. A inflamação é uma característica comum das doenças respiratórias crônicas como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (HUFFNAGLE, DICKSON & LUKACS, 2017). A infecção é uma causa comum de granulomas pulmonares, sendo micobactérias e fungos os organismos mais frequentemente encontrados nos granulomas

pulmonares. A espécie micobacteriana causadora da infecção interfere diretamente na carga bacteriana, no número e tamanho dos granulomas dos animais infectados (SILVA et al., 2010).

Diante dos resultados demonstrados, foi realizada uma nova análise morfológica incluindo 5 animais de um outro grupo experimental com 12 semanas de vida na qual foram alimentados com dieta controle e com pulmões que possuem uma arquitetura pulmonar compatível com parâmetros considerados normais, foram avaliados para se comparar a arquitetura pulmonar com os animais do nosso estudo, tais animais foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra Daniela Caldeira. Através dos resultados foi observada diferença na quantidade de núcleos entre o grupo controle e os demais grupos. Nessa nova análise foi possível observar a presença de granulomas no pulmão dos ratos que compõe os quatro grupos desse trabalho (Figura 19).

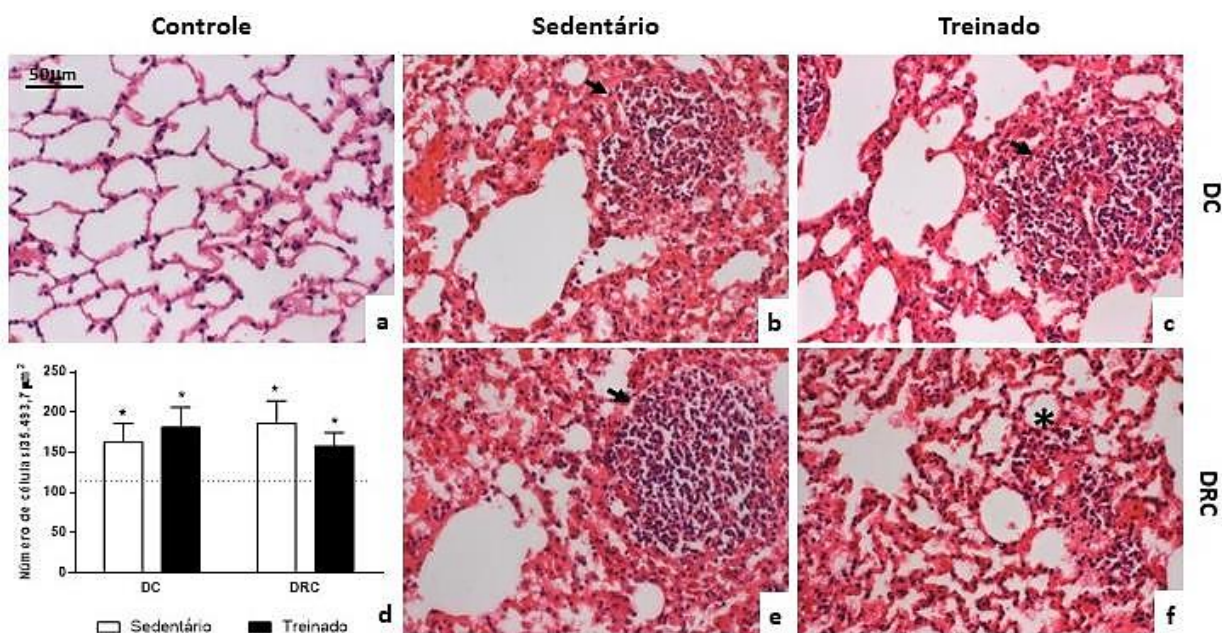


Figura 19: Avaliação quantitativa e qualitativa do processo inflamatório no pulmão de ratos Wistar submetidos ou não à dieta rica em carboidratos simples e ao treinamento físico. Processo inflamatório presente nos pulmões dos grupos submetidos ou não à dieta rica em carboidratos e/ou à natação (d); Pulmão de ratos Wistar com aspecto histológico compatível com a normalidade (a); Infiltrado inflamatório crônico granulomatoso distribuído aleatoriamente pelo parênquima pulmonar, septos interalveolares hipertróficos e presença de alvéolos colabados alternados por alvéolos hiperventilados em animais sedentários e submetidos à dieta controle (b) ou à dieta rica em carboidratos (e) e em animais treinados submetidos à dieta controle (c). Infiltrado inflamatório multifocal, predominantemente composto por células mononucleares, no pulmão de animais treinados e submetidos à dieta rica em carboidratos simples (f). Hematoxilina-Eosina. *Cut-off* representa o número de células presentes no parênquima e estroma do pulmão de animais compatível com o aspecto

histológico normal. DC: dieta controle (N=10animais); DRC: dieta rica em carboidratos simples (N=10animais). Barra = 50mm.

O granuloma é uma agregação focal de células inflamatórias, macrófagos ativados (histiócitos epitelioides), células gigantes de Langerhans e linfócitos. Os histiócitos epitelioides apresentam bordas celulares mal definidas e núcleos alongados, diferentes das bordas celulares bem definidas e núcleos redondos observados nos histiócitos comuns (OHSHIMO et al., 2017). Micobactérias ambientais estão amplamente distribuídas no meio, podendo ser encontradas em água, solo, poeira, alimentos e animais. A manifestação da doença, assim como a manutenção da infecção micobacteriana dependem da interação entre a micobactéria e o sistema imune do hospedeiro. (SILVA et al., 2010). *M. senuense* foi descrita em 2008, com base em uma única cepa. A espécie está localizada dentro do complexo *M. terrae* e está mais intimamente relacionado no gene rRNA 16S com o *Mycobacterium arupense* não especificado (TORTOLI, 2014).

Através da análise histológica, pode-se perceber um quadro inflamatório instalado no pulmão dos animais, não compatível com parâmetros considerados normais, sugerindo que a inflamação seja responsável pela formação dos granulomas encontrados. Além de nos levar a acreditar que os animais sejam portadores de alguma doença respiratória que ocasionou na morte precoce de quatro animais. Não encontramos na literatura uma relação da presença de granulomas com infecção por *Mycoplasma sp.* Esses dados nos permitem sugerir que a inflamação detectada juntamente com a presença de granulomas na histologia pulmonar esteja diretamente relacionada à infecção por *Mycobacterium* (WARSINSKE et al., 2017). Entretanto será necessário um estudo mais aprofundado para a verificação dessa hipótese.

6.5 Avaliação da expressão das enzimas antioxidantes Catalase e SOD no pulmão de ratos Wistar

Não houve diferença estatística na expressão dos genes catalase, MnSOD e ZnSOD dentro do mesmo grupo (Figura 20). Ao se comparar a expressão de cada gene individualmente entre os grupos (dados não mostrados) também não foram observadas diferenças significativas, contudo pode-se notar que os animais sedentários mostram uma maior expressão de tais enzimas antioxidantes quando comparados aos animais treinados.

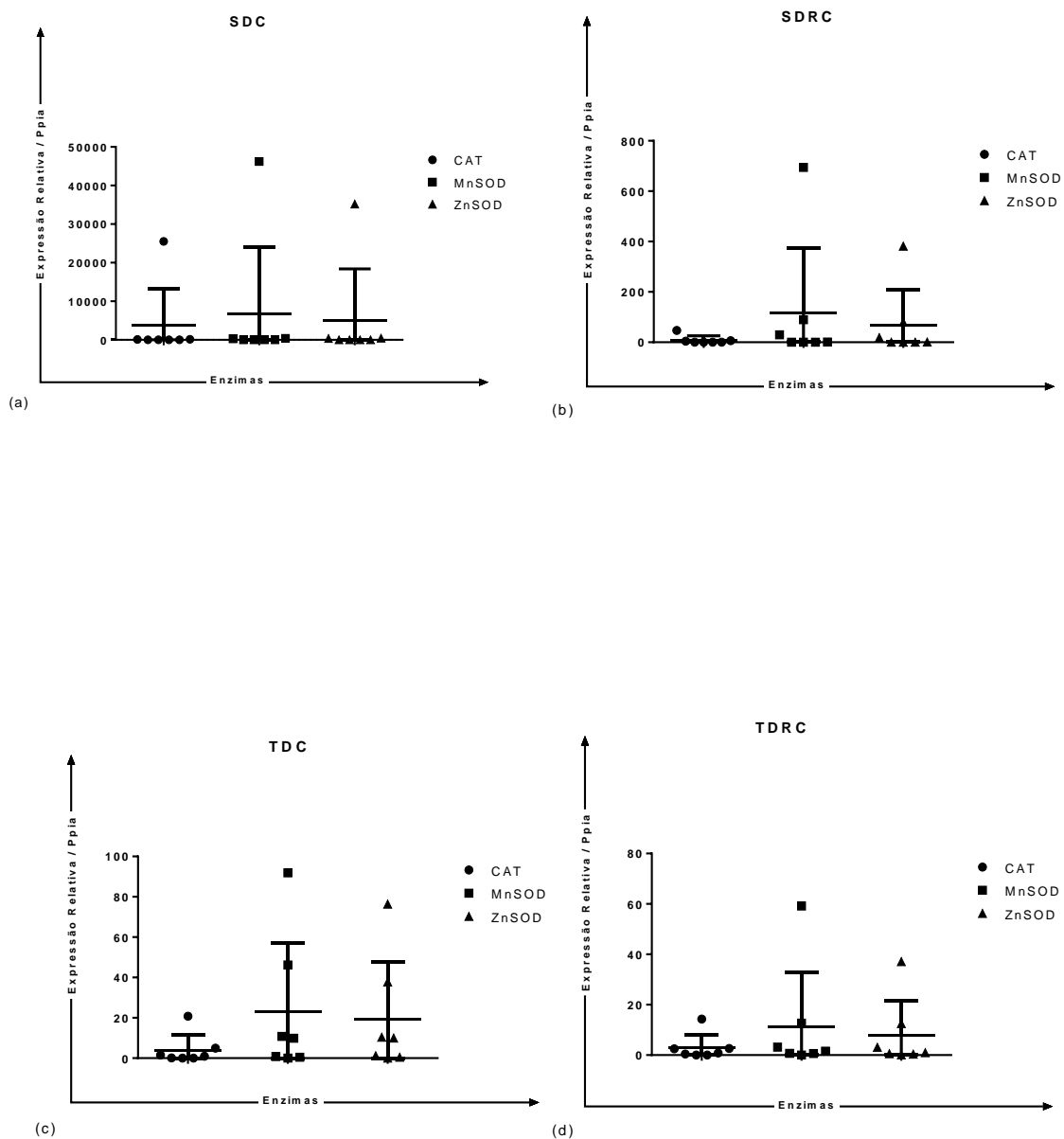


Figura 20: Perfil de expressão dos genes MnSOD, ZnSOD e Catalase no pulmão dos animais de 18 semanas. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA *Kruskal wallis* (pós-teste Dunn). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC: sedentário dieta controle (N=7 animais); TDC: treinado dieta controle (N=7 animais); SDRC: sedentário dieta rica em carboidratos simples (N=7 animais); TDRC: treinado dieta rica em carboidratos simples (N=7 animais).

Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que a dieta rica em carboidratos simples levou a alterações morfológicas nas mitocôndrias no músculo gatrocnêmico de ratos Wistar e a atividade física foi capaz de manter os padrões morfológicos das mitocôndrias, (BARBOSA-DE-QUEIROZ et al.,2017). Porém no pulmão não houve diferença estatística na expressão dos genes catalase, MnSOD e ZnSOD dentro do mesmo grupo, bem como, individualmente entre os grupos. Contudo pode-se notar que os animais treinados mostram uma expressão menor de tais enzimas antioxidantes, sugerindo que o treinamento aeróbico de natação seja possível causa para a diminuição da expressão dessas enzimas avaliadas no pulmão dos animais.

A inflamação e estresse oxidativo são conhecidos como causas de danos nos telômeros, passíveis de causar inflamação, favorecendo um ciclo patogênico vicioso. Devido à heterogeneidade da inflamação sistêmica, diversas associações significativas foram observadas entre os marcadores de envelhecimento e marcadores individuais de inflamação sistêmica e a capacidade antioxidante. Em estudos com animais, um papel primordial da capacidade antioxidante para o envelhecimento tem sido demonstrado através da associação entre marcadores de envelhecimento e pela expressão do gene da catalase (RUTTEN et al., 2015).

Descobertas recentes demonstraram que as enzimas relacionadas ao estresse oxidativo são alvos das sirtuínas. Alguns dos substratos da *Sirt3* foram caracterizados, mas é provável que ainda haja mais substratos a serem identificados. Com base no conhecimento atual, o único substrato da *Sirt3* diretamente vinculado à resposta mitocondrial às proteínas é o SOD2. A importante descoberta da regulação de SOD2 por *Sirt3* surgiu da observação de que a ablação genética do gene *Sirt3* leva a uma elevação nos níveis de superóxido mitocondrial (TAO et al., 2010). Além disso, estudos comprovam que fatores epigenéticos, como a metilação do DNA e a acetilação da histona, são importantes reguladores da expressão de SOD nas células pulmonares (ROMAN, J et al., 2017).

6.6 Avaliação da expressão de citocinas inflamatórias interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF) no pulmão

Os resultados mostram que não houve diferença estatística quanto a expressão relativa das citocinas avaliadas nos animais pertencentes aos grupos treinados independente da dieta na qual foram alimentados. Esse resultado também foi observado nos animais alimentados com a dieta controle sedentários. Entretanto pode-se observar que houve um efeito da dieta rica em carboidratos simples, já que há uma maior expressão de IL6 quando comparada a expressão de TNF nos animais sedentários. Além disso, pode se observar uma menor expressão das citocinas inflamatórias nos animais que foram submetidos ao treinamento aeróbico de natação, independente da dieta consumida pelos animais.

A Figura 21 apresenta os níveis de expressão de citocinas inflamatórias IL6 e TNF no pulmão (Figura 21). Durante uma reação inflamatória, o TNF é sintetizado rapidamente e vários estudos sugerem que esta citocina controla a liberação de outras citocinas, explicando os benefícios do impacto do TNF a reagentes bloqueadores no tratamento de vários distúrbios inflamatórios (GALLÍ, VAN GOOL & LEO, 2011). O TNF produzido pelos macrófagos infectados é o mediador primário do desenvolvimento do granuloma. O TNF ativa macrófagos e induz a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão que são importantes para o recrutamento e retenção de células no local da infecção (OKAMOTO et al., 2010).

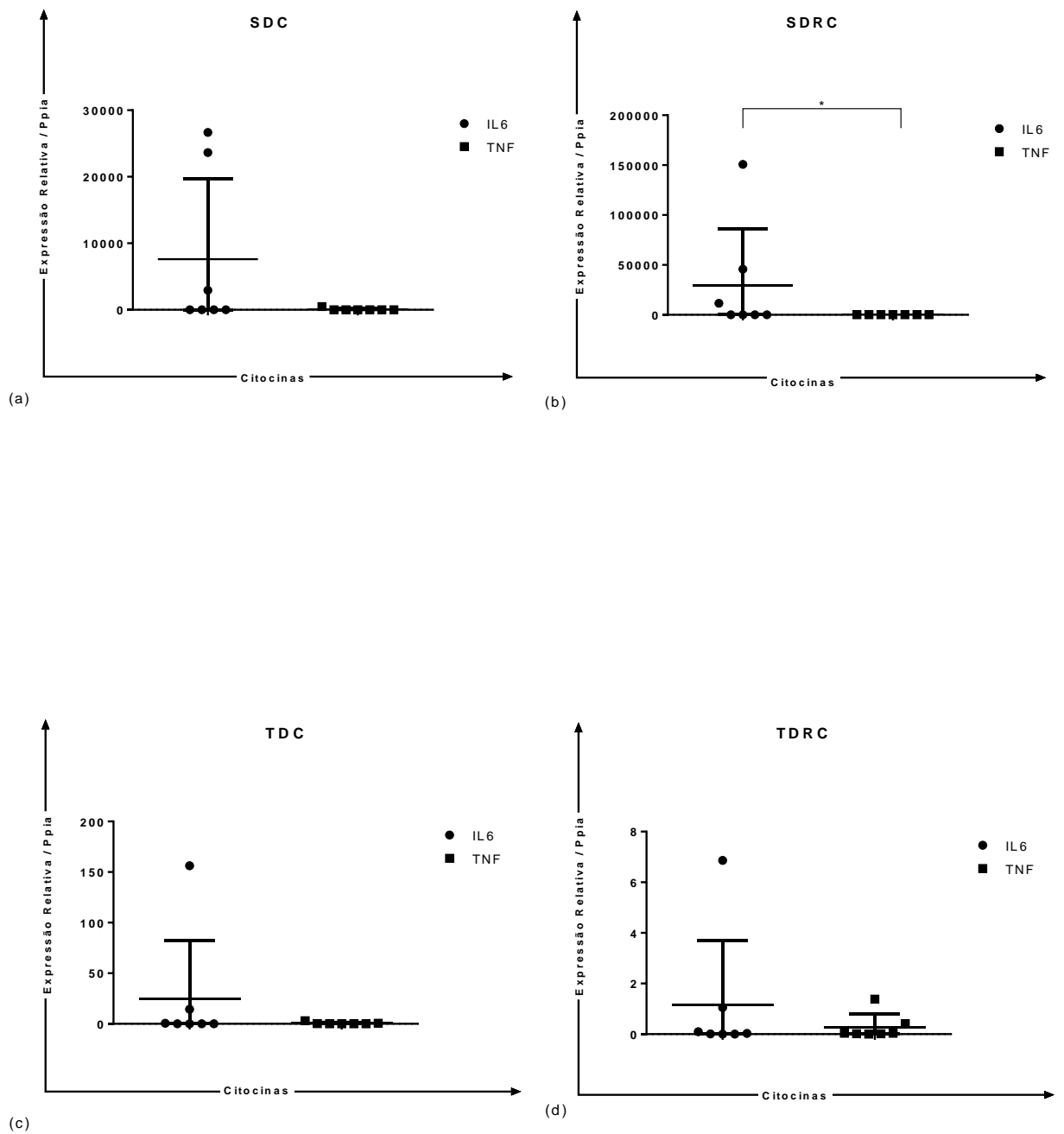


Figura 21: Perfil de expressão mRNA de IL6 e TNF no pulmão dos animais de 18 semanas. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *Mann-Whitney*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC: sedentário dieta controle (N=7 animais); TDC: treinado dieta controle (N=7 animais); SDRC: sedentário dieta rica em carboidratos simples (N=7 animais); TDRC: treinado dieta rica em carboidratos simples (N=7 animais).

A obesidade está associada à inflamação crônica de baixo grau, que pode interromper a homeostase nos microambientes teciduais. O recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo é considerado o marco no desenvolvimento do processo inflamatório envolvido na obesidade (SILVA, 2015). O processo é seguido da liberação de citocinas pró inflamatórias que atuam diretamente sobre os adipócitos, aumentando a lipólise e reduzindo a síntese de triglicérides, o que resulta em um aumento dos triglicérides e lipídeos no músculo esquelético e fígado, causando um desequilíbrio das funções normais dessas estruturas. Dessa forma, instala-se um ciclo-vicioso que resultará na inflamação crônica. (SUGANAMI et al., 2005)

Nossos resultados demonstraram que houve diferença estatística na expressão das citocinas demonstrada no grupo sedentário dieta rica em carboidratos. Esses resultados são consistentes com as análises histológicas onde foi observado inflamação em todos os animais avaliados. Porém os animais que nadaram apresentaram uma menor expressão das citocinas avaliadas sugerindo que o exercício físico pode ter provocado um efeito protetor contra o quadro de inflamação demonstrado nas análises histológicas fato esse que pode estar diretamente relacionado com o aumento na expressão de *Sirt 2* no grupo treinado, induzido pelo treino.

Estudos sugerem um papel regulatório de *Sirt6* em controlar uma resposta inflamatória, aumenta a tradução de RNAm de citocinas por um mecanismo não definido (GALLÍ, VAN GOOL & LEO, 2011). Coletivamente essas observações sugerem que as sirtuínas, e em particular a *Sirt6*, podem afetar o perfil de citocinas das células imunes ativadas. Estudos demonstram que a ativação da *Sirt1* inibe a expressão de IL-6 em um modelo de rato asmático, sugerindo novos papéis da *Sirt1* na regulação da inflamação (TANG et al., 2017).

6.7 Avaliação da infecção bacteriana no pulmão de animais de 18 semanas

Diante dos dados não conclusivos sobre a razão do quadro de inflamação observado no pulmão dos animais, foi realizada uma PCR com *primers* para uma região do gene 16S ribossomal, específico para bactérias. Foram extraídos gDNA para serem utilizados como controles positivo e negativo. Foi possível detectar no tecido pulmonar de 30% dos animais treinados a presença de bactérias através da amplificação do rRNA 16S, enquanto para os animais sedentários esse percentual subiu para 70% (Figura 22). Isso sugere que o treino aeróbico de natação diminuiu a carga bacteriana presente no pulmão dos animais.

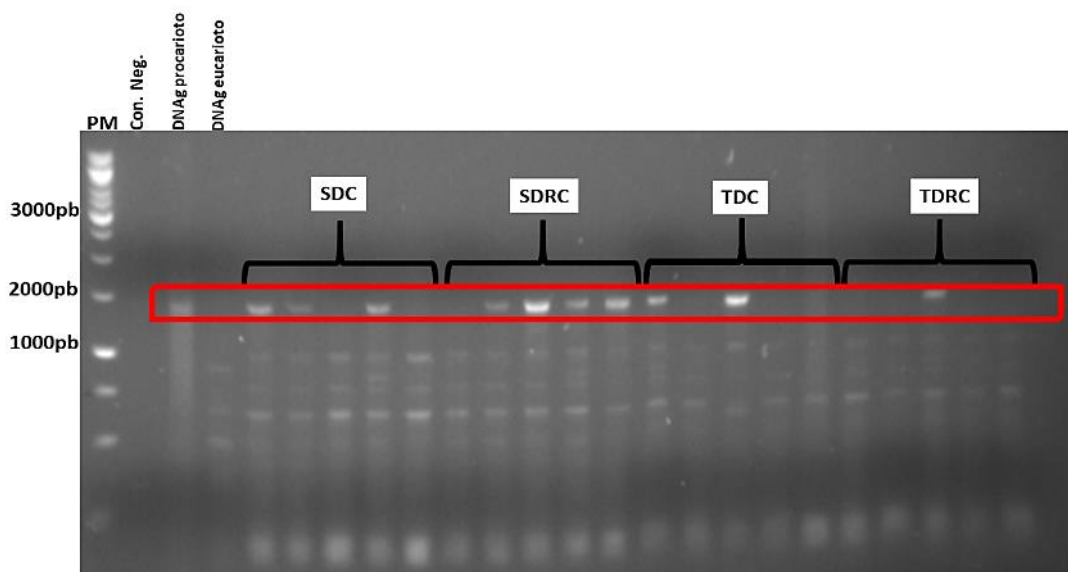


Figura 22: Eletroforese em gel de agarose 1,2% de produtos obtidos pela PCR com os primers 8F/1392R. 300ng de gDNA foram aplicados em um gel de agarose, corados com brometo de etídio. A eletroforese ocorreu numa tensão elétrica de 80 Volts por 30 minutos em tampão TBE 0,5X e fotodocumentada em transiluminador UV em comprimento de onda 302 a 312nm. PM (Padrão de Peso Molecular-1000pb); SDC (Sedentário Dieta Controle) (N=5animais); SDRC (Sedentário Dieta Rica em Carboidratos Simples) (N=5animais); TDC (Treinado Dieta Controle) (N=5animais); TDRC (Treinado Dieta Rica em Carboidratos Simples) (N=5 animais).

Através da análise da microbiota intestinal realizada pelo grupo de pesquisa do nosso laboratório, LBBM, durante o mestrado do aluno Viviano Gomes de Oliveira Neves, foi feito o sequenciamento do gene 16S RNAr que identificou bactérias patogênicas, sendo elas do gênero *Mycoplasma* e *Mycobacterium*, nas fezes dos animais (NEVES, 2019). Estudos têm mostrado que existe uma relação entre o microbioma do intestino e do pulmão, associado a distúrbios respiratórios como DPOC. Componentes microbiológicos solúveis e metabólitos transportados pela circulação são o meio de comunicação entre o microbioma do intestino e dos pulmões (CHELLAPPAN et al., 2019).

As doenças do trato respiratório estão entre os problemas de saúde mais comuns no camundongo, rato e hamster. As condições envolvidas variam desde infecções inaparentes até aquelas causadas por agentes específicos, cujas patogenicidade e interferência na experimentação são variáveis. As formas subclínicas da doença são mais comuns, e o sinergismo de infecções concomitantes tem um efeito muito mais potente do que realmente reconhecido. (ANDRADE, PINTO & OLIVEIRA, 2006)

Existe alta prevalência da infecção por *Mycoplasma pulmonis* em biotérios. Nos roedores, muitas espécies de micoplasmas foram isoladas e consideradas comensais devido à incapacidade desses agentes em produzir a doença, gerando apenas infecção silenciosa. A presença de *Mycoplasma pulmonis* em murinos tem ocorrência mundial nos biotérios, sendo uma constante preocupação quando estes animais são utilizados na pesquisa (ANDRADE, PINTO & OLIVEIRA, 2006).

O trato respiratório é a principal porta de entrada, podendo afetar os pulmões em animais adultos ou velhos, que se tornam um reservatório de infecção. Vários agentes microbianos como vírus, bactérias podem estar envolvidos na progressão de doenças respiratórias crônicas em roedores de laboratórios (RAZIN, 1978).

Outro agente infeccioso muito comum em biotérios são as micobactérias, A marca característica da infecção micobacteriana no pulmão é formação de granuloma, que desempenha papel fundamental na proteção do hospedeiro contra a infecção. A formação de granuloma é uma reação inflamatória crônica envolvendo macrófagos e outras células inflamatórias. Durante a infecção, as micobactérias induzem a formação de células imunes, linfócitos e outras células, essenciais para a manutenção da arquitetura do granuloma e para o

controle da infecção. Além disso, o curso da infecção em indivíduos que desenvolvem granulomas comprometidos muda de aguda, levando à alta morbimortalidade de infecções por micobactérias (LADEL et al., 1995).

Pouco se sabe, no entanto, sobre os eventos que envolvem a formação de granuloma durante a infecção por micobactérias que crescem rapidamente. Estudos anteriores demonstraram que a formação de granuloma pode depender das propriedades de *Mycobacterium* (VAN DER SAR et al., 2004) e no contexto genético do hospedeiro (ORRELL et al., 1992). Granulomas desempenham um papel essencial no seqüestro e morte de micobactérias no pulmão (YOSHIDA et al., 2010)

Nossos resultados demonstraram a presença de um agente infeccioso no pulmão dos ratos, compatível com bactérias patogênicas presente nas fezes dos animais. Esses dados nos permitem sugerir que a inflamação detectada juntamente com a presença de granulomas na histologia pulmonar esteja diretamente relacionada à infecção por *Mycobacterium* (WARSINSKE et al., 2017). A comunidade científica reconhece, cada vez mais, que as doenças nessas espécies alteram enormemente os resultados experimentais. Desse modo, prevenir e controlar a qualidade da saúde dessas colônias tem sido uma das tarefas mais exploradas pela ciência de animais de laboratórios (ANDRADE, PINTO & OLIVEIRA, 2006).

7. CONCLUSÃO E LIMITAÇÕES

Nossos resultados não nos permitiram concluir o efeito da dieta rica em carboidratos simples isocalórica e do treinamento físico no pulmão dos ratos, uma vez que a expressão do conjunto de genes avaliados: *sirtuínas1-7*, *Dnmt1*, *Dnmt3a* e *Dnmt3b*, *Tet2* e *Tet3*, *catalase*, *MnSOD* e *ZnSOD*, *IL6* e *TNF* dos animais está muito heterogênea dentro do mesmo grupo, o que não deixou evidente diferenças estatísticas que nos permitam sugerir mecanismos epigenéticos induzidos pelo ambiente no pulmão dos ratos avaliados. Portanto, a avaliação do conteúdo global de metilação do DNA também não deixou evidente diferenças estatísticas na expressão gênica das enzimas envolvidas nesse processo, dado esse que era esperado diante das análises já concluídas. Porém quando avaliamos as sirtuínas foi observado uma maior expressão da *Sirt2* quando comparada às demais sirtuínas dentro do mesmo grupo. A *Sirt2* desacetila uma variedade de proteínas citoplasmáticas e nucleares e é um modulador essencial dos processos celulares reduzindo a inflamação. Em nossos resultados também percebemos uma expressão bem reduzida das sirtuínas, dados que corroboram os quadros de inflamação apresentados nas análises histológicas, as quais demonstraram também a presença de granulomas, não compatível com parâmetros considerados normais. Os dados nos levaram a investigar uma possível causa para as alterações encontradas no pulmão e surpreendentemente através da amplificação do RNAr 16S foi detectada no pulmão a presença de bactérias, na qual o percentual dessas bactérias nos animais treinados estava menor, sugerindo que o treino aeróbico de natação diminuiu a carga bacteriana presente no pulmão dos animais. Curiosamente a avaliação da expressão de enzimas antioxidantes se mostrou reduzida nos animais treinados sugerindo que o treinamento aeróbico de natação seja possível causa para a diminuição da expressão dessas enzimas avaliadas no pulmão dos animais. A associação de uma dieta rica em carboidratos simples e do treinamento aeróbico de natação durante 18 semanas não induz alteração no percentual de metilação do DNA do tecido pulmonar. A elevada expressão de *Sirt2* pode estar relacionada ao fenótipo de inflamação observado. Durante a realização da pesquisa percebemos alguns fatores que limitaram o estudo, como (i) o tamanho amostral dos grupos ($n = 7$); (ii) o alto desvio padrão; (iii) a prole ser oriunda de diferentes matrizes e idade reprodutiva; e (iv) a linhagem do rato.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliar a expressão gênica de sirtuínas, TNF e IL-6, SOD e Catalase, metilases e demetilases no pulmão dos animais controle;

- ✓ Avaliar tamanho e número dos granulomas encontrados nos pulmões;

- ✓ Investigar qual agente infeccioso é responsável pelo quadro de inflamação que levou às alterações histológicas encontradas nos pulmões.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. DE. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro (RJ): Ed. FIOCRUZ, 2002.

BAFFI, C. W. et al. Metabolic Syndrome and the Lung. **Chest**, v. 149, n. 6, p. 1525–1534, jun. 2016.

BARRÓN-CABRERA, E. et al. Epigenetic Modifications as Outcomes of Exercise Interventions Related to Specific Metabolic Alterations: A Systematic Review. **Lifestyle Genomics**, v. 12, n. 1–6, p. 25–44, 2019.

BARRÈS, R.; ZIERATH, J. R. The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 8, p. 441–451, ago. 2016.

BARROS, A. R. G. DE et al. O efeito do índice de massa corpórea nos volumes pulmonares e na capacidade de transferência alvéolo-capilar do monóxido de carbono. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 17, n. 2, p. 58–61, 26 jun. 2015.

BROWN, T. A. et al. Alterations in DNA methylation corresponding with lung inflammation and as a biomarker for disease development after MWCNT exposure. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 4, p. 453–461, maio 2016.

CHELLAPPAN, D. K. et al. Interactions between microbiome and lungs: Paving new paths for microbiome based bio-engineered drug delivery systems in chronic respiratory diseases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 310, p. 108732, 1 set. 2019.

CHEN, L. et al. MeCP2 binds to non-CG methylated DNA as neurons mature, influencing transcription and the timing of onset for Rett syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 17, p. 5509–5514, 28 abr. 2015.

CHIDA, Y. et al. Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? **Nature Clinical Practice. Oncology**, v. 5, n. 8, p. 466–475, ago. 2008.

CHUN, P. Role of sirtuins in chronic obstructive pulmonary disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 1, p. 1–10, Jan. 2015.

DEMURA, M.; SAIJOH, K. The Role of DNA Methylation in Hypertension. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 956, p. 583–598, 2017.

DO, H. et al. A critical re-assessment of DNA repair gene promoter methylation in non-small cell lung carcinoma. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 4186, maio 2015.

DU, J. et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6057, p. 806–809, 11 Nov. 2011.

FANTAPPIE, M. Epigenética e Memória Celular. p. 5, [s.d.].

FORD, E. et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. **Genes & Development**, v. 20, n. 9, p. 1075–1080, 1 maio 2006.

GALLÍ, M.; VAN GOOL, F.; LEO, O. Sirtuins and inflammation: Friends or foes? **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 5, p. 569–576, 1 mar. 2011.

GONG, J. et al. **Associations of sirtuins with clinicopathological parameters and prognosis in non–small cell lung cancer.** Disponível em: <<https://www.dovepress.com/associations-of-sirtuins-with-clinicopathological-parameters-and-progn-peer-reviewed-article-CMAR>>. Acesso em: 3 dez. 2019.

HARB, H.; RENZ, H. Update on epigenetics in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 15–24, 1 Jan. 2015.

HE, Q. et al. The Daxx/Atrx Complex Protects Tandem Repetitive Elements during DNA Hypomethylation by Promoting H3K9 Trimethylation. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 3, p. 273–286, 3 set. 2015.

HUFFNAGLE, G.; DICKSON, R.; LUKACS, N. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. **Mucosal immunology**, v. 10, n. 2, p. 299–306, mar. 2017.

JIANG, H. et al. SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. **Nature**, v. 496, n. 7443, p. 110–113, 4 abr. 2013.

JURKOWSKA, R. Z.; JELTSCH, A. Enzymology of Mammalian DNA Methyltransferases. In: JELTSCH, A.; JURKOWSKA, R. Z. (Eds.). . **DNA Methyltransferases - Role and Function.** Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 87–122.

KELLY, G. A Review of the Sirtuin System, its Clinical Implications, and the Potential Role of Dietary Activators like Resveratrol: Part. **Alternative Medicine Review**, p. 19, 2010.

KITADA, M. et al. Sirtuins and Type 2 Diabetes: Role in Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 2019.

KRÄMER, A. I.; HANDSCHIN, C. How Epigenetic Modifications Drive the Expression and Mediate the Action of PGC-1 α in the Regulation of Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, 31 out. 2019.

MOREIRA, L. M. **Ciência genômica - fundamentos e aplicações | Bioinformática | Bioquímica.** Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/331877905/Leandro-Moreira-Ciencia-genomica-fundamentos-e-aplicacoes>>. Acesso em: 5 dez. 2019.

LEE, Y. G. et al. Sirtuin 2 enhances allergic asthmatic inflammation. **JCI insight**, v. 4, n. 4, 21 2019a.

LEE, Y. G. et al. **Sirtuin 2 enhances allergic asthmatic inflammation**. Disponível em: <<https://insight.jci.org/articles/view/124710/pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2019b.

LISTER, R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, n. 7271, p. 315–322, Nov. 2009.

LOMBARD, D. B. et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 24, p. 8807–8814, dez. 2007.

MEDAROV, B. I.; STRACHAN, P.; COHEN, R. Effect of body mass index on pulmonary function tests. **CHEST**, v. 128, n. 4, p. 171S, 1 out. 2005.

MEI, Z. et al. Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 182, dez. 2016.

NASRIN, N. et al. SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 31995–32002, 15 out. 2010.

NEVES, V. G. O. Análise do microbioma fecal de ratos wistar submetidos a uma dieta rica em carboidratos simples e treinamento de natação aeróbico. [s.d.]. Universidade Federal de Ouro Preto, 2019.

OHSHIMO, S. et al. Differential diagnosis of granulomatous lung disease: clues and pitfalls: Number 4 in the series “Pathology for the clinician” Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza. **European Respiratory Review**, v. 26, n. 145, 30 set. 2017.

OKAMOTO, Y. et al. Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 8, p. 4414–4422, 15 abr. 2010.

OLIVEIRA, D. C. Efeito da dieta rica em carboidratos simples e do treinamento físico na expressão de biomarcadores epigenéticos renais em ratos. [s.d.]. Universidade Federal de Ouro Preto, 2019.

PAUWELS, S. et al. Dietary and supplemental maternal methyl-group donor intake and cord blood DNA methylation. **Epigenetics**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2 Jan. 2017.

QAZI, T. J. et al. Epigenetics in Alzheimer’s disease: Perspective of DNA Methylation. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 1026–1044, 1 fev. 2018.

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.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiological Reviews**, v. 42, n. 2, p. 414–470, jun. 1978.

RAUSCH, C.; HASTERT, F. D.; CARDOSO, M. C. DNA Modification Readers and Writers and Their Interplay. **Journal of Molecular Biology**, 20 dez. 2019.

RUTTEN, E. et al. Various Mechanistic Pathways Representing the Aging Process Are Altered in COPD. **Chest**, v. 149, 11 jun. 2015.

SANTOS, J. M.; TEWARI, S.; BENITE-RIBEIRO, S. A. The effect of exercise on epigenetic modifications of PGC1: The impact on type 2 diabetes. **Medical Hypotheses**, v. 82, n. 6, p. 748–753, 1 jun. 2014.

SATOH, A.; IMAI, S.; GUARENTE, L. The brain, sirtuins, and ageing. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 362–374, jun. 2017.

SHAIKH, S. B.; PRABHU, A.; BHANDARY, Y. P. Targeting anti-aging protein sirtuin (Sirt) in the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2 Nov. 2018.

SILVA, T. R. M. DA et al. Control of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium intracellulare infections with respect to distinct granuloma formations in livers of BALB/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 5, p. 642–648, ago. 2010.

SUGANAMI T.; NISHIDA J.; OGAWA Y. A Paracrine Loop Between Adipocytes and Macrophages Aggravates Inflammatory Changes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 10, p. 2062–2068, 1 out. 2005.

SZABÓ, M. et al. Epigenetic Modifications Linked to T2D, the Heritability Gap, and Potential Therapeutic Targets. **Biochemical Genetics**, v. 56, n. 6, p. 553–574, dez. 2018.

SANTOS, T. A. P. Epigenética no tecido adiposo retroperitoneal de ratos: foco em metilação de DNA e expressão de sirtuínas. [S.l.] UFOP, 2018.

TANG, L. et al. Suppression of Sirtuin-1 Increases IL-6 Expression by Activation of the Akt Pathway during Allergic Asthma. **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, v. 43, n. 5, p. 1950–1960, 2017.

TEDESCHI, A. Tuning the Orchestra: Transcriptional Pathways Controlling Axon Regeneration. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, 12 jan. 2012.

TIAN, Y. G.; ZHANG, J. Protective effect of SIRT3 on acute lung injury by increasing manganese superoxide dismutase-mediated antioxidation. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 4, p. 5557–5565, abr. 2018.

TOFFOLI, L. V. et al. Effects of chronic restraint stress on the global DNA methylation profile of rat lung cells: Modulation by physical exercise. **Behavioural Brain Research**, v. 331, p. 188–192, 28 Jul. 2017.

TORTOLI, E. Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 727–752, 1 out. 2014.

VACHHARAJANI, V. T. et al. Sirtuins Link Inflammation and Metabolism. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 8167273, 2016.

VIEIRA, G. Admirável Mundo Novo: Epigenética. In: [s.l: s.n.]. p. 35.

WANG, X.-L. et al. The Effects of Resveratrol on Inflammation and Oxidative Stress in a Rat Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 9, 12 set. 2017.

WARSINSKE, H. C. et al. Identifying mechanisms driving formation of granuloma-associated fibrosis during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Theoretical Biology**, v. 429, p. 1–17, 21 2017.

WYMAN, A. E. et al. Sirtuin 7 is decreased in pulmonary fibrosis and regulates the fibrotic phenotype of lung fibroblasts. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 312, n. 6, p. L945–L958, 01 2017.

YAN, W.; HERMAN, J. G.; GUO, M. Epigenome-based personalized medicine in human cancer. **Epigenomics**, v. 8, n. 1, p. 119–133, 7 set. 2015.

ZHANG, S.; XUE, Z. Progress of Epigenetic Methylation in Lung Cancer Research. **Chinese Journal of Lung Cancer**, v. 20, n. 9, p. 635–640, 20 set. 2017. ZHANG, W. et al. The ageing epigenome and its rejuvenation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1–14, 4 fev. 2020.

10. ANEXOS

10.1 Parâmetros bioquímicos séricos em ratos Wistar machos após 18 semanas

Tabela 5: Parâmetros bioquímicos séricos de ratos Wistar machos, após 18 semanas.

Parâmetros	Unidade	Média±SD	Média±SD	Média±SD	Média±SD
Bioquímicos		SDC	TDC	SDRC	TDRC
Ureia	mg/dL	72,20±6,47	60,92±6,75	58,58±4,99 ^b	56,21±8,49 ^b
Creatinina	mg/dL	0,72±0,11	0,78±0,09	0,76±0,11	0,95±0,27
TGO	mg/dL	272,40±94,97	431,83±200,38	268,81±60,28	501,30±216,59
TGP	mg/dL	80,92±21,57	80,40±10,37	84,08±42,37	85,09±25,06
Colesterol	mg/dL	97,88±29,10	77,75±14,76	77,62±14,08	71,91±15,73
HDL	mg/dL	26,34±2,07	24,43±5,45	23,07±4,13	24,24±4,95
Triglicérides	mg/dL	83,00±25,38	72,85±11,18	110,41±24,81 ^b	116,85±36,14 ^b
Glicemia	mg/dL	115,80±31,38	105,26±15,71	130,72±22,92	134,53±25,67
Insulina	mU/L	18,88±8,40	17,82±5,65	39,91±33,95	24,91±22,73
HOMA-â	-	151,17±111,06	175,50±64,12	242,98±213,58	104,48±80,75
HOMA-IR	-	5,33±2,44	4,53±1,66	12,14±10,15	9,36±9,27

As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (pós teste de Bonferroni) e os dados expressos como média ± desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, TDC - treinado dieta controle, SDRC - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDRC – treinado dieta rica em carboidratos simples. (a) para grupos estatisticamente diferentes em relação ao grupo SDC, (b) para grupos estatisticamente diferentes em relação ao grupo TDC.

10.2 Parâmetros hematológicos dosados no sangue de ratos Wistar machos após 18 semanas de experimento

Tabela 6: Parâmetros hematológicos dosados no sangue de ratos Wistar machos, após 18 semanas de experimento.

Parâmetros Hematológicos	Unidade	Média±SD	Média±SD	Média±SD	Média±SD
		SDC	TDC	SDRC	TDRC
Leucócitos	(10 ³ /μL)	11,70±1,15	13,40±1,15	9,62±2,70*	8,52±1,66*
Hemácias	(10 ³ /μL)	8,41±0,16	8,45±0,33	8,79±0,15	8,36±0,33
Hemoglobina	(g/dL)	15,88±0,45	16,14±0,60	15,40±0,45	15,54±0,71
Hematócrito	(%)	46,62±1,16	47,56±1,74	47,22±1,91	46,74±1,95
VCM	(f)	55,58±0,76	56,26±0,96	53,80±1,62	55,90±0,71
CHM	(pg)	18,88±0,31	17,88±2,57	17,54±0,29	18,60±0,40
CHCM	(g/dL)	34,18±0,33	34,00±0,44	32,60±0,42	33,50±0,65
RDW-SD	(fL)	30,04±1,19	30,28±0,93	30,26±0,71	31,04±1,30
RDW-CV	(%)	13,76±0,64	13,54±0,35	14,44±0,98	14,28±0,71
VPM	(fL)	7,36±0,46	7,04±0,47	7,12±0,35	7,22±0,35
Plaquetas	(10 ³ /μL)	796,8±125,95	674,40±119,42	768,00±129,73	755,60±106,29
Neutrófilos	(%)	21,20±3,11	22,40±5,85	27,00±2,55	23,40±4,39
Linfócitos	(%)	69,20±6,22	68,20±6,87	65,00±3,31	70,20±3,11
Monócitos	(%)	8,20±3,89	9,00±2,34	7,60±2,70	6,40±1,81
Eosinófilos	(%)	0,60±0,54	0,40±0,89	0,00±0,00	0,00±0,00

As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA two-way (pós teste de Bonferroni) e os dados expressos como média ± desvio padrão. Valores de p<0,05 foram considerados significantes. SDC-sedentário dieta controle, TDC - treinado dieta controle, SDRC - sedentário dieta rica em carboidratos simples, TDRC – treinado dieta rica em carboidratos simples. (*) para grupos estatisticamente diferentes em relação ao grupo TDC.

10.3 Lista de possíveis bactérias patogênicas encontradas nas fezes dos ratos Wistar, assim como número de cópias do DNA identificadas no sequenciamento em cada animal

Tabela 7: Lista de possíveis bactérias patogênicas encontradas nas fezes dos ratos Wistar, assim como número de cópias do DNA identificadas no sequenciamento em cada animal.

Espécies/ Animal	31	28	24	20	18	15	14	12	13	10	11	9	7	6	5	4	3	1	2
Mycoplasma verecundum	1	9	2	4	0	0	4	1	4	5	1	1	6	2	3	1	2	3	2
Mycoplasma timone	0	1	1	1	1	0	3	0	7	6	3	6	2	4	3	2	1	6	2
Mycoplasma haemominutum	0	0	2	0	2	1	0	0	2	3	10	7	0	5	3	3	0	3	0
Mycoplasma lipophilum	1	2	1	0	1	0	4	0	0	7	0	2	1	1	1	1	0	7	0
Mycoplasma coccoides	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	2	0	0	0	3	0
Mycoplasma sualvi	1	1	10	52	3	67	17	1270	186	54	3432	11	10	6	1	19	1	0	2
Mycoplasma insons	2	10	2	8	3	7	10	2	4	25	6	26	14	18	31	6	4	31	3
Mycoplasma iguanae	2	9	0	1	2	1	5	3	3	5	13	4	44	8	28	2	12	13	0
Mycoplasma edwardii	1	7	2	3	3	7	5	3	4	9	6	3	5	5	5	2	6	12	6
Mycobacterium simulans	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
Mycobacterium crocinum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mycobacterium tilburgii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mycobacterium senuense	5	8	16	3	8	14	8	5	5	10	7	17	20	14	8	11	11	17	16