



HELLEN CHAVES BARBOSA

**O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS
ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS CAUSADAS PELA
LIPOTOXICIDADE NO DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Jataí-GO

2021

24/03/2021

SEI/UFG - 1905892 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[X] Dissertação [] Tese

2. Nome completo da autora: HELLEN CHAVES BARBOSA

3. Título do trabalho: O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS CAUSADAS PELA LIPOTOXICIDADE NO DIABETES MELLITUS TIPO 2

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO

§ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **HELLEN CHAVES BARBOSA, Discente**, em 27/02/2021, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Aparecida Benite Ribeiro, Orientadora**, em 04/03/2021, às 13:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1905892 e o código CRC A3E8340B.

Referência: Processo nº 23070.004039/2021-19 SEI nº 1905892

HELLEN CHAVES BARBOSA

**O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS
CAUSADAS PELA LIPOTOXICIDADE NO DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Dra. SANDRA APARECIDA BENITE RIBEIRO

Dr. HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

JATAÍ-GO

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Chaves Barbosa, Hellen

O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS CAUSADAS PELA LIPOTOXICIDADE NO DIABETES MELLITUS TIPO 2 [manuscrito] / Hellen Chaves Barbosa, Sandra Aparecida Benite Ribeiro. - 2021.

xiii, 49 f.: il.

Orientador: Prof. Sandra Aparecida Benite Ribeiro; co-orientador Hanstter Hallison Alves Rezende.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2021.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas.

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. epigenética. 3. mitocôndria. 4. histonas. 5. PGC1?. I. Benite Ribeiro, Sandra Aparecida. II. Benite Ribeiro, Sandra Aparecida, orient. III. Alves Rezende, Hanstter Hallison, co-orient. IV. Título.

CDU 612

24/03/2021

SEI/UFG - 1903997 - Ata de Defesa de Dissertação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **003/2021-PPGBA** da sessão de Defesa de Dissertação de **HELLEN CHAVES BARBOSA**, que confere o título de Mestra em **BIOCIÊNCIA ANIMAL**.

Ao vigésimo sexto dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e um, a partir das 14:00 horas, realizou-se por meio de videoconferência a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "**O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS CAUSADAS PELA LIPOTOXICIDADE NO DIABETES MELLITUS TIPO 2**". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Sandra Aparecida Benite Ribeiro (UAECIBIO/Universidade Federal de Jataí/GO) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Elaine Cristina Castelhana (UAECIBIO/Universidade Federal de Jataí/GO) - membro titular externo e Professor Doutor Douglas Regalin (UACIAGRA/Universidade Federal de Jataí/GO)- membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Sandra Aparecida Benite Ribeiro, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao vigésimo sexto dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e um.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Aparecida Benite Ribeiro, Orientadora**, em 26/02/2021, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Cristina Castelhana, Professora do Magistério Superior**, em 26/02/2021, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Doughlas Regalin, Professor do Magistério Superior**, em 26/02/2021, às 17:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1903997** e o código CRC **D6728023**

Agradecimentos

Ao CNPq Processo: 423683/2016-0, por fomentar e apoiar a pesquisa.

A Dra. Sandra A. Benite Ribeiro, pela orientação, ensinamentos e paciência. Agradeço pela disposição e presteza nas atividades desenvolvidas, por estimular o senso crítico e a escrita.

A Dra. Júlia Matzenbacher dos Santos, pela parceria e auxílio na elaboração deste projeto que agrega valor à ciência.

A Dra. Elaine Cristina Castelhana, pela dedicação, apoio e serenidade no desenvolvimento das análises. Agradeço pelos ensinamentos, pelas explicações detalhistas de cada etapa desenvolvida e sua importância na pesquisa.

Ao Dr. Hanstter Hallison Alves Rezende, pela coorientação, suporte técnico e instruções.

Ao Dr. Igo Gomes Guimarães, por oferecer suporte nas análises desenvolvidas nesta pesquisa.

Ao MSc. Jefferson Fernando Naves Pinto, pelo apoio nas análises, conselhos e ensinamentos laboratoriais.

A MSc. Ludmila Lopes de Castro Menezes, pela contribuição e cordialidade.

Aos familiares, amigos e colegas, que sempre contribuíram de forma afável e fortalecedora.

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT.....	Proteína quinase B
aPKC.....	Proteína quinase C atípica
AMP.....	Adenosina monofosfato
AMPK.....	Proteína quinase ativada por AMP
CaMKII.....	Proteína quinase II dependente cálcio/calmodulina
COX IV.....	Ciclooxigenase IV
CS.....	Enzima citrato sintase
cDNA.....	DNA complementar
ChIP.....	Imunoprecipitação de cromatina
CYTB.....	Citocromo B
-CH ₃	Radical metil
CAT.....	Catalase
Ca ⁺²	Cálcio
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
DNMT.....	DNA metiltransferase
ETC.....	Cadeia de transporte de elétrons
GLUT4.....	Vesículas transportadoras de glicose
GPx.....	Glutathione peroxidase
HbA1c.....	Hemoglobina glicada
HDL.....	Lipoproteína de alta densidade
HAT.....	Histona acetiltransferase
HDAC.....	Histona desacetilase

HMT.....	Histona Metiltransferase
H3K9me.....	Histona 3 lisina 9 mono metilada
H3K4me3.....	Histona 3 lisina 4 trimetilada
H2O2.....	Peróxido de hidrogênio
IL1.....	Interleucina 1
IL6.....	Interleucina 6
IR.....	Receptor de insulina
LDL.....	Lipoproteína de baixa densidade
MnSOD.....	Superóxido dismutase do manganês
mRNA.....	RNA mensageiro
MEF2.....	Fator estimulante de miócitos 2
mtDNA.....	DNA mitocondrial
NRF1/2.....	Fatores nucleares respiratórios 1 e 2
O ₂ .-.....	Superóxido
PI3K.....	Fosfatidilinositol 3- quinase
PC.....	Proteína carbonil
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
PGC1 α	Coativador 1 α do proliferador de peroxissoma
qPCR.....	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA.....	Ácido ribonucleico
ROS.....	Espécies reativas do oxigênio
RNApolIII	RNA polimerase II
RT.....	Transcrição reversa
STAT3.....	Proteína transdutora de sinal e ativadora de
transcrição 3	

SOD.....	Superóxido dismutase
STZ.....	Estreptozotocina
TOTG.....	Teste oral de tolerância a glicose
TGL.....	Triacilglicerol
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TFAM.....	Fator de transcrição mitocondrial
UCP2.....	Proteína de desacoplamento mitocondrial 2
4-HNE.....	4-hidroxinonenal

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	X
1.0 Introdução geral	1
2.0 EPIGENETIC MODIFICATIONS OF HISTONES AND OXIDATIVE STRESS IN SKELETAL MUSCLE: TYPE 2 DIABETES VERSUS PHYSICAL EXERCISE	4
2.1 Resumo.....	4
2.2 Palavras-chaves.....	5
2.3 Abstract.....	5
2.4 Introduction	6
2.5 Methods	8
2.5.1 Eligibility criteria	8
2.5.2 Search strategy and article selection	8
2.5.3 Data extraction	9
2.6 Results and discussion	10
2.6.1 Epigenetic mechanisms	10
2.6.2 Type 2 diabetes mellitus and mitochondria	13
2.6.3 Physical activity and oxidative stress	16
2.6.4 Physical exercise and epigenetic modifications in histones	19
2.7 Conclusion	23
3.0 O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A BIOGÊNESE MITOCONDRIAL EM RATOS WISTAR COM DIABETES MELLITUS TIPO 2	25
3.1 Resumo.....	25
3.2 Palavras-chave	26
3.3 Abstract.....	26
3.4 Keywords	28
3.5 Introdução	28
4.0 Material e métodos.....	31
4.1 Animais	31
4.2 Delineamento Experimental	31
4.3 Ganho de massa corporal.....	33
4.4 Coleta de sangue e de tecidos.....	33
4.5. Análises bioquímicas	33
4.5.1. Glicose e perfil lipídico	33
4.6 Análises moleculares	34

4.6.1 Extração de RNA	34
4.6.2 Avaliação de pureza por espectrofotometria.....	34
4.6.3 Avaliação da integridade do RNA por Eletroforese	34
4.6.4 Transcrição reversa	34
4.6.5 PCR	35
4.6.6 qPCR	35
4.7 Análise estatística	36
5.0 Resultados	37
5.1 Efeito do exercício físico na expressão gênica relativa.....	37
5.2 Efeito do exercício físico nos parâmetros bioquímicos e morfométricos..	38
6.0 Discussão	41
7.0 Conclusões	44
Referências.....	45

1.0 Introdução geral

O Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença caracterizada por desordens metabólicas que mantêm os níveis glicêmicos acima dos valores normais, apresentando quadros de hiperglicemia e alterações no metabolismo lipídico. A falta de controle glicêmico é decorrente da ação inadequada da insulina nos tecidos alvo no início e da redução da síntese de insulina nos estágios mais avançados da doença (HOOPER et al., 2014). No DM2, os níveis glicêmicos permanecem acima dos valores normais, ou seja, glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL, teste oral de tolerância a glicose (TOTG) ≥ 200 mg/dL e hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$ (SBD, 2018).

A incidência do DM2 tem aumentado em níveis alarmantes nos últimos anos, com prevalência mundial estimada em torno de 8,4%, o equivalente a 451 milhões de pessoas, no ano de 2018. Até o ano de 2045 estima-se que esse número chegue a 693 milhões de pessoas com diabetes mellitus (CHO et al., 2018).

Hábitos alimentares, comodidades provenientes do processo de urbanização e do sedentarismo são fatores de risco modificáveis para o desenvolvimento do sobrepeso e da obesidade. A desproporção entre o consumo de calorias e o gasto energético compromete a funcionalidade metabólica e intensifica o armazenamento energético no tecido adiposo e, em alguns casos em outros tecidos corporais (MILAGRO et al., 2013). O armazenamento elevado de triacilglicerol (TGL) em adipócitos leva a um estado de inflamação tecidual decorrente da ativação e da infiltração de macrófagos no tecido adiposo. Esse estado inflamatório conduz ao armazenamento de lipídeos em tecidos periféricos não especializados, como o músculo esquelético, caracterizando a lipotoxicidade, que gera alterações no metabolismo celular e na homeostasia mitocondrial, dificultando a absorção e o metabolismo da glicose, produzindo resistência à insulina (GUILHERME ET AL., 2008).

Considerando-se que a mitocôndria é a organela responsável pelo metabolismo de ácidos graxos por meio da β -oxidação, a homeostasia e a biogênese mitocondriais são fatores de grande importância na regulação do metabolismo dos lipídios, o que evita os processos de lipotoxicidade (BROOKHEART, 2010; PICCOLIS

et al., 2020) e do estresse oxidativo e que têm sido apontados como causas da resistência à insulina e do DM2 (D'AQUILA et al., 2020; XU et al., 2020).

Em busca de mecanismos subjacentes ao desenvolvimento do DM2, nas últimas décadas tem sido demonstrado que alterações no metabolismo ocorrem devido as modificações epigenéticas no músculo estriado esquelético (JOSEPH et al., 2017; LOCHMANN et al., 2015; MASUZAWA et al., 2018; OHSAWA et al., 2018). Essas modificações epigenéticas são decorrentes de fatores ambientais do indivíduo ou de seus antecessores, tais como a dieta rica em lipídios ou calorias e o sedentarismo, que causam alterações na expressão de genes relacionados à homeostasia mitocondrial (BENITE-RIBEIRO et al., 2016; SANTOS et al., 2015).

A expressão de genes relacionados ao metabolismo energético, muitas vezes ocasionada pela variabilidade genética individual, pode ser afetada por três principais tipos de modificações epigenéticas: a) metilação do DNA, na qual ocorre a adição de um grupamento metil na posição C5 do anel da citosina mediante ação da enzima DNA metiltransferase (DNMT); b) modificações das histonas, como a acetilação, processo de adição do grupo acetil nos resíduos N-terminais das histonas, e a metilação por adição de radical metil (-CH₃) nos resíduos de aminoácidos das histonas; c) RNA não codificante, ou microRNAs, que interferem na expressão de proteínas através da ligação ao RNA mensageiro (mRNA) (MILAGRO et al., 2013).

Adicionalmente, vários estudos epidemiológicos têm associado, por décadas, o efeito benéfico do exercício físico no controle de doenças metabólicas (BARRÓN-CABRERA et al., 2019).. A prática de exercício físico contribui para a redução de triglicérides e lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, normalmente, induz o aumento de lipoproteínas de alta densidade (HDL), que é uma molécula eficiente na remoção de colesterol celular (SØNDERGAARD et al., 2014). Além disso, a inflamação presente nos tecidos, devido a deposição lipídeos, pode ser atenuada pelo exercício físico, melhorando as defesas antioxidantes (PINTO et al., 2018).

A avaliação das modificações epigenéticas é de grande interesse da comunidade científica, haja visto que as alterações epigenéticas são reversíveis e, portanto, potencialmente atrativas para o desenvolvimento farmacológico que vise o controle ou a reversão de doenças metabólicas. Neste cenário, no presente trabalho apresentamos uma revisão e uma pesquisa experimental. Os objetivos da revisão

foram sistematizar o conhecimento do efeito do DM2 sobre as modificações epigenéticas na homeostasia e na biogênese mitocondrial, que culminam com as alterações metabólicas características dessa patologia. O foco da revisão foram os estudos atuais sobre os mecanismos pelos quais o exercício físico pode reverter essas modificações epigenéticas nos processos de acetilação e de metilação de histonas. O objetivo da pesquisa experimental foi verificar se o DM2 promove modificações epigenéticas e se o exercício físico reverte as modificações epigenéticas na expressão de genes e de fatores de transcrição relacionados à homeostase e à biogênese mitocondrial causadas pelo DM2.

2.0 Capítulo 1

EPIGENETIC MODIFICATIONS OF HISTONES AND OXIDATIVE STRESS IN SKELETAL MUSCLE: TYPE 2 DIABETES VERSUS PHYSICAL EXERCISE

2.1 Resumo

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica crônica altamente prevalente nas populações atuais, sendo que as modificações epigenéticas, decorrentes do ambiente, influenciam diversos processos na regulação de vias metabólicas e no desenvolvimento do DM2. A homeostasia e a biogênese mitocondriais são fatores de grande importância na regulação do metabolismo lipídico e as modificações epigenéticas nas mitocôndrias do músculo esquelético têm sido apontadas como os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento do DM2. Por outro lado, o exercício físico exerce efeito em várias vias metabólicas para melhoria da desregulação metabólica do DM2, de forma que as mitocôndrias são candidatas a esses efeitos benéficos na regulação do metabolismo lipídico. Assim, no presente estudo apresentamos os mecanismos epigenéticos subjacentes aos reguladores da biogênese e da homeostasia mitocondrial no músculo esquelético, focando nas modificações epigenéticas das histonas, e os possíveis mecanismos do exercício físico na melhoria do quadro do DM2. O estudo foi realizado a partir de uma revisão sistemática sobre os mecanismos epigenéticos de modificações das histonas responsáveis pelo DM2 e o efeito do exercício físico nessas modificações. Concluímos que o exercício promove melhorias no metabolismo celular por meio da redução do estresse oxidativo e pelo aumento da expressão do fator coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1 α), fator nuclear respiratório 1 (NRF1), fator de transcrição mitocondrial (TFAM) e fator estimulante de miócitos 2 (MEF2) à montante por intermédio de acetilação das histonas (H3K36ac e H3K27ac) e trimetilação (H3K4me3), que regulam positivamente a cascata da biogênese mitocondrial, melhorando o metabolismo energético e a homeostase da glicose. Estudos sobre os mecanismos epigenéticos podem ser de grande apelo teórico e

aplicado, visto que as alterações epigenéticas são modificáveis e têm potencial de serem foco para o tratamento de doenças metabólicas, nomeadamente o DM2.

2.2 Palavras-chaves

Diabetes mellitus tipo 2, epigenética, mitocôndria, histonas.

2.3 Abstract

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disease which is highly prevalent in today's populations. It has several epigenetic which are a result of the environment influencing several processes in the regulation of metabolic pathways and its development as well. Homeostasis and mitochondrial biogenesis are quite important factors in the regulation of lipid metabolism epigenetic modifications in skeletal muscle mitochondria. They have been pointed out as the responsible mechanisms for the development of T2DM. Moreover, physical exercise affects several metabolic pathways which function to improve metabolic deregulation of T2DM, so that mitochondria are candidates for such beneficial effects on the regulation of lipid metabolism. Thus, in this study we present the epigenetic mechanisms underlying the biogenesis and mitochondrial homeostasis regulators in the skeletal muscle. Furthermore, the study focuses on the epigenetic modifications of histones and the possible mechanisms of physical exercise in the improvement of the T2DM. The study was based on a systematic review PRISMA of the epigenetic mechanisms of changes in the histones which are responsible for the T2DM and the effect of physical exercise on these changes. We concluded that exercise promotes improvements in cellular metabolism through reducing oxidative stress and increasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α r (PGC1), respiratory nuclear factors 1(NRF1), mitochondrial transcription factor (TFAM) and myocyte enhancer factor-2 (MEF2) upstream through acetylation of histones (H3K36ac and H3K27ac) and trimethylation (H3K4me3). Such factor positively regulates the cascade of mitochondrial biogenesis, which improves energy metabolism

and glucose homeostasis. However, there are still few studies focused on the effect of chronic physical exercise on epigenetic modifications caused by T2DM.

2.4 Introduction

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a metabolic disorder disease characterized by glycemic levels above normal resulting initially from the inadequate action of insulin in target tissues and the reduction of insulin synthesis in the more advanced stages of the disease (HOOPER et al., 2014). Recently, T2DM has reached alarming global levels, with an estimated worldwide prevalence of about 8.4%, equivalent to 451 million people in 2018. This percentage is predicted to reach 693 million people with diabetes mellitus (CHO et al., 2018).

Eating habits, amenities from the urbanization process and sedentarism are modifiable risk factors which highly impact the development of overweight and obesity. The disproportion between calorie consumption and energy expenditure compromises metabolic functionality and intensifies energy storage in fat tissue and, in some cases, in other body tissues as well. The high storage of triacylglycerol (TGL) in adipocytes leads to tissue inflammation due to the activation and infiltration of macrophages in the fat tissue. This inflammatory state causes storing lipids in non-specialized peripheral tissues, such as skeletal muscle which characterize lipotoxicity. Such process generates alterations in cellular metabolism and mitochondrial homeostasis, which complicates the absorption and metabolism of glucose difficult, and produces resistance to insulin (BENITE-RIBEIRO et al., 2016).

Considering that the mitochondria is the organelle responsible for the metabolism of fatty acids through β -oxidation, homeostasis and mitochondrial biogenesis are very important factors in the regulation of lipid metabolism. They function to avoid the lipotoxicity process which is accompanied by oxidative stress and can cause insulin resistance and T2DM. Over the last decades, scientific research has discussed the responsible mechanisms for the T2DM including epigenetic alterations. These alterations are caused by different environmental factors such as a diet rich in

lipids or calories and sedentarism, which cause alterations in the expression of genes related to mitochondrial (BENITE-RIBEIRO et al., 2016; SANTOS et al., 2015).

The expression of genes which are related to energetic metabolism and often caused by individual genetic variability can be affected by three main types of epigenetic alterations: a) DNA methylation, in which the addition of a methyl grouping in the C5 position of the cytosine ring occurs through the action of the DNA methyltransferase (DNMT) enzyme, (b) modifications of histones, such as acetylation, process of addition of the acetyl group in the N-terminal residues of the histones, and methylation by addition of methyl radical (-CH₃) in the amino acid residues of the histones and (c) non-coding RNA, microRNAs, which interfere in the expression of proteins through the connection to the messenger RNA (mRNA) (MILAGRO et al., 2013)

For decades, several epidemiological studies have associated the beneficial effect of physical exercise in the control of metabolic diseases (BARRÓN-CABRERA et al., 2019). It has been proved that exercise contributes to the reduction of triglycerides and low-density lipoprotein (LDL) and normally induces the increase of high-density lipoprotein (HDL), which is an efficient molecule in the removal of cellular cholesterol (SØNDERGAARD et al., 2014). Moreover, the inflammation of the tissues which is a result of lipid deposition can be attenuated by physical exercise improving the antioxidant defenses (PINTO et al., 2018).

The evaluation of epigenetic modifications gains high interest in the scientific community, since epigenetic alterations are reversible and, therefore, potentially attractive to the pharmacological development which targets the control or reversal of metabolic diseases. In this scenario, the objectives of the present review were to categorize the academic and scientific research discussing the effects of T2DM on histones epigenetic modifications and on homeostasis and mitochondrial biogenesis. These modifications culminate in that metabolic alterations which characterize this pathology. Therefore, we present the current study on the physical exercise mechanisms which can reverse these epigenetic modifications.

2.5 Methods

The study presented an analysis of the last decade studies which evaluated the processes of gene expression regulation of cell metabolism as a consequence of T2DM and physical exercise, intermediated by epigenetic modifications in histones. The methodology of preferred report items for systematic review protocols and meta-analysis (PRISMA) was used (MOHER et al., 2009).

2.5.1 Eligibility criteria

This review included studies which evaluated the related gene expression to glucose metabolism, changes in gene expression in altered metabolic conditions, such as T2DM, insulin resistance, inflammation and lipid changes, and gene expression response through physical exercise. Moreover, the review presented the clinical and laboratory studies, non-randomized trials in animals and humans published in English. After analysis of titles and abstracts, studies with pharmacological intervention we excluded studies that focused on other metabolic pathways studies that evaluated epigenetic modifications in pathologies which are not related to metabolic syndrome.

2.5.2 Search strategy and article selection

The selection was made in the MEDLINE database (PubMed) including all the articles which were published between 2009 and 2019 using the terms: "Epigenetics and Type 2 Diabetes mellitus", "Acetylation and histone methylation", "PGC1 α and Type 2 Diabetes mellitus", "Physical exercise and epigenetic modifications", "Physical exercise and PGC1 α ", "Mitochondria and PGC1 α ", "TFAM and epigenetic modifications", "NRF1 and exercise", "MEF2 and exercise", "Oxidative stress and mitochondria", "Exercise and oxidative stress", "Oxidative stress and type 2 diabetes mellitus", "Epigenetics and oxidative stress". The search resulted in a total of 1237 articles. After evaluating the eligibility criteria, we obtained a total of 172 articles.

Finally, 43 articles were included for this review according to the flow chart presented in figure 1(MOHER D, LIBERATI A, TETZLAFF J, ALTMAN DG, 2009).

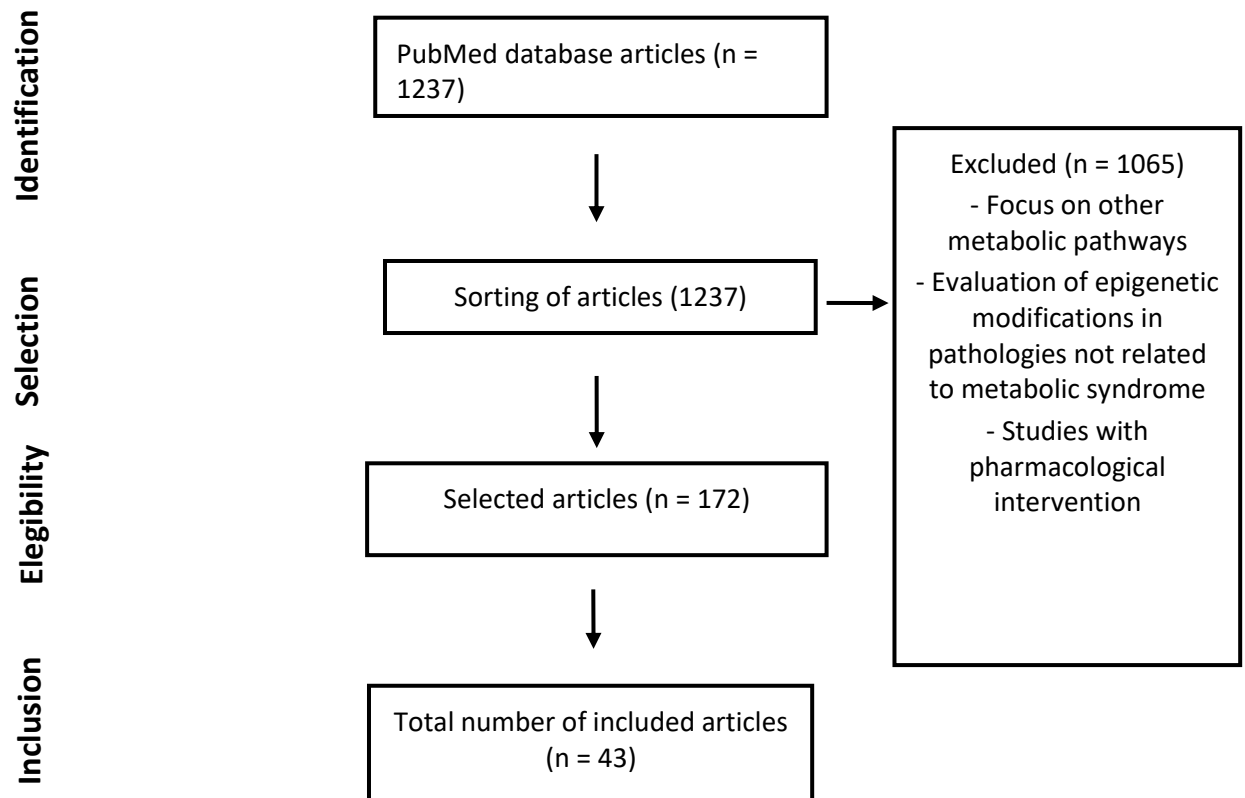


Figure 1- Diagram of the selection of articles according to the Prism methodology (MOHER D, LIBERATI A, TETZLAFF J, ALTMAN DG, 2009).

2.5.3 Data extraction

We extracted information on the main epigenetic mechanisms that have been studied until today, risk factors and the effects of T2DM on inflammatory processes and oxidative stress, which are responsible for alterations in homeostasis and mitochondrial biogenesis. Based on this initial information, we extracted data on the effects of the T2DM on epigenetic modifications in the promoters of mitochondrial biogenesis and, subsequently, the effects of physical exercise on epigenetic modifications. Finally, data we extracted data that could justify the hypothesis that the

reduction of inflammatory processes and oxidative stress add factors for the epigenetic modifications caused by physical exercise which causes T2DM improvement.

2.6 Results and discussion

After the analysis of titles and abstracts, we extracted studies which focused on other metabolic pathways, studies including pharmacological intervention and studies which evaluated epigenetic modifications in non-related pathologies to the metabolic syndrome. 172 selected articles were analyzed by reading the complete texts according to theme and eligibility criteria. Finally, 43 articles were included in this review according to the flow diagram presented in Figure 1 (MOHER D, LIBERATI A, TETZLAFF J, ALTMAN DG, 2009). The following sections describe the main epigenetic mechanisms which are related to the effects of T2DM on DNA, the formation of microRNA and acetylation or methylation of histones.

2.6.1 Epigenetic mechanisms

In the process of cell differentiation, the expression of various active genes in organs with distinct functions and structures is finely regulated by mechanisms which inhibit or activate specific genes. These mechanisms can generate structural changes in the chromatin even if there are no changes in DNA sequence. The set of these changes generate epigenetic marks which provide means for the regulation of genetic information for cellular activity (MAGALHÃES et al., 2013). Multiple epigenetic mechanisms such as; acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination and sumoylation regulate the gene expression (KARLIĆ et al., 2010). In this context, the dynamics of the chromatin structure is crucial for the maintenance of essential cellular functions, since it is the consequence of environmental conditions and specific phases of development (LOCHMANOVÁ et al., 2019). Chromatin consists of DNA structure in outcomes of histones, which form nucleosomes as basic units of chromatin (KARLIĆ et al., 2010).

Reversible changes in the structure of histones are important to modulate the link between DNA and histone, since they allow the recruitment of associated-chromatin proteins. Four types of histones involve nuclear DNA: H2A, H2B, H3 and H4, as they are responsible for structuring the genome when modified after translation, altering the chromatin and, consequently, the gene expression (KARLIĆ et al., 2010). This structural organization is directly involved in all the processes to which DNA is linked; such as replication, transcription and DNA repair (LOCHMANOVÁ et al., 2019).

The N terminal structure of the histones, when modified, changes their association with DNA due to the loads of these changes. Positive charged amino acids normally present in the N terminal structure of histones H3 and H4, such as lysine (K) and arginine (R). When these amino acids are modified by the addition of the acetyl group have their positive charges are neutralized. This process generates a weakening of the link between the histones and the phosphate groups of DNA and causes relaxation of chromatin. Acetylated regions on chromatin are usually associated with the active transcription process. In contrast, hypo acetyl regions make the chromatin denser and the transcription process less active. The responsible enzyme for catalyzing the loading of acetyl groups from histones is known as histone acetyltransferase (HAT), while the removal of these acetyl groups is done by histone deacetylase (HDAC) (Figure 2) (LOCHMANOVÁ et al., 2019).

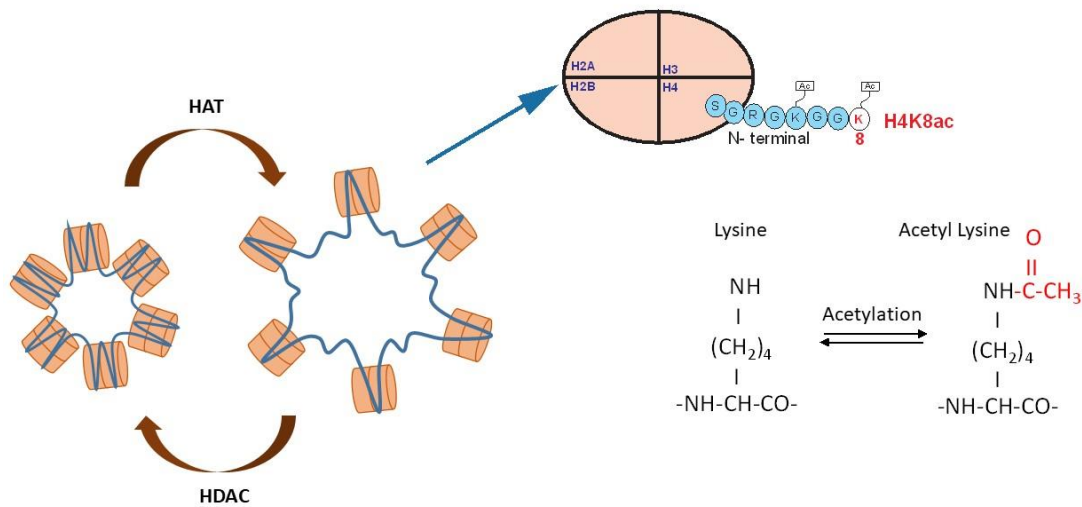


Figure 2- Acetylation of histone 4-lysine 8 (H4K8ac) by the addition of an acetyl group in the positively charged amino acid residues in the N-terminal portion of the histone, catalyzed by the enzyme Histone Acetyl Transferase (HAT) generates the weakening of the histone DNA bond. The result is relaxation of the chromatin and increased transcription. The deacetylation promoted by the enzyme Histone deacetylase (HDAC) will result in reduced transcription.

Besides acetylation and deacetylation, there is methylation of histones (Figure 3), a mechanism in which terminal regions such as lysine (K) can be methylated once, twice or three times which generates repression in certain gene phenotypes and activation in others. The mono methylated (H3K9me) histone 3 lysine 9 generates activation of genes, while its double or triple methylation is associated with the gene expression silencing (LOCHMANN et al., 2015).

On the other hand, both methylation and acetylation of histones can cause increased gene expression, while deacetylation leads to reduced gene transcription. Thus, DNA methylation and the formation of micro RNAs are related to the silencing of gene expression.

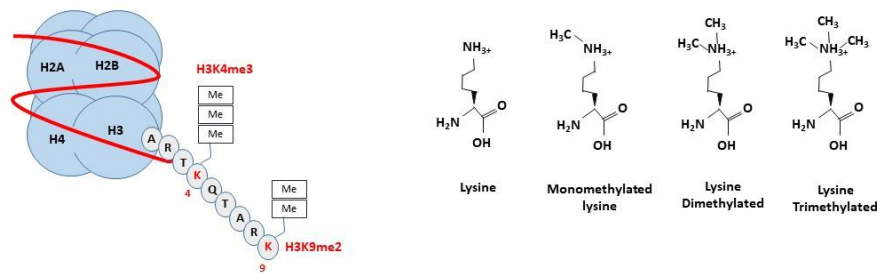


Figure 3- Methylation of histone 3 lysine 9 (H3K9me) and histone 3 lysine 4 (H3K4me3) histones. Mono, di- or trimethylation of the amino acids methyl group (-CH₃) can occur in the N-terminus. Monomethylation and trimethylation of H3K4me results in increased expression, while di and trimethylation results and silencing of gene expression.

2.6.2 Type 2 diabetes mellitus and mitochondria

T2DM is caused by defects in the secretion or action of insulin in peripheral tissues. Under normal physiological conditions, insulin attaches itself to the membrane receptor which causes autophosphorylation of the insulin receptor (IR) that phosphates other intracellular protein substrates. After this, activation of insulin receptor substrates which interact with the enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) occurs. The activation of PI 3-kinase activates signaling proteins; such as protein kinase B (AKT) which induces glycogen synthesis and translocation of glucose carrying vesicles (GLUT4). In parallel, atypical protein kinase C (aPKC) acts by activating motor proteins that help in the migration of vesicles to the cellular membrane (SANTOS et al., 2008).

Modifiable risk factors, especially sedentariness, obesity and unhealthy eating habits (MOREIRA et al., 2018), are pointed out as reasons for fat tissue increase, inflammatory processes and oxidative stress (ABRAHAM et al., 2007; DE SOUZA et al., 2005) which can evolve to insulin resistance and T2DM. The intake of lipid-rich diet and/or the increase in body mass cause increased production of reactive species of oxygen or oxidative stress and activation of pro-inflammatory cytokines; IL1, IL6, TNF- α . Such factors impair the process of insulin signaling by inhibiting PI3K and transcription transducing and activating protein 3 (STAT3) (WEISBERG et al., 2003). The effect of inflammation on the development of T2DM is widely discussed in Prattichizzo et al, 2018. According to the authors, even in non-obese individuals who

had bad dietary habits, the resulting inflammatory process can cause epigenetic modifications responsible for T2DM. They also suggest that intervention by means of antioxidants and physical exercise may be the best approaches to reduce the oxidative stress and the chain process, which is triggered by inflammation and results in the T2DM (PRATTICHIZZO et al., 2018).

Assuming that oxidative stress triggers inflammation and its effects on the genesis of metabolic diseases, it is important to emphasize that mitochondrial dysfunction plays an important role in the accumulation of reactive oxygen species (ROS), a process that precedes insulin resistance. Increased levels of ROS generate damage in mitochondrial DNA (mtDNA), which decreases the transcription of cytochrome b, polypeptide component of complex III involved in the oxidative phosphorylation pathway through the electron transport chain (ETC). As a compensatory mechanism, the nucleus transcribes proteins which are related to mitochondrial genesis. The number of mtDNA is increased but remains damaged by oxidation and the amount of transcribed cytochrome b may be insufficient to supply the needs of the complete III and ECT, which results in high levels of ROS and subsidizing this circuit of events (SANTOS et al., 2018).

Mitochondrial biogenesis is controlled by a signaling pathway that consists of nuclear genes which are synthesized in the nucleus and transported to the organelle where the regulation of mitochondrial proliferation and functionality occurs. Mitochondrial biogenesis is controlled by a signaling pathway which is coordinated by co-activators and transcription factors; PGC1 α , TFAM, NRF1 and MEF2. The 1-alpha co-activator of the receptor which is activated by peroxisomal proliferator (PGC1- α) and coded by the PPARGC1A gene modulates several regulation pathways of mitochondrial metabolism. Its activation initiates a cascade modulation which induces the transcription of respiratory nuclear factors 1 and 2 (NRF1/2) and the expression of other proteins; such as the mitochondrial transcription factor (TFAM), membrane transporter, cytochrome oxidase and cytochrome c IV (STEPTO et al., 2012). These factors act in the biogenesis and mitochondrial homeostasis the MAP is considered the essential factor for the initiation of mitochondrial DNA transcription (mtDNA) (SANTOS et al., 2015).

When the T2DM is established, the positively maintained hyperglycemia regulates markers of chronic inflammation and takes charge of the formation of intense

oxidative stress, metabolic and inflammatory processes which impair the secretion of insulin (LUC et al., 2019). Moreover, in this phase, ample DNA methylation has been observed in genes which are related to oxidative stress and inflammatory processes (KARACHANAK-YANKOVA et al., 2015). It has been pointed out that T2DM and overweight cause general epigenetic modifications of histones in adipocytes including two common modifications, namely, the activating tri-methylation of histone 3 lysine 4 (H3K4me3) and tri-methylation histone 3 lysine 27 (H3K27me3) (JUFVAS et al., 2013). Histone methylation is a reversible and dynamic process that is catalyzed by specific and general histone methyltransferases and demethylases which in turn depend on coenzymes metabolism and therefore response to metabolic status (TEPERINO et al., 2013).

Thus, the analysis of the methylation or acetylation patterns of histones in individuals or experimental models with T2DM with the established inflammatory process, may provide information for the understanding of the deleterious effect of oxidative stress and inflammation on the epigenetic mechanisms which causes the development of the disease. In figure 4, we present a schematic model of the effect of reactive oxygen species on the acetylation and trimethylation processes of histones which result in a reduction of mitochondrial biogenesis (FIGURE 4). The excess of ROS which are caused by the T2DM inhibits the activity of the enzyme histone acetyltransferase (HAT). This process blocks the acetylation of histones and, consequently, affects the transcription of genes and regulatory factors of mitochondrial biogenesis cascade (PGC1, NRF1, and TFAM). The balance of the ROS concentration does not block the HAT allowing the transcription of the previously mentioned genes and factors. During resting, the stimulus of PGC1 transcription may occur by signaling H3K4me3 at discretely high levels. In the disused muscle, the constant accumulation of ROS can saturate the antioxidant system which makes the enzymes inefficient in the balance of the ROS concentrations and blocks the HAT enzyme and the rest of the signaling pathway of mitochondrial biogenesis.

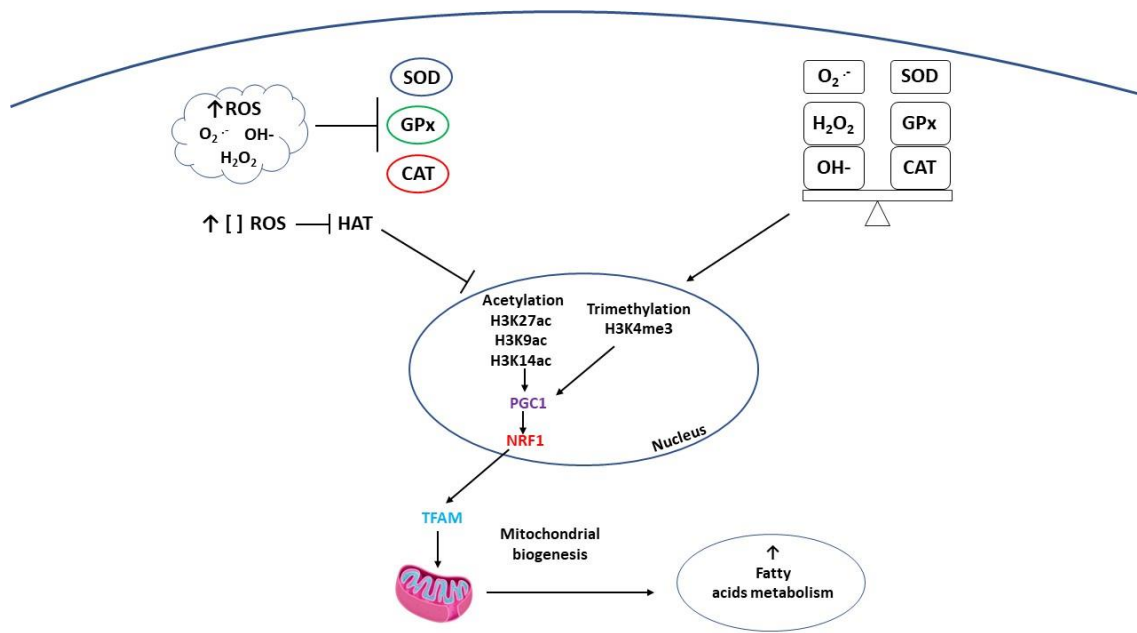


Figure 4 - The increased concentration of ROS, present in T2DM, inhibits the activity of the enzyme histone acetyltransferase (HAT) blocking the acetylation and trimethylation of histones, reducing the expression of genes from the cascade of mitochondrial biogenesis. The balance of the concentration of ROS by antioxidant actions does not block the HAT, allowing the expression of genes and factors linked to mitochondrial biogenesis such as PGC1, NRF1, and TFAM. Enzymes of the antioxidant system, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and Catalase (CAT)

2.6.3 Physical activity and oxidative stress

The regulation of organic homeostasis corresponds with the balance between antioxidant and prooxidant actions, which are affected when the levels of reactive oxygen species (ROS) are increased. The chronic excess of ROSs affects cell signaling and can cause damage and changes in organic components such as proteins, lipids and nucleic acids. As a result of this process, protein inactivation, and oxidative damage to DNA and RNA affect the translation process and the synthesis of proteins (PARKER et al., 2017). In response to physical exercise, the levels of ROS are high causing intracellular changes. The load of generated ROS depends on the intensity, duration and type of physical exercise performed. Tissue damage is generated by exercise stimulates several mechanisms for repair of skeletal muscle tissue. Regular exercise induces the activation of preventive antioxidant mechanisms which move after in the cell, reduce the amount of ROS inhibiting the harmful activity of these reactive species in the cell. The increase in superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) induces the activation of the enzymes superoxide dismutase (SOD),

glutathione peroxidase (GPx) and Catalase (CAT) of the antioxidant system. These enzymes donate electrons or atoms to the ROS and become stable, since they metabolize the ROS in excess and maintain homeostasis (FERREIRA et al., 2007). The stress which is caused by chronic exercise results in an increase in the concentration of ROS which in turn, activates the signaling of stress-activated protein kinase (SAPK). SAPK signaling is related to the positive regulation of antioxidant defenses, increased gene expression and activation of transcription and coactivating factors in skeletal muscle; such as PGC1 α and MEF2 (PARKER et al., 2017). This hypothesis is shown in figure 5.

Samjoo et al., 2013, observed the effects of resistance exercise on skeletal muscle with significant results in reducing markers of oxidative damage after 3 months of cycling training which is done by previously sedentary obese and thin individuals. Levels of oxidative markers such as carbonyl protein (PC) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) were reduced after the training period, while the antioxidant enzyme superoxide dismutase of manganese (MnSOD) had increased values, which improved the adaptive response of the skeletal muscle to oxidative damage which was generated by exercise training with increased antioxidant capacity (SAMJOO et al., 2013).

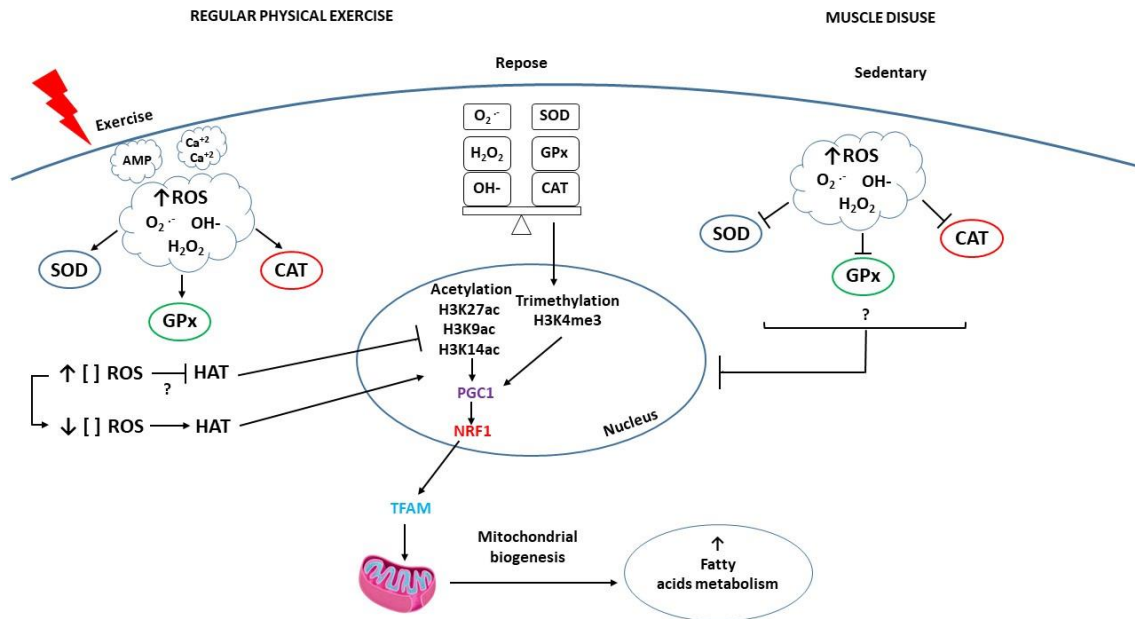


Figure 5- Mechanism in which regular exercise can improve the biogenesis and mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle during exercise/restoration, due to the action of the antioxidant system in the modification of histones. Exercise increases the levels of adenosine monophosphate (AMP), calcium (Ca^{+2}) and reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^-). This accumulation signals the enzymes of the antioxidant system, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), which regulate the concentration of ROS keeping the levels balanced. In this way, H3K27, H3K9 and H3K14 are acetylated improving the PGC1, NRF1 and TFAM in mitochondrial biogenesis and metabolism.

We suppose that the excess of ROS which are caused by the T2DM inhibits the activity of the enzyme histone acetyltransferase (HAT). This process blocks the acetylation of histones and, consequently, affects the transcription of genes and regulatory factors of mitochondrial biogenesis cascade (PGC1, NRF1, and TFAM). The balance of the ROS concentration does not block the HAT allowing the transcription of the previously mentioned genes and factors. During resting, the stimulus of PGC1 transcription may occur by signaling H3K4me3 at discretely high levels by HMT action, preceding the active transcription stage. In the disused muscle, the constant accumulation of ROS can saturate the antioxidant system which makes the enzymes inefficient in the balance of the ROS concentrations and blocks the HAT enzyme and the rest of the signaling pathway of mitochondrial biogenesis.

2.6.4 Physical exercise and epigenetic modifications in histones

In recent decades, many scientific researches have examined the effects of the effects of epigenetic modifications which are caused by physical exercise. The benefits of physical exercise for the maintenance of health extrapolate generations provide consequences for the offspring (AXSOM; LIBONATI, 2019); such as variations in insulin sensitivity (BARRES; ZIERATH, 2011a), in the development of obesity (BARRÓN-CABRERA et al., 2019) and in biochemical parameters. Glycemia and lipid profile can be modulated by maternal physical exercise during pregnancy (CARTER et al., 2013) and paternal physical exercise in the pre-conception period (STANFORD et al., 2018). Unfortunately, we were not able to perform a multivariate analysis of the effects of exercise on epigenetic changes, given that we found few studies evaluating the effect of adaptation to chronic exercise on the changes caused by DM2. Despite the promising reported effects of acute exercise, we considered that the adaptation to the physical training of chronic exercise should be evaluated to understand the molecular processes of physical exercise. Nevertheless, in the table 1 we present the studies which have been carried out in the last decade which evaluated the effects of physical exercise on epigenetic modifications in histones and in the expression of energy metabolism related factors. Among the analyzed articles, only OHSAWA et al., 2018 evaluated the effect of long-term physical exercise while other studies examines its effects on the striated skeletal muscle after a single exercise session (JOSEPH et al., 2017; LOCHMANN et al., 2015; MASUZAWA et al., 2018; MCGEE et al., 2009) or with a brief period of exercise (15 days). All studies observed the improvements in processes related to oxidative metabolism, glucose uptake and activation of gene transcription which are related to mitochondrial biogenesis. These effects were mediated by epigenetic modifications of methylation of H3K4me3 histones or acetylation of H3K36ac histones which demonstrate the mechanisms the underlying mechanisms of better metabolic control of T2DM.

In the Mcgee et al. 2009, it was observed increased acetylation of histones in a specific site which is related to synergic elevation of transcription. After 60 minutes of cycling, many changes take place, namely, the activation of RNA polymerase II (RNAPolII), activation of AMPK and CaMKII, export of HDAC class II (HDACs 4 and 5) from the nucleus and increase of H3K36ac. Therefore, the transcriptional activity

increased due to the generated elongation by the acetylation of H3K36, while the activation of AMPK and CaMKII allowed the export of the HDAC class II (HDACs 4 and 5) of the nucleus. This process keeps these enzymes distant from the histones and avoid the suppression of the H3K36 acetylation (MCGEE et al., 2009).

The activation of CaMKII, which is induced by a swimming protocol increased the acetylation of histones 3 near the site of the NRF1 gene, which had its expression increased in line with the increase in MEF2 expression by stimulating the binding of NRF1 to the MEF2 site. This results in a better uptake of glucose due to increased GLUT4 expression in response to MEF2 (JOSEPH et al., 2017).

Lochmann et al., 2015 evaluated racing protocols (35rpm/20min; 40rpm/30min; 45rpm/10min) and their effects on the epigenetic modifications of the PGC1 α promoter. The increase in the expression of PGC1 α total and isoforms (PGC-1 α -a, PGC-1 α -b, PGC-1 α -c) was evident. The trimethylation of H3K4 was observed in the second promoter of PGC1 α (promoter B), upstream of the beginning of the transcription, which constituted a strong relationship between the generated marks in histories and the increase of transcriptions in the distal promoter of PGC1 α (LOCHMANN et al., 2015).

The study conducted by Masuzawa et al., 2018 evaluated the protocol of aerobic exercise per run for 20 minutes at a speed of 24 m/min. After two hours of rest the tests were performed and showed an increase in mRNA expression from PGC1 α . Moreover, it was observed that there was an increase in H3K27ac muscle with increased RNAPolIII, which suggests that the transcriptional activation of PGC1 α is accentuated in muscles of rapid contraction due to greater mobility of RNAPolIII which is induced by H3K27ac. Such process improves the oxidative metabolism, as shown in Table 1 (MASUZAWA et al., 2018).

Ohsawa et al., 2018 observed the acetylation of histones 3 and the variations between its isoforms and H4K20me3 by among the established running protocols without significant variations. They suggested that the influence of the exercise on the is modifications of histones and their variant subtypes is inversed to H4K20me3 and may play a specific role in the muscle response to training (OHSAWA et al., 2018).

Table 1- Effect of exercise on epigenetic modifications in histones and their results on metabolism. RNApol = RNA polymerase; HDAC= Histone deacetylase; PGC1= Coactivator peroxysome-proliferator 1- α ; CaMKII= Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II.

<i>Reference</i>	<i>Type of physical activity</i>	<i>Tissue/ experimental model</i>	<i>Biogenesis / Signalling</i>	<i>Effect on histones</i>	<i>Metabolic result</i>
(MCGEE et al., 2009)	Acute exercise, 60-minute cycling session	Vast side muscle/ humans	-RNApol II active; -AMPK and CaMK II activated; -HDAC class II (4 and 5) exported from the core.	↑H3K36ac	H3K36ac increases transcriptional activity; HDAC class II (4 and 5) exported from the core by activation of AMPK and CaMKII, prevents the suppression of acetylation.
(LOCHMAN et al., 2015)	Acute exercise, Race for 60 minutes, being: 35rpm/20min; 40rpm/30min; 45rpm/10min	Quadriceps muscle/ mice	↑ total PGC1 expression and isoforms	↑ H3K4me3 at the place where the transcription begins	↑ mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism
(JOSEPH et al., 2017)	Short-term exercise, 15 days of swimming	Gastrocnemius muscle /Wistar rats	CaMKII activation; ↑NRF1 and MEF2	↑ H3 acetylation at the NRF1 gene site	↑ Transport and capture of glucose
(MASUZAWA et al., 2018)	Acute exercise, running: 24m/min for 20min	Plant and soleus muscles/Wistar rats	↑ mRNA expression from PGC1 2 hours after the race	↑ H3K27ac or ↑ RNApol II	Activation of the transcription of PGC1 α in the rapidly contracting muscle fibers due to increased mobility of H3k27ac-induced RNApol II, improving oxidative metabolism

(OHSAWA et al., 2018)	Long-term exercise, Running: Group 1: 30min/day, 4 days/week, 8 weeks; Group 2: 15min/day, 4 days/week, 8 weeks; Group 3: 60min/day, 4 days/week, 4 weeks.	Plant muscle/Wistar rats	↑ citrate activity synthase in group 3	Variations in the acetylation of H3 and H4K20me3 between groups;	↑ H3 and ↓H4K20me3 acetylation in group 1, without stimulation of mitochondrial metabolism; Increase in the daily amount of exercise, group 3, caused a slight increase in mitochondrial metabolism.
--------------------------	--	--------------------------------	---	---	---

An increase in the expression of mRNA of PGC1 α and of cytochrome C and cyclooxygenase IV (COX IV) was observed after ten cycling sessions lasting 60 minutes (Stepto et al., 2012), highlighting the positive regulation of exercise on the expression of genes of lipid metabolism (Pinto et al., 2018). The enzyme citrate synthase (CS) had the activity increased after 4 weeks of high intensity cycling training, 4 minutes per session, together with the increase of NRF1, NRF2 and TFAM proteins. The mRNA expression levels of NRF1 and NRF2 factors also increased after 4 weeks running continuous cycling training for 30 minutes in each session. When comparing the groups in relation to CS activity, the proportion of NRF2 and TFAM was evidenced in the group with the highest activity of the CS enzyme, suggesting the positive regulation in mitochondrial biogenesis by the exercise-induced NRF2 (ISLAM et al., 2020).

2.7 Conclusion

The regulation of PGC1 expression maintains a close relationship with mitochondrial function, being primordial in changes in glucose uptake and in insulin sensitivity through physical exercise. Epigenetic modifications, dynamic and resulting from physical exercise, promote the activation and expression of PGC1 mediated by the coordinated action of different pathways and the reduction of the action of ROS. Acetylation of histones (H3K9ac, H3K27ac) and trimethylation (H3K4me3) were observed as regulators of PGC1 expression, increasing its transcriptional activity. However, the complexity of the pathways that determine this process remains unknown. Recently there are a series of studies on the epigenetic mechanisms related to the effect of physical exercise on mitochondrial biogenesis and homeostasis, besides methylation or acetylation of histones, but even so, more studies on the long-term effect of physical exercise are necessary to elucidate which are the best types, duration and frequency that have the greatest potential to promote an increase in mitochondrial biogenesis. In addition, the elucidation of pathways may serve as subsidies to direct and foster the development of effective drugs for prevention and

treatment of metabolic diseases that are improved by physical exercise, aiming at the control of the clinical picture and even the benefit of patients unable to exercise

3.0 Capítulo 2

O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A BIOGÊNESE MITOCONDRIAL EM RATOS WISTAR COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

3.1 Resumo

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica crônica altamente prevalente nas populações atuais, sendo caracterizada por alterações na ação tecidual ou na secreção da insulina, no metabolismo lipídico e hiperglicemia crônica. A homeostasia e a biogênese mitocondriais são fatores de grande importância na regulação do metabolismo lipídico por meio da beta oxidação. As modificações na expressão de genes relacionados à biogênese e homeostasia mitocondrial no músculo estriado esquelético têm sido apontadas como mecanismos associados ao desenvolvimento da resistência à insulina e ao DM2. Por outro lado, tem sido demonstrado que o exercício físico exerce efeito em várias vias metabólicas para melhoria da desregulação metabólica do DM2, de forma que as mitocôndrias são candidatas a esses efeitos benéficos na regulação do metabolismo lipídico. O presente estudo teve como objetivos testar as hipóteses que: a) o DM2 causa modificações na expressão de genes que comprometem a biogênese e a homeostasia mitocondrial por meio da sub-regulação do fator coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1 α), diminuindo a expressão de outros fatores de transcrição, tais como o fator nuclear respiratório 1 (NRF1), fator de transcrição mitocondrial (TFAM) e fator estimulante de miócitos 2 (MEF2) em efeito cascata; b) o exercício físico reverte essas alterações, estimulando a expressão do PPARGC1A estimulando a cascata da biogênese mitocondrial a jusante do PGC1 α . Foram utilizados 18 ratos Wistar divididos em grupo controle (C), alimentados com alimentação balanceada para ratos e com DM2 (D), alimentados com alimentação rica em gordura. Após isso, os grupos foram subdivididos em dois outros grupos, um sedentário e outro submetido ao exercício físico formando os seguintes grupos:

controle + sedentário (C), com DM2 + sedentário (D), controle + exercício físico (C-EF) e com DM2 + exercício (D-EF). Os animais do grupo de exercício foram submetidos a um protocolo de natação durante 6 semanas, com 5 sessões por semana de 30 a 50 minutos por dia progressivamente. Foram coletadas peso dos animais, gordura, sangue e tecido muscular. As amostras de músculo *gastrocnêmio* coletadas foram submetidas a extração de RNA, síntese de cDNA, PCR e qPCR para avaliação da expressão dos fatores de transcrição PGC1 α , NRF1, TFAM e MEF2. Nossos resultados mostraram que o exercício físico por 6 semanas amenizou a variação do perfil lipídico de animais com DM2, reduzindo os níveis de TGL e VLDL e elevou os níveis de HDL em ambos os grupos exercitados (C-EF e D-EF). O exercício aumentou a expressão de PGC1 e de MEF2 nos grupos alimentados com dieta equilibrada para ratos e exercitados (C-EF), mas não foi eficiente em produzir resultados similares nos animais com DM2 exercitados (D-EF). Concluímos que o exercício físico auxilia na prevenção do desenvolvimento do DM2, estimulando a expressão dos fatores relacionados a cascata da biogênese mitocondrial, como o PGC1 α e MEF2. A melhora do perfil lipídico observada pode atrasar o desenvolvimento da doença precedendo estímulos da expressão gênica favorável à biogênese e homeostasia mitocondrial, no caso de pacientes com DM2 a prática constante do exercício físico poderia favorecer a expressão gênica relacionada biogênese mitocondrial.

3.2 Palavras-chave

expressão gênica, metabolismo, mitocôndria, PGC1 α

3.3 Abstract

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is a chronic metabolic disease highly prevalent in current populations, and epigenetic changes, resulting from the environment, influence various processes in the regulation of metabolic pathways and the development of DM2. Mitochondrial homeostasis and biogenesis are factors of great

importance in the regulation of lipid metabolism and epigenetic changes in skeletal muscle have been identified as the mechanisms responsible for the development of DM2. On the other hand, physical exercise has an effect on several metabolic pathways to improve metabolic dysregulation of DM2, so that mitochondria are candidates for these beneficial effects on the regulation of lipid metabolism. The present study aimed to test the hypotheses that: DM2 causes epigenetic changes that alter mitochondrial biogenesis through the sub-regulation of the PGC1 α factor, decreasing the expression of other transcription factors (NRF1 / 2, TFAM and MEF2) in effect waterfall; physical exercise reverses these epigenetic changes by stimulating the expression of PPARGC1A by stimulating the cascade of mitochondrial biogenesis downstream of PGC1 α . Wistar rats were divided into a control group (C) with a balanced diet and diabetic (D) with a diet rich in fat. After that, the groups were subdivided into two other groups, one sedentary and the other submitted to exercise forming the following groups: control + sedentary (C), diabetic + sedentary (D), control + physical exercise (C-EF) and diabetic + exercise (D-EF). The animals in the exercise group were submitted to a swimming protocol for 6 weeks, with 5 sessions per week of 60 minutes per day. The muscle samples collected were submitted to RNA extraction, cDNA synthesis, PCR and qPCR to evaluate the expression of PGC1 α , NRF1, TFAM and MEF2 transcription factors. Our results showed that physical exercise for 6 weeks alleviated the variation in the lipid profile of animals with DM2, reducing the levels of TGL and VLDL and raising the levels of HDL in both groups exercised (C-EF and D-EF). Exercise increased the expression of PGC1 and MEF2 in groups fed a balanced diet for rats and exercised (C-EF), but was not efficient in producing similar results in animals with exercised DM2 (D-EF). We conclude that physical exercise helps to prevent the development of DM2, stimulating the expression of factors related to the cascade of mitochondrial biogenesis, such as PGC1 α and MEF2. The improvement in the lipid profile observed can delay the development of the disease preceding stimuli of gene expression favorable to biogenesis and mitochondrial homeostasis, in the case of patients with DM2 the constant practice of physical exercise could favor the gene expression related to mitochondrial biogenesis.

3.4 Keywords

gene expression, metabolism, mitochondria, PGC1 α

3.5 Introdução

O Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença caracterizada por desordens metabólicas que mantêm os níveis glicêmicos acima dos valores normais, apresentando quadros de hiperglicemia e de alterações no metabolismo lipídico, decorrentes da ação inadequada da insulina nos tecidos alvo (HOOPER et al., 2014). A incidência do DM2 tem aumentado em níveis alarmantes nos últimos anos, com prevalência mundial estimada em torno de 8,4%, o equivalente a 451 milhões de pessoas. Até o ano de 2045 estima-se que esse número chegue a 693 milhões de pessoas com diabetes mellitus (CHO et al., 2018). A importância dessa doença crônica não transmissível é bem reconhecida, não só por sua alta prevalência nas sociedades atuais, como também pelas complicações secundárias, tais como: doenças cardiovasculares, neuropatia, nefropatia e retinopatia, além dos gastos elevados com o tratamento dos pacientes acometidos pelo DM2 e suas comorbidades (KO et al., 2012; SANTOS et al., 2008).

O sedentarismo, os hábitos alimentares incorretos e a obesidade são importantes fatores de risco modificáveis para o desenvolvimento do DM2. A desproporção entre o consumo de calorias e o gasto energético compromete a funcionalidade metabólica e intensifica o armazenamento energético no tecido adiposo e, em alguns casos em outros tecidos corporais (MILAGRO et al., 2013). O armazenamento elevado de triacilglicerol (TGL) em adipócitos leva a um estado de saturação com inflamação tecidual decorrente da ativação e da infiltração de macrófagos no tecido adiposo e da ativação de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL6), TNF- α . Esse estado inflamatório conduz ao armazenamento de lipídeos em tecidos periféricos não especializados, como o músculo estriado esquelético, caracterizando a lipotoxicidade, que gera alterações na

homeostasia e na biogênese mitocondrial, comprometendo o metabolismo da glicose, que pode evoluir para a resistência à insulina (GUILHERME ET AL., 2008)

A mitocôndria é a organela responsável pelo metabolismo de ácidos graxos através da β – oxidação, sendo a homeostasia e a biogênese mitocondrial fatores de grande importância na regulação desse processo. A biogênese mitocondrial é controlada por uma via de sinalização coordenada por coativadores e fatores de transcrição, como o coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1 α), fator de transcrição mitocondrial (TFAM), fatores nucleares respiratórios 1 e 2 (NRF1/2) e fator estimulante de miócitos 2 (MEF2). O PGC1- α , codificado pelo gene PPARGC1A, modula diversas vias de regulação do metabolismo mitocondrial. Sua ativação inicia uma modulação em cascata, induzindo a transcrição NRF1/2 e expressão de outras proteínas, como o TFAM, transportador de membrana, citocromo oxidase e citocromo c IV (STEPTO et al., 2012). Esses fatores atuam na biogênese e na homeostasia mitocondrial, sendo que o TFAM é o fator essencial para o início da transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA) (SANTOS et al., 2015b).

Mudanças na expressão dos genes são causadas de forma independente do DNA e têm importante papel no desenvolvimento de doenças crônicas, por causa de alterações causadas no fenótipo das células que levam à manifestação da doença. Alterações no funcionamento do PGC1 α podem ser decorrentes de modificações na transcrição e na expressão de genes (MILAGRO et al., 2013). No músculo esquelético, o MEF2 tem função promotora sobre o PGC1 α , que, por sua vez, também pode promover autorregulação positiva da expressão de PGC1 α por ligação direta ao sítio de ligação do MEF2 (LIRA et al., 2010).

Por desempenhar um papel fundamental na terapia do DM2, o exercício físico é tido como uma intervenção não medicamentosa que melhora as características da doença e previne as comorbidades do DM2, controlando os parâmetros de glicose sanguínea, perfil lipídico e pressão arterial (HOOPER et al., 2014). O exercício físico contribui com a redução de triglicérides e lipoproteína de baixa densidade (LDL), e normalmente induz o aumento de lipoproteínas de alta densidade (HDL), que é uma molécula eficiente na remoção de colesterol celular. Além disso, a inflamação presente nos tecidos, devido a deposição lipídica, pode ser atenuada como consequência da atividade física, melhorando as defesas antioxidantes (PINTO et al., 2018).

O exercício físico melhora a sensibilidade à insulina e pode aumentar a concentração de glicogênio muscular em pessoas com DM2, torna a oxidação de ácidos graxos mais eficiente e melhora a síntese de enzimas do ciclo de Krebs. A sinalização da insulina é influenciada pela contração muscular, a captação de glicose é induzida devido a translocação de vesículas GLUT4 para a membrana mediada pela proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), melhorando a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (HOOPER et al., 2014; MANABE et al., 2014).

Vários estudos têm avaliado o efeito do exercício agudo na expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial. No estudo realizado por LOCHMANN et al., 2015, o protocolo de 60 minutos de corrida evidenciou o aumento da expressão de PGC1 α no músculo *quadríceps* de ratos (LOCHMANN et al., 2015). MASUZAWA et al., 2018, observaram a expressão aumentada de PGC1 α nos músculos *plantar* e *sóleo* de ratos *wistar* após o protocolo de 20 minutos de corrida. Porém, a comparação entre os músculos demonstrou maior expressão mRNA PGC1 α no músculo *plantar*, devido maior atividade da RNAPol II induzida pela acetilação (H3K27ac) nas fibras musculares de contração rápida (MASUZAWA et al., 2018). Dessa forma, a avaliação dos efeitos resultantes de protocolos de exercício crônico pode trazer maior elucidação dos mecanismos subjacentes a regulação da biogênese mitocondrial, visto que a prática regular, a longo prazo, de exercício físico é indicada como tratamento não medicamentoso aos pacientes com DM2.

Assim, o presente estudo teve como objetivos testar as hipóteses que: a) o DM2 causa prejuízos na biogênese mitocondrial por meio da sub-regulação do fator PGC1 pelo núcleo das células, que, em efeito cascata, diminui a expressão de outros fatores de transcrição (NRF1, TFAM e MEF2), causando disfunção mitocondrial e conduzindo à resistência à insulina; b) o exercício físico estimula a expressão do promotor de PGC1, contribuindo para o aumento da sensibilidade à insulina no músculo esquelético. Dessa forma, o objetivo do estudo foi verificar se o exercício físico reverte as alterações na expressão de genes e de fatores de transcrição relacionados à homeostase e à biogênese mitocondrial causadas pelo DM2.

4.0 Material e métodos

4.1 Animais

Foram utilizadas amostras de músculo *gastrocnêmio* e plasma congelado provenientes de animais manipulados em experimento anterior realizado em 2015 pela equipe de pesquisa dos laboratórios de Bioquímica e Fisiologia sob o número de protocolo 034/14 CEUA/UFG, sendo a sequência de execução do experimento aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-Jataí mediante protocolo nº 025/19. Foram utilizados ratos Wistar machos, da espécie *Rattus norvegicus*, com 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da UFG-Regional Goiânia e mantidos na sala de experimentação do curso de Psicologia da Universidade Federal de Goiás-Regional Jataí. Os animais foram alojados aos pares em gaiolas de polipropileno com bebedouros e substratos de maravalha, acondicionadas em gabinetes para biotério. As condições ambientais foram padronizadas com ciclo circadiano invertido 12h claro/escuro e temperatura ambiental de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. A dieta e a água foram oferecidas *ad libitum*.

4.2 Delineamento Experimental

O delineamento é apresentado na figura 1. Os animais foram induzidos ao diabetes mellitus mediante administração de dieta hiperlipídica e injeção de estreptozotocina. Ratos Wistar (n=20) foram alimentados com dieta rica em gordura (dieta hiperlipídica) da Pragsoluções Biociências® (Jaú, SP) contendo 5,35 kcal/g (15,2% kcal proteína, 26,9% kcal carboidrato e 57,2% gordura), e no 13º dia, foram mantidos em jejum por 12 horas. No 14º dia foi administrada via intraperitoneal uma dosagem baixa de estreptozotocina (Sigma Aldrich) (STZ diluído em tampão de citrato, pH 4,5 - 25mg/kg de peso corporal do animal). Essa dieta foi oferecida durante todo o período experimental e este grupo foi denominado como D (indução ao DM2). A glicemia capilar, coletada da cauda, sem jejum prévio, foi monitorada semanalmente

entre 12:00h e 14:00h com o uso de um glicosímetro (Accu-Chek®). A glicemia em jejum foi avaliada no início e final do experimento. Animais com idade similares (n=20) foram utilizados como controle, os animais receberam ração balanceada, e no 14º dia foi administrada injeção de tampão de citrato (pH 4,5), estes animais receberam dieta balanceada para ratos da empresa a Pragsoluções Biociências®, contendo 3.87 kcal/g (24,8% kcal proteína, 63% kcal carboidrato e 12% kcal gordura). e este grupo foi identificado como C (controle), conforme Santos et al. (2018). Após isso, os grupos foram subdivididos em dois outros grupos, um sedentário e outro submetido ao exercício formando os seguintes grupos: controle + sedentário (C), com DM2 + sedentário (D), controle + exercício físico (C-EF) e com DM2 + exercício (D-EF). Os animais do grupo de exercício foram submetidos a um protocolo de natação durante 6 semanas, com 5 sessões por semana, sem sobrecarga na cauda. O treinamento de natação foi realizado entre 12h e 14h, em baldes com 80 cm de comprimento, 50 cm de largura e 90 cm de profundidade. Na primeira semana a duração do exercício foi de 30 minutos e a cada semana, para melhorar a resistência dos animais, houve incremento de 5 minutos. Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício os animais foram submetidos a anestesia geral com isoflurano inalatório, utilizando vaporizador de bomba de aquário, e eutanasiados por exanguinação.

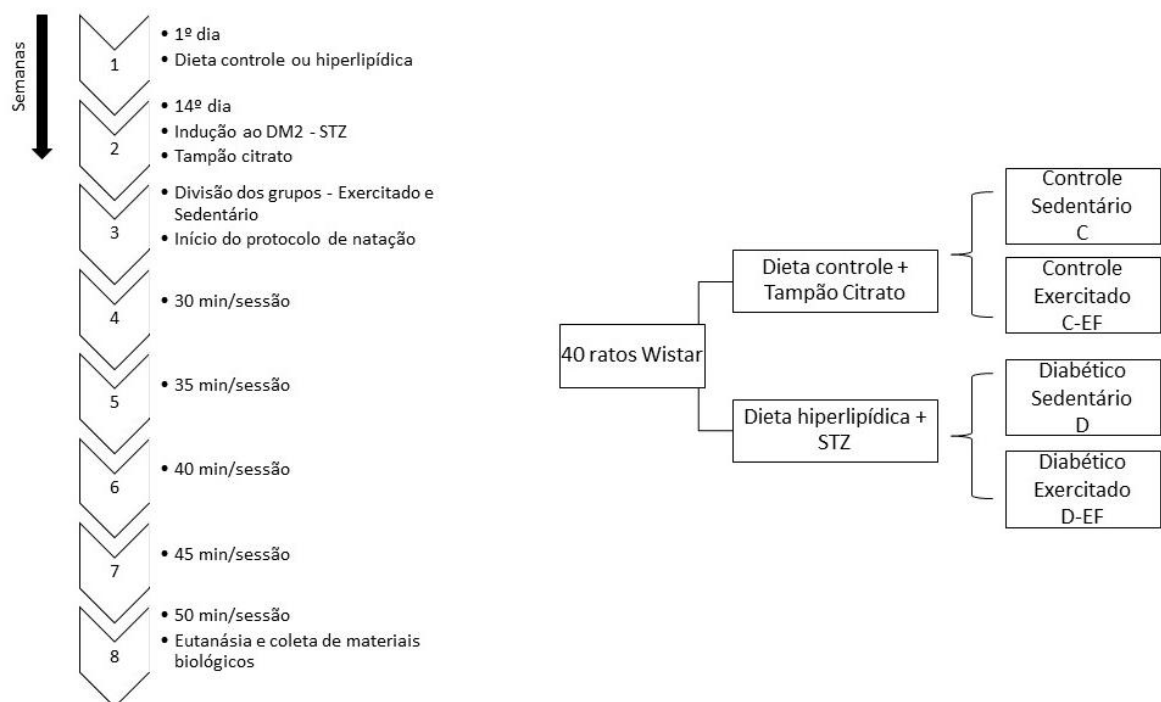


Figura 6 - Desenho e linha do tempo dos procedimentos experimentais, STZ=estrepozotocina, C= Controle sedentário, C-EF = Controle exercitado, D= com DM2 sedentário, D-EF= com DM2 exercitado

4.3 Ganho de massa corporal

A quantidade de ração ingerida (em gramas) e a massa corporal foram avaliadas semanalmente por meio de balança digital (Marte®). O ganho de massa corporal foi calculado pela diferença entre a massa corporal final e a inicial do experimento.

4.4 Coleta de sangue e de tecidos

Ao término do protocolo experimental, o sangue foi coletado com seringa contendo solução anticoagulante inibidora da glicólise (6 g/dl de EDTA e 12 g/dl de fluoreto de potássio do Kit Glistab da Labtest®, Lagoa Santa, MG). Em seguida foi centrifugado a 3000 g/10 min/25°C, o plasma foi coletado e armazenado a -20°C para posteriores análises.

Os tecidos biológicos e o músculo *gastrocnêmio* foram coletados e congelados em freezer a -20°C antes do processamento (BENITE-RIBEIRO ET AL., 2020).

4.5. Análises bioquímicas

4.5.1. Glicose e perfil lipídico

A glicemia capilar avaliada no início, meio e fim do período experimental, e foi determinada pelo glicosímetro (Accu-Chek®, Santo André /SP). No final do experimento foram determinadas a glicose plasmática em jejum pelo método da glicose oxidase (Kit colorimétrico da Labtest®), e as concentrações sanguíneas de triacilglicerol (TGL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram determinadas por

Kits colorimétricos da marca Labtest®. A concentração da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) foi determinada pela divisão do valor de TGL por cinco.

4.6 Análises moleculares

4.6.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada manualmente por maceração do tecido muscular em almofariz com pistilo utilizando nitrogênio líquido (N₂). Após a maceração, as amostras foram armazenadas em botijão de nitrogênio para processamento no dia seguinte. A extração foi realizada utilizando 100mg de tecido macerado com adição de 1,0 ml de TRI Reagent® de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich). Para avaliar a pureza das amostras, a densidade óptica do material extraído foi quantificada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific).

4.6.2 Avaliação de pureza por espectrofotometria

Para avaliar a pureza das amostras, a densidade óptica do material extraído foi quantificada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific), apresentando razão ≥ 1.87 entre as absorbâncias a 260 e 280nm.

4.6.3 Avaliação da integridade do RNA por Eletroforese

A análise de integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese das amostras (500ng) em gel de agarose (2%) e tampão TBE 1X, corado com brometo de etídeo

4.6.4 Transcrição reversa

Após a quantificação das amostras de RNA, 1µg/µL de RNA foi utilizado para síntese do cDNA, utilizando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) a reação seguiu as seguintes etapas: 2µL de 10X RT Buffer; 0,8µL de 25X dNTP (100nM); 2µL de 10X Random primers; 1µL de transcriptase reverse; 1 µL de inibidor de RNase; 3,2µL de água miliQ e 10µL da amostra de RNA. O volume final de 20µL foi incubado utilizando o termociclador (Veriti- Applied Biosystems). O programa utilizado foi o sugerido pelo fabricante, sendo o estágio 1 a 25°C por 10 minutos; o estágio 2 a 37°C por 120 minutos; o estágio 3 85°C por 5 minutos e o estágio final a 4°C. Após a síntese o cDNA foi armazenado a -20°C.

4.6.5 PCR

O cDNA sintetizado foi submetido a PCR para visualização de amplificação do gene de referência β -actina. Foram realizadas 10 reações, sendo 8 amostras de cDNA, 1 controle negativo e 1 controle positivo. A reação seguiu as seguintes etapas: 2,5µL de Buffer PCR 10x; 2,0µL DNTPs 2,5mM; 1,25µL do Primer Forward 10µM; 1,25µL do Primer Reverse 10µM; 0,2µL Taq DNA polimerase 5U/µL; 12,8µL de água miliQ e 5µL de cDNA, com volume final de 25µL. Para a PCR foi utilizado o termociclador (Veriti- Applied Biosystems), com o protocolo de ciclo seguinte: 95°C por 2 minutos (etapa única); 94°C por 1 minuto, 52,5°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos em 35 ciclos; uma fase final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Após a PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 2% para visualização dos produtos amplificados na reação.

4.6.6 qPCR

As amplificações por PCR em tempo real foram efetuadas utilizando-se 80ng/μl de cDNA adicionado a uma reação contendo 10 μl de PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 2μl dos primers (Forward e Reverse) 100 nM em uma solução com volume final de 20μl, cada amostra em triplicata biológica e mais duas replicatas técnicas. As condições de ciclagem ocorreram conforme a padronização de cada primer. Sendo utilizados os primers β -actina, PGC1 α , TFAM, NRF1 e MEF2, descritos na tabela 2. Após a reação de qPCR em sistema StepOnePlus™ System (Applied Biosystems), o valor Cq (Cycle Quantification) de cada amostra foi calculado em *software* Step One (Applied Biosystems). A média dos valores Cq das triplicatas para cada amostra foram utilizadas para a análise da expressão relativa de mRNA, usando o gene β -actina como alvo de referência.

Tabela 2 – Sequência dos primers utilizados na reação de PCR, β -actina, PGC1 α , TFAM, NRF1 e MEF2.

Primer	Sequência
β-actina	Forward 5'- CCTCTATGCCAACACAGTGC-3' Reverse 5'- CATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'
PGC1α	Forward 5'-GCAGCCAAGACTCTGTATGGA-3' Reverse 5'-CCAGTGTCTCTGTGAGGACC-3'
TFAM	Forward 5'-GTGATCTCATCCGTCGCAGT-3' Reverse 5'- CAGATGCACGCACAGTCTTG-3'
NRF1	Forward 5'-CCTCTGGGCTGTTGTGAA TTA-3' Reverse 5'-CTACTGCCAGAAGGACTGAAAG-3'
MEF2	Forward 5'-TGAGGTAGGGAGAGGAGATAGA-3' Reverse 5'-CGTGAGAGAGCCACAGTTTAAT-3'

4.7 Análise estatística

Para análise dos dados, a distribuição de normalidade foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Os dados dos parâmetros bioquímicos e morfométricos são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para verificar as diferenças entre o grupo controle e os grupos experimentais das variáveis gordura abdominal, glicemia, perfil lipídico, ganho de massa corporal, foi utilizado o teste de ANOVA com pós teste de Dunnet. A expressão gênica de PGC1, MEF2, NRF2 e TFAM são apresentadas como média e desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de ANOVA

de um fator com pós teste de Tukey para as amostras com distribuição normal, e para as amostras com distribuição não normal foi utilizado o teste Kruskal-Wallis de um fator com pós teste de Dunns. A associação entre as variáveis foi testada como o teste de correlação de Pearson, usando o software SPSS Statistic® (IBM Corporation, Armonk, NY). O nível de significância foi de $p < 0,05$.

5.0 Resultados

5.1 Efeito do exercício físico na expressão gênica relativa

Na análise do efeito do exercício físico, os alvos PGC1 α e MEF2 apresentaram aumento da expressão gênica no grupo controle exercitado (C-EF) em relação aos demais, o NRF1 foi maior no grupo controle do que nos demais e a expressão do TFAM não foi alterada pelo exercício. O PGC1 α foi mais expresso no grupo C-EF em relação ao grupo controle (C) e ao grupo com DM2 sedentário (D). O MEF2 apresentou aumento da expressão no grupo C-EF em relação aos grupos com DM2 sedentário (D) e com DM2 exercitado (D-EF) (figura 8).

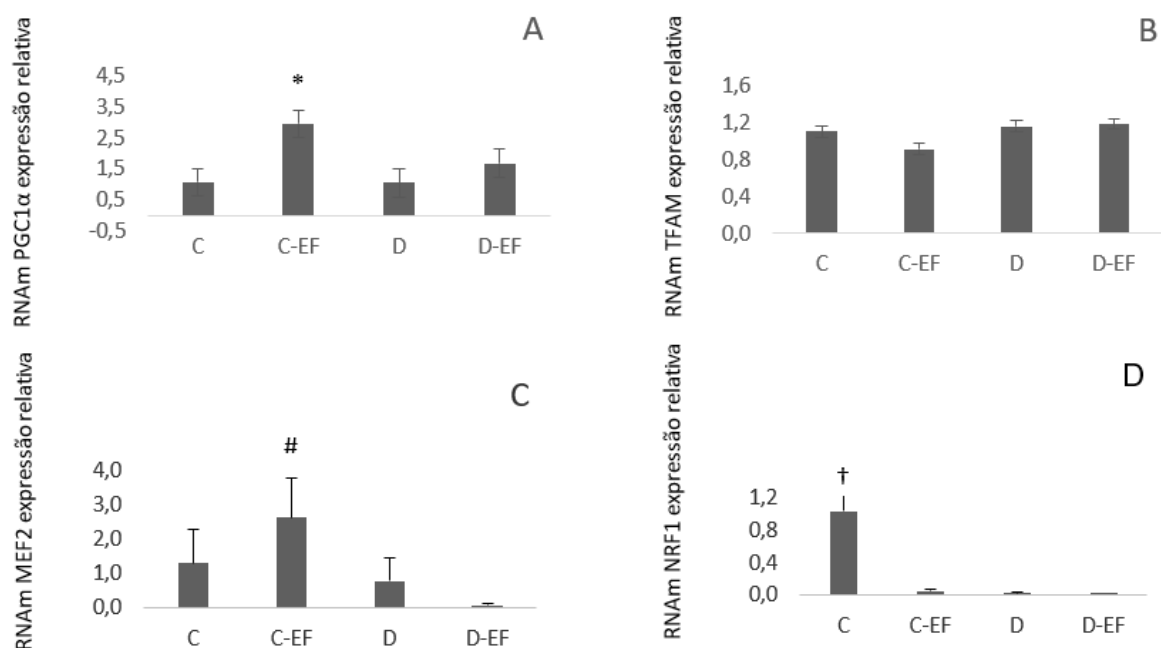


Figura 8 Expressão gênica diferencial mRNA PGC1 α (A), mRNA TFAM (B), mRNA MEF2 (C), mRNA NRF1 (D), no músculo gastrocnêmio, controle exercitado (C-EF), com DM2 (D) e com DM2 exercitado

(D-EF) por PCR em tempo real usando cDNA. (A)* $P=0,004$ C-EF em relação ao C e $P=0,002$ C-EF em relação ao grupo D; (C) # $P=0,003$ C-EF em relação ao D e $P=0,001$ C-EF em relação ao grupo D-EF; (D) † $P=0,002$ C-EF em relação ao grupo C, $p=0,02$ grupo D em relação ao C, $P=0,003$ C-EF em relação ao grupo D-EF e $p=0,031$ D em relação ao grupo D-EF.

5.2 Efeito do exercício físico nos parâmetros bioquímicos e morfométricos

Na tabela 3 são apresentadas as porcentagens de variação dos indicadores bioquímicos e morfométricos dos grupos controle exercitado (C-EF), com DM2 (D) e com DM2 exercitado (D-EF) em relação ao grupo controle (C). Os valores plasmáticos de triacilglicerol (TGL) e de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) reduziram em torno de 40% nos grupos exercitados C-EF e D-EF em relação ao grupo controle, paradoxalmente no grupo D houve uma redução de 18,97% dos níveis de TGL e VLDL em comparação ao grupo controle. Por outro lado, a lipoproteína de alta densidade (HDL) apresentou aumento em 62,6% (C-EF) e em 43,36% (D-EF) quando comparado ao grupo controle sedentário. A glicemia apresentou aumento nos grupos D e D-EF, enquanto o grupo C-EF demonstrou redução de 3,79% no valor de glicemia em relação ao grupo controle. O ganho de massa corporal foi maior nos grupos D e D-EF, e reduziu no grupo C-EF em 3,79%. A gordura abdominal foi maior em todos os grupos em relação ao controle, mas com um percentual muito maior nos grupos D e D-EF em relação ao aumento da gordura no grupo C-EF.

Tabela 3 – Efeito da dieta hiperlipídica e do exercício físico nos indicadores bioquímicos e morfométricos nos grupos experimentais em relação ao grupo controle (C). Grupo controle exercitado (C-EF), com DM2 (D) e com DM2 exercitado (D-EF) com o grupo controle (C). Triacilglicerol (TGL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), glicemia, ganho de massa corporal (GM) e gordura abdominal (GA)

	C	C-EF	D	D-EF
TGL	94,58±63,2	56,65±19,0	76,64±46,5	55,98±44,9
VLDL	18,92±12,6	11,33±3,8	15,33±9,3	11,20±9,0
HDL	29,46±7,7 [#]	47,90±14,1	32,90±12,5	42,23±11,3
Glicemia	137,6±10,7	132,42±9,6	164,82±59,4	164,70±19,3
GM	122,09±29,1 ^{**}	110,46±35,5	164,55±49,5	170,80±84,5
GA	23,26±9,3 [*]	24,71±7,3	36,52±14,2	35,31±12,3

p=0,001 em comparação ao C-EF, p=0,022 em comparação ao D-EF; **p= 0,049 em comparação ao D-EF, *p=0,010 em comparação ao D, p= 0,022 em comparação ao D-EF.

O efeito da dieta e do exercício físico sobre as médias dos indicadores bioquímicos e morfométricos é apresentado na tabela 4. A avaliação dos grupos tratados em relação ao controle apresentou diferença no HDL, no ganho de massa corporal e na gordura abdominal. O HDL foi maior nos grupos exercitados (C-EF e D-EF), enquanto o ganho de massa corporal foi maior no grupo D-EF e a gordura abdominal foi maior nos grupos que receberam dieta hiperlipídica (D e DEF). Houve diferença na glicemia entre os grupos quando testada por ANOVA (P=0,032), porém o teste de Dunnet não foi sensível o suficiente para distinguir a diferença entre os grupos. As diferenças entre C versus D foi de p= 0,06 e do C versus D-EF foi de p= 0,07.

Foram observadas associações positivas entre variáveis bioquímicas, morfométricas e moleculares, conforme apresentado na tabela 5. Houve associação positiva entre gordura e glicemia, ganho de massa e perfil lipídico (TGL, VLDL e HDL). e o ganho de massa correlacionou-se positivamente com o TGL e VLDL. O HDL demonstrou forte correlação com os fatores moleculares PGC1 α e MEF2 e o PGC1 α correlacionou-se positivamente com MEF2. Em contrapartida, a relação entre NRF1 e HDL foi negativa, assim como a associação entre PGC1 α e TFAM.

Tabela 4 - Associações entre as variáveis: Gordura abdominal, Glicemia, Triglicérides livres (TGL), Lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), Lipoproteínas de densidade alta (HDL), Ganho de massa corporal (GM), Coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1 α), Fator estimulante de miócitos 2 (MEF2), Fator nuclear respiratório 1 (NRF1) e Fator de transcrição mitocondrial (TFAM).

	Gordura	Glicemia	TGL	VLDL	HDL	GM	PGC1 α	MEF2	NRF1	TFAM
Gordura P		0,345* 0,024	0,488* 0,001	0,488* 0,001	0,337* 0,027	0,677* 0,000	0,072 0,689	-0,167 0,406	-0,285 0,406	0,109 0,522
Glicemia P			0,243 0,111	0,243 0,111	0,095 0,542	0,184 0,232	-0,204 0,247	-0,248 0,212	-0,122 0,472	0,294 0,073
TGL P				1,000** 0,000	0,193 0,211	0,310* 0,041	-0,014 0,936	-0,032 0,875	0,288 0,084	0,166 0,318
VLDL P					0,193 0,211	0,310* 0,041	-0,014 0,936	-0,032 0,875	0,288 0,084	0,166 0,318
HDL P						0,113 0,464	0,642** 0,000	0,603** 0,001	-0,365 0,026	-0,165 0,322
GM P							-0,020 0,909	-0,224 0,261	-0,172 0,308	0,089 0,509
PGC1α P								0,804** 0,000	-0,295 0,102	-0,524** 0,002
MEF2 P									-0,140 0,486	-0,244 0,231
NRF1 P										0,129 0,468
TFAM P										

Correlação de Pearson. *=P<0,05 **=P<0,01

6.0 Discussão

Na presente pesquisa, a hipótese de redução da expressão de genes relacionados à biogênese e homeostasia mitocondrial não foi corroborada. Entretanto, conseguimos demonstrar que o exercício físico foi eficiente em elevar os níveis de HDL em ambos os grupos exercitados (C-EF e D-EF) (Tabela 3) e aumentou a expressão de PGC1 e de MEF2 (Figura 8) nos grupos alimentados com dieta equilibrada para ratos e exercitados (C-EF), mas não foi eficiente em produzir resultados similares nos animais com DM2 exercitados (D-EF). Esses resultados demonstram a importância da associação da dieta equilibrada e da prática de exercício físico na promoção da saúde e prevenção de doenças metabólicas. No presente estudo, encontramos resultados condizentes com o DM2, tais como o aumento da massa corporal e da gordura abdominal e alterações na glicemia (tabela 3), causados pela administração da dieta hiperlipídica associada à baixa dose de estreptozotocina (25 mg/Kg de massa corpora do animal), conforme descrito em outras pesquisas (BENITE-RIBEIRO et al., 2020; SANTOS et al., 2018). De fato, as alterações bioquímicas e antropométricas descritas e que caracterizam o DM2 são níveis glicêmicos e hemoglobina glicada elevados, acompanhados de variações nos parâmetros lipídicos, tais como TGL, LDL e colesterol total elevados. As alterações antropométricas comuns são, maior deposição de gordura central (abdominal) e elevação da massa corporal caracterizada por sobrepeso e/ou obesidade (SBD, 2018).

Em relação ao efeito do exercício físico sobre as alterações anteriormente descritas, nossos resultados demonstraram que o exercício físico por 6 semanas amenizou a variação do perfil lipídico de animais com DM2 elevando os níveis de HDL (tabelas 3). Em condições fisiológicas normais, o metabolismo dos lipídeos ocorre por ação da mitocôndria na β -oxidação de ácidos graxos, e a disfunção dessa organela resulta em alterações metabólicas que reduz a sensibilidade dos tecidos à insulina, mantendo a hiperglicemia plasmática e precedendo o DM2, entre outras doenças metabólicas (RAHMAN et al., 2017). O exercício físico beneficia a manutenção da saúde e o controle glicêmico melhorando a sensibilidade à insulina (BARRES;

ZIERATH, 2011), evitando o desenvolvimento da obesidade (BARRÓN-CABRERA et al., 2019) e mantendo os níveis plasmáticos do perfil lipídico nos padrões de normalidade (CARTER et al., 2013).

Em pesquisa anterior do grupo, realizada com a mesma metodologia, foi observado que o exercício aeróbico também atenuou o aumento no ganho de massa corporal, de gordura abdominal e promoveu aumento do HDL. Nas análises multivariadas, na qual foram comparados os efeitos da dieta e do exercício físico separadamente e depois a interação entre esses fatores, foi observado que o exercício físico diminuiu o TGL e o VLDL dos animais dos grupos controle e com DM2 exercitados em relação aos grupos controle e DM2 sedentários. Na investigação sobre os efeitos do DM2 e do EF na função mitocondrial, os autores encontraram que o ROS estava aumentado nos animais com DM2 sedentários e com DM2 exercitados. O CytB estava reduzido nos animais com DM2 sedentários, mas não nos animais com DM2 exercitados. Assim, apesar de o EF não aumentar o CytB dos animais dos grupos exercitados, o CytB dos animais com DM2 exercitados foi similar ao dos animais dos grupos controle, demonstrando o efeito benéfico do EF na função mitocondrial (BENITE-RIBEIRO et al., 2020).

Vale ressaltar que o Cytb é um polipeptídeo componente do complexo III envolvido na via de fosforilação oxidativa por meio da cadeia de transporte de elétrons (ETC). Níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (ROS) geram danos no DNA mitocondrial (mtDNA), diminuindo a transcrição de CytB, prejudicando a via de fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons (SANTOS et al., 2018). Adicionalmente, o sistema antioxidante pode ser desestabilizado pela disfunção mitocondrial decorrente da ingestão elevada de lipídios associados ao aumento de massa corporal e do sedentarismo, gerando acúmulo de ROS, envolvidos no processo de resistência à insulina (FERREIRA et al., 2007; ZHANG; LIANG, 2018).

Em relação ao efeito do EF na biogênese mitocondrial, no presente estudo, observamos a influência do exercício físico nos animais alimentados com dieta equilibrada (C-EF), mas não nos animais com DM2. Os animais do grupo C-EF apresentaram aumento na expressão dos genes PGC1 α e MEF2 (figura 8), o que demonstrou o efeito benéfico do exercício físico na biogênese mitocondrial associada a alimentação equilibrada, o que está de acordo com a pesquisa de outros grupos

(DEHGHANI et al., 2018a; JOSEPH; AYELESO; MUKWEVHO, 2017; LOCHMANN et al., 2015; MASUZAWA et al., 2018).

Diversos estudos testaram o efeito do exercício físico na expressão de genes e a influência nos mecanismos metabólicos subjacentes, mas grande parte desses estudos avaliam o exercício agudo em músculos estriado esquelético de contração lenta e rápida (LOCHMANN et al., 2015; MASUZAWA et al., 2018). O estudo OHSAWA et al., 2018 avaliou o exercício crônico em músculo de contração rápida, observando um aumento da atividade da enzima citrato sintase e do metabolismo mitocondrial em protocolo de corrida por 4 semanas (OHSAWA et al., 2018). Porém, há necessidade de estudos que avaliem o exercício crônico. Em 2018, DEHGHANI et al., observaram o aumento da expressão de PGC1 α em animais submetidos ao exercício crônico e agudo, com maior expressão no protocolo crônico ou agudo de corrida em declive em comparação com o exercício crônico de corrida em alicive (DEHGHANI et al., 2018).

A regulação da biogênese e da homeostasia mitocondrial ocorre por meio da sinalização em cascata de fatores moleculares responsáveis pela gênese de novas organelas, o PGC1 α modula várias vias do metabolismo mitocondrial tendo como promotor principal no músculo esquelético o MEF2. Em consequência a ativação do PGC1 α , proteínas e fatores que regulam a transcrição mitocondrial, NRF1 e TFAM, são estimulados (SANTOS et al., 2015). O fator de transcrição de miócitos 2 (MEF2) é um regulador chave do desenvolvimento muscular e um dos principais reguladores da transcrição do PGC1 α . A expressão de PGC1 α por si só também é regulada por PGC1 α por meio da sua interação com MEF2 em seu próprio promotor por uma alça de alimentação direta (LIRA et al., 2010). O PGC1 α parece ter sua atividade regulada por modificações pós-traducionais. A fosforilação, mediada por 5'AMP-proteína cinase ativada (AMPK) e a desacetilação por SIRT1 (RINGHOLM et al., 2013; SCARPULLA, 2008, 2012) ativam o PGC1 α .

Nossos dados mostraram associação positiva entre o HDL, aumentado nos animais exercitados, e os fatores moleculares PGC1 α e MEF2, com expressão evidenciada nos animais exercitados. Tal razão sugere que o aumento dos níveis de HDL pode preceder o aumento da biogênese mitocondrial estimulado por maior tempo de exercício físico, no caso de pacientes com DM2 a prática constante do exercício físico poderia favorecer a expressão gênica relacionada biogênese mitocondrial.

7.0 Conclusões

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o exercício físico auxilia na prevenção do desenvolvimento do DM2, estimulando a expressão dos fatores relacionados a cascata da biogênese mitocondrial, como o PGC1 α e MEF2. O DM2 não reduziu a expressão dos genes relacionados a cascata da biogênese mitocondrial, mas em resposta ao exercício físico crônico a melhora do perfil lipídico observada pode atrasar o desenvolvimento da doença precedendo estímulos da expressão gênica favorável à biogênese e homeostasia mitocondrial. Além do mais, a correlação existente entre o HDL e o PGC1 α e MEF2 nos grupos avaliados sugerem que o exercício físico pode influenciar na expressão gênica melhorando o quadro clínico de pacientes com DM2. A avaliação de protocolos de exercício crônico e a modalidade executada, bem como o músculo recrutado, podem auxiliar no tratamento do DM2 e retardo de condições clínicas causadas por esta patologia.

Referências

- ABRAHAM, N. G. et al. Metabolic syndrome: psychosocial, neuroendocrine, and classical risk factors in type 2 diabetes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1113, p. 256–275, 2007.
- AXSOM, J. E.; LIBONATI, J. R. Impact of parental exercise on epigenetic modifications inherited by offspring: A systematic review. **Physiological Reports**, v. 7, n. 22, p. 1–9, 2019.
- BARRES, R.; ZIERATH, J. R. DNA methylation in metabolic disorders 1 – 4. v. 93, p. 897–900, 2011a.
- BARRES, R.; ZIERATH, J. R. DNA methylation in metabolic disorders. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 4, p. 897–900, 2011b.
- 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.
- BENITE-RIBEIRO, S. A. et al. Association between blood pressure, body mass index, eating habits, and physical activity in adolescents. **Scientia Medica**, v. 26, n. 4, p. 24243, 2016.
- BENITE-RIBEIRO, S. A. et al. Transcription of mtDNA and dyslipidemia are ameliorated by aerobic exercise in type 2 diabetes. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 9, p. 7297–7303, 2020.
- BENITE-RIBEIRO, S. A.; PUTT, D. A.; SANTOS, J. M. The effect of physical exercise on orexigenic and anorexigenic peptides and its role on long-term feeding control. **Medical Hypotheses**, v. 93, p. 30–33, 2016.
- BROOKHEART, R. T. ET AL. As A Matter of Fat. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2010.
- CARTER, L. G. et al. Maternal exercise improves insulin sensitivity in mature rat offspring. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 45, n. 5, p. 832–840, 2013.
- CHO, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 271–281, 2018.
- D'AQUILA, P. et al. Multi-tissue DNA methylation remodeling at mitochondrial quality control genes according to diet in rat aging models. **Nutrients**, v. 12, n. 2, 2020.
- DE SOUZA, C. T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192–4199, 2005.
- DEHGHANI, M. et al. A comparative study on the effects of acute and chronic downhill running vs uphill running exercise on the RNA levels of the skeletal muscles PGC1- α FNDC5 and the adipose UCP1 in BALB/c mice. **Gene**, v. 679, n. September, p. 369–376, 2018a.
- DEHGHANI, M. et al. A comparative study on the effects of acute and chronic

downhill running vs uphill running exercise on the RNA levels of the skeletal muscles PGC1- α FNDC5 and the adipose UCP1 in BALB/c mice. **Gene**, v. 679, p. 369–376, 2018b.

FERREIRA, F.; FERREIRA, R.; DUARTE, J. A. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 2007, n. 2, p. 257–275, 2007.

GUILHERME ET AL. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

HOOPER, P. L. et al. The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 4, p. 447–464, 2014.

ISLAM, H. et al. The impact of acute and chronic exercise on Nrf2 expression in relation to markers of mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 120, n. 1, p. 149–160, 2020.

JOSEPH, J. S.; AYELESO, A. O.; MUKWEVHO, E. Exercise increases hyper-acetylation of histones on the Cis-element of NRF-1 binding to the Mef2a promoter: Implications on type 2 diabetes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 486, n. 1, p. 83–87, 2017.

JUFVAS, Å. et al. Global differences in specific histone H3 methylation are associated with overweight and type 2 diabetes. **Clinical Epigenetics**, v. 5, n. 1, p. 2–7, 2013.

KARACHANAK-YANKOVA, S. et al. Epigenetic Alterations in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Balkan Journal of Medical Genetics**, v. 18, n. 2, p. 15–24, 2015.

KARLIĆ, R. et al. Histone modification levels are predictive for gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 7, p. 2926–2931, 2010.

KO, F. et al. Prevalence of nonrefractive visual impairment in US adults and associated risk factors, 1999-2002 and 2005-2008. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 308, n. 22, p. 2361–2368, 2012.

LIRA, V. A. et al. PGC-1 α regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 299, n. 2, 2010.

LOCHMANN, T. L. et al. Epigenetic modifications of the PGC-1 α promoter during exercise induced expression in mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.

LOCHMANOVÁ, G. et al. Different modes of action of genetic and chemical downregulation of histone deacetylases with respect to plant development and histone modifications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, 2019.

LUC, K. et al. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 70, n. 6, p. 809–824, 2019.

MAGALHÃES, H. R. et al. Placental hydroxymethylation vs methylation at the imprinting control region 2 on chromosome 11p15.5. **Brazilian Journal of Medical**

and Biological Research, v. 46, n. 11, p. 916–919, 2013.

MANABE, Y. et al. Increases in Skeletal Muscle Glycogen Content. **FEBS Journal**, v. 280, n. 3, p. 916–926, 2014.

MASUZAWA, R. et al. Muscle type-specific RNA polymerase II recruitment during PGC-1 α gene transcription after acute exercise in adult rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 125, n. 4, p. 1238–1245, 2018.

MCGEE, S. L. et al. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 24, p. 5951–5958, 2009.

MILAGRO, F. I. et al. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: Progresses and perspectives. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 782–812, 2013.

MOHER D, LIBERATI A, TETZLAFF J, ALTMAN DG, T. P. G. (2009). PRISMA 2009 Flow Diagram PRISMA 2009. **PLoS Medicine**, v. 6, p. 1–2, 2009.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 7, 2009.

MOREIRA, S. et al. Avaliação dos fatores relacionados à adesão de pacientes com Diabetes Mellitus ao tratamento. **Revista Eletrônica Graduação/pós-graduação em educação**, v. V.14, n. N.4, 2018.

OHSAWA, I. et al. Amount of daily exercise is an essential stimulation to alter the epigenome of skeletal muscle in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 125, n. 4, p. 1097–1104, 2018.

PARKER, L. et al. Exercise and glycemic control: Focus on redox homeostasis and redox-sensitive protein signaling. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. MAY, 2017.

PICCOLIS, M. et al. by Saturated Fatty Acids. v. 74, n. 1, p. 32–44, 2020.

PINTO, P. R. et al. Exercise training favorably modulates gene and protein expression that regulate arterial cholesterol content in CETP transgenic mice. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–11, 2018.

PRATTICIZZO, F. et al. Inflammageing and metaflammation: The yin and yang of type 2 diabetes. **Ageing Research Reviews**, v. 41, n. October 2017, p. 1–17, 2018.

RAHMAN, M. M. et al. Melatonin supplementation plus exercise behavior ameliorate insulin resistance, hypertension and fatigue in a rat model of type 2 diabetes mellitus. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 92, p. 606–614, 2017.

RINGHOLM, S. et al. Effect of lifelong resveratrol supplementation and exercise training on skeletal muscle oxidative capacity in aging mice; impact of PGC-1 α . **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 11, p. 1311–1318, 2013.

SAMJOO, I. A. et al. The effect of endurance exercise on both skeletal muscle and systemic oxidative stress in previously sedentary obese men. **Nutrition and Diabetes**, v. 3, n. SEPTEMBER, p. e88-10, 2013.

SANTOS, J. M. et al. Skeletal muscle pathways of contraction-enhanced glucose uptake. **International Journal of Sports Medicine**, v. 29, n. 10, p. 785–794, 2008.

SANTOS, J. M. et al. The effect of exercise on skeletal muscle glucose uptake in type 2 diabetes: An epigenetic perspective. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 12, p. 1619–1628, 2015a.

SANTOS, J. M. et al. The effect of exercise on skeletal muscle glucose uptake in type 2 diabetes: An epigenetic perspective. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 12, p. 1619–1628, 2015b.

SANTOS, J. M. et al. The role of mitochondrial DNA damage at skeletal muscle oxidative stress on the development of type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 449, n. 1–2, p. 251–255, 2018.

SBD. **Sociedade Brasileira de Diabetes**.

SCARPULLA, R. C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 611–638, 2008.

SCARPULLA, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. **Security Studies**, v. 2, n. 3–4, p. 343–356, 2012.

SØNDERGAARD, E. et al. Acute changes in lipoprotein subclasses during exercise. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 63, n. 1, p. 61–68, 2014.

STANFORD, K. I. et al. **Page 1 of 35 Diabetes**. [s.l: s.n.].

STEPTO, N. K. et al. Short-Term Intensified Cycle Training Alters Acute and Chronic Responses of PGC1 α and Cytochrome C Oxidase IV to Exercise in Human Skeletal Muscle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–11, 2012.

TEPERINO, R.; SCHOONJANS, K.; AUWERX, J. Europe PMC Funders Group Histone methyl-transferases and demethylases ; can they link metabolism and transcription ? v. 12, n. 4, p. 321–327, 2013.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

XU, D. QIU et al. The hypoglycemic mechanism of catalpol involves increased AMPK-mediated mitochondrial biogenesis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 6, p. 791–799, 2020.

ZHANG, Q.; LIANG, X.-C. Effects of Mitochondrial Dysfunction via AMPK/PGC-1 α Signal Pathway on Pathogenic Mechanism of Diabetic Peripheral Neuropathy and the Protective Effects of Chinese Medicine. n. 3332018037, p. 1–9, 2018.