

ANDERSON VULCZAK

**ANÁLISE DE METILAÇÃO DO GENE PRKAA2 (AMPK $\alpha_2$ ) EM GÊMEOS  
MONOZIGÓTICOS DISCORDANTES PARA APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, UNICENTRO.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Romano

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto Queiroga

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Carraro

Guarapuava  
2013

**TERMO DE APROVAÇÃO**

ANDERSON VULCZAK

**ANÁLISE DE METILAÇÃO DO GENE PRKAA2(AMPK $\alpha$ 2) EM GÊMEOS  
MONOZIGÓTICOS DISCORDANTES PARA APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA**

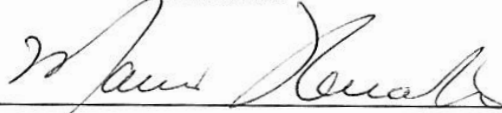
Dissertação aprovada em 02/04/2013 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



---

Prof. Dr. Marco Aurélio Romano- Orientador - UNICENTRO

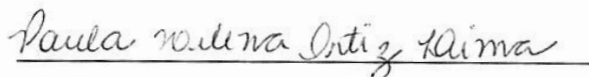
Presidente



---

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata- USP

Membro



---

Profa. Dra. Paula Helena Ortiz Lima- Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Membro

GUARAPUAVA-PR

2013

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, meu sustentáculo, em especial a minha MÃE e a meu PAI, pelo apoio incondicional, e por tudo que ainda fazem por mim. *“Quando eu crescer, quero ser igual a vocês”!*  
Muito obrigado!

## AGRADECIMENTOS

As conquistas que temos na vida não são solitárias, direta ou indiretamente, muitas pessoas colaboram para que alcancemos êxito em nossos objetivos. Infelizmente, aqui não há espaço para listar todos aqueles que de uma forma ou de outra tem colaborado com minhas conquistas. Assim, fica aqui o meu mais sincero e profundo agradecimento a todos, que de uma maneira ou de outra tem contribuído para com minhas realizações!

Em especial o agradecimento aos meus pais, Renilda e Nelson, por toda contribuição e confiança depositada, meu profundo Agradecimento e Gratidão!

Também à minha irmã Mônica!

À Paty, dentre outras coisas, pela paciência em me aturar, obrigado!

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto Queiroga, por seu apoio, conhecimento, experiência e competência, por ter me orientado para a efetivação dessa dissertação, e principalmente pela contribuição com meu crescimento profissional desde a graduação, o meu sincero agradecimento e a minha profunda Gratidão!

Aos professores, Dr. Marco Aurélio Romano pela oportunidade, apoio e contribuição com meu trabalho, e Emerson Carraro, pela contribuição e apoio, a minha gratidão.

Às crianças e adolescentes (gêmeos) e seus pais, por gentilmente terem participado deste estudo.

Ao prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata, à Dra. Paula Helena Ortiz de Lima, à MSc. Hui Tzu Lin Wang e à bióloga Jéssica Cassilla dos Santos, do Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia – LIMC, do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), por toda competência, apoio e acolhimento, a minha profunda gratidão.

Aos demais funcionários e estagiários do LIMC, pelo acolhimento e contribuição no período que estive no laboratório.

Aos professores da minha graduação em Educação Física e amigos da UNICENTRO, pelo conhecimento dividido e momentos agradáveis que compartilhamos. Um agradecimento especial ao Luizão, grande amigo, incentivador e companheiro de todos os momentos. O meu muito obrigado!

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Experimental e Atividade Física – LAFEAF.

Meu agradecimento também a todos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, professores e funcionários. Em especial à Prof. Dra. Rubiana Mainardes.

Também a prof. Dra. Marta Chagas Monteiro, pela sua colaboração com meu aprendizado, e principalmente incentivo, o meu muito obrigado!

Um lugar, seja ele qual for, só será bom e agradável se ali estiverem nossos amigos. O meu agradecimento aos membros da “*Dhirethorya*”, que apesar dos encontros cada vez mais escassos, a amizade permanece. Em especial aos amigos Alessandro (Sandro), Elvis, Alerson (Perna) e Sandro (Popy), o meu profundo agradecimento, por todos os momentos agradáveis que temos compartilhado.

Depois daquilo que hoje posso denominar de “um susto”, é emocionante estar VIVO, e ter a oportunidade de agradecer, ainda que de modo singelo, a tantas pessoas que fazem parte da minha vida, que de um modo ou de outro colaboraram com minhas conquistas, inclusive as que aqui não foram nominadas.

Por pouco este trabalho não parou na metade, por pouco a vida não parou, por pouco...

...estar vivo é uma oportunidade. Uma oportunidade de ver e admirar o mundo, admirar a vida, de interagir com ela, de compartilhar, de ajudar, de amar! Não há palavra capaz de descrever o valor incutido no ato de respirar, de ser capaz de mudar os passos, de **utilizar as mãos**, seja para segurar, *pipetar* ou acariciar, sobre tudo para fazer o bem.

É muito bom sentir o coração pulsando, nossa...!!!

Sentir a VIDA, sem dúvida é uma Dádiva, um Dom, e agradeço a DEUS por isso!

**Por estar VIVO!**

*“Nenhum homem realmente produtivo pensa  
como se estivesse escrevendo uma dissertação”.*

*Albert Einstein*

## ANÁLISE DE METILAÇÃO DO GENE PRKAA2 (AMPK $\alpha_2$ ) EM GÊMEOS MONOZIGÓTICOS DISCORDANTES PARA APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA

### RESUMO

A aptidão cardiorrespiratória ( $VO_2$ máx) baixa tem sido associada a distúrbios moleculares e bioquímicos que influenciam o metabolismo da glicose e perfil lipídico. Entretanto, não está claro se esta associação é confundida por fatores genéticos. O modelo de caso controle (gêmeos monozigóticos (MZ) discordantes) utilizado neste estudo, de caráter transversal, avaliou 09 pares de gêmeos MZ com idade de  $13,9 \pm 2,2$  anos, os quais demonstraram diferença intrapar para o  $VO_2$ máx de 16,9% a 41,6% ( $10,4$  a  $22,5$   $ml.kg^{-1}.min^{-1}$ ). Após verificada a diferença na aptidão cardiorrespiratória entre os irmãos, aquele com maior valor de  $VO_2$ máx integrou o grupo GÊMEO-1, e conseqüentemente o seu co-irmão, fez parte do grupo GÊMEO-2. O objetivo foi investigar o impacto da discordância no  $VO_2$ máx na metilação de DNA do gene PRKAA2 (AMPK $\alpha_2$ ) e sua relação com o metabolismo da glicose e perfil lipídico independente da influência do genoma. Foram obtidas as medidas antropométricas de massa corporal, estatura e circunferência da cintura. Um teste de esforço máximo em esteira rolante com análise direta dos gases foi utilizado para a determinação do  $VO_2$ máx e o sangue em jejum e pós-carga de glicose (TOTG) foi coletado para a realização de exames laboratoriais, e cálculo do índice HOMA-IR e HOMA- $\beta$ , perfil lipídico, além da extração do DNA genômico para análise de metilação. Resultados não revelaram diferenças entre o grupo de gêmeos com maior (GÊMEO-1) e menor (GÊMEO-2)  $VO_2$ máx nas variáveis antropométricas, índice HOMA-IR e HOMA- $\beta$ , perfil lipídico e perfil de metilação do gene PRKAA2. Contudo, foi observada uma menor concentração sanguínea de glicose em jejum no GÊMEO-1 em comparação ao GÊMEO-2. Ainda, foi possível observar que no grupo GÊMEO-1, existiu uma relação negativa entre metilação do gene PRKAA2 e HDL-C, enquanto que no grupo GÊMEO-2 a relação foi positiva entre metilação e CT e LDL-C. Quando fatores genéticos são controlados, crianças e adolescentes com menor  $VO_2$ máx são suscetíveis a apresentar maior concentração de glicose em jejum. A metilação do gene PRKAA2 parece estar relacionada positivamente com CT e LDL-C. Não obstante, este estudo evidencia que um aumento no  $VO_2$ máx pode exercer efeitos determinantes no metabolismo de glicose de crianças e adolescentes.

Palavras-chave: Metilação; Gêmeos; Caso-controle;  $VO_2$ máx; Metabolismo; AMPK; PRKAA2.

## **GENE METHYLATION ANALYSIS PRKAA2 (AMPK $\alpha$ 2) IN MONOZYGOTIC TWINS DISCORDANT FOR CARDIORESPIRATORY FITNESS**

### **ABSTRACT**

The low cardiorespiratory fitness (VO<sub>2</sub>máx) has been associated with molecular and biochemical disturbances that influence the glucose metabolism and lipid profile. However, it is unclear whether this association is confounded by genetic factors. The case-control model (monozygotic twins (MZ) discordant) used in this study, cross-sectional, evaluated 09 pairs of MZ twins aged 13,9±2,2 years, which showed intra-pair difference for the VO<sub>2</sub>máx of 16,9% to 41,6% (from 10,4 to 22,5 ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>). Once verified the difference in cardiorespiratory fitness between the brothers, that with the highest VO<sub>2</sub>max integrated the group TWIN-1, and consequently its co-twin, was part of the group TWIN-2. The objective was to investigate the impact of disagreement in the VO<sub>2</sub>máx in the PRKAA2 (AMPK $\alpha$ 2) gene methylation its relationship to with the glucose metabolism and lipid profile, independent of genomic effects. We obtained anthropometric measurements of weight, height, waist circumference, and skinfold thickness. A maximal exercise test on a treadmill with direct analysis of gases was used for determination of VO<sub>2</sub>máx and blood fasting and post-glucose load (OGTT) was collected for laboratory tests, and estimation of HOMA-IR and HOMA- $\beta$ , lipid profile, besides the extraction of genomic DNA for methylation analysis. The results revealed no differences between the twins with higher (TWIN 1) and lower (TWIN 2) VO<sub>2</sub>máx in anthropometric variables, HOMA-IR and HOMA- $\beta$ , lipid profile, and gene methylation PRKAA2. However, we observed a low fasting blood glucose concentration in TWIN-1 compared to TWIN-2. Still, it was observed that the group TWIN-1, there was a negative relationship between methylation and gene PRKAA2 HDL-C, whereas in the group TWIN-2 was positive relationship between methylation and total cholesterol and LDL-C. In conclusion, when genetic factors are controlled, children and adolescents with low VO<sub>2</sub>máx are likely to have higher fasting glucose concentration. Methylation of PRKAA2 gene appears to be positively related to TC and LDL-C. This study is evidence that an increase in VO<sub>2</sub>max can have determining effects on glucose metabolism in children and adolescents.

Keywords: Methylation; Twins; Case-control; VO<sub>2</sub>máx; Metabolism; AMPK; PRKAA2.



## Lista de Figuras

Figura 1 – Vias de sinalização da AMPK	22
Figura 2 – Interação da AMPK e GLUT-4	23
Figura 3 - Regulação do metabolismo lipídico via AMPK	24
Figura 4 – Mecanismo de metilação do DNA	28
Figura 5 – Exemplo de resultado da análise de metilação de DNA, gene PRKAA2	41
Figura 6 – Perfil de metilação do gene PRKAA2	44

## Lista de Quadros

Quadro 1 – Classificação quanto ao nível de aptidão cardiorrespiratória em crianças e adolescentes do sexo feminino	19
Quadro 2 – Classificação quanto ao nível de aptidão cardiorrespiratória em crianças e adolescentes do sexo masculino	19

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Valores da quantificação do DNA extraído (ng/μL)	38
Tabela 2 – Programação termociclador para tratamento com bissulfito	39
Tabela 3 – Programação termociclador para amplificação do DNA tratado com bissulfito	40
Tabela 4 – Idade, características físicas e VO <sub>2</sub> máx (9 pares de gêmeos)	42
Tabela 5 – Características bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose e perfil lipídico	43
Tabela 6 – Perfil de metilação do gene PRKAA2	43
Tabela 7 – Relação entre VO <sub>2</sub> máx, metilação do gene PRKAA2 e características físicas para o grupo de gêmeos com maior aptidão cardiorrespiratória – GÊMEO 1	44
Tabela 8 – Relação entre VO <sub>2</sub> máx, metilação do gene PRKAA2 e características físicas para o grupo de gêmeos com menor aptidão cardiorrespiratória – GÊMEO 2	45
Tabela 9 – Relação entre VO <sub>2</sub> máx, metilação do gene PRKAA2 e variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose para o grupo de gêmeos com maior aptidão cardiorrespiratória – GÊMEO 1	45
Tabela 10 – Relação entre VO <sub>2</sub> máx, metilação do gene PRKAA2 e variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose para o grupo de gêmeos com menor aptidão cardiorrespiratória – GÊMEO 2	46
Tabela 11 – Relação entre VO <sub>2</sub> máx, metilação do gene PRKAA2 e perfil lipídico para o grupo de gêmeos com maior aptidão cardiorrespiratória – GEMEO 1	46
Tabela 12 – Relação entre VO <sub>2</sub> máx, metilação do gene PRKAA2 e perfil lipídico para o grupo de gêmeos com menor aptidão cardiorrespiratória – GEMEO 2	47

## Lista de Abreviações e Símbolos

- AMPK – Proteína quinase ativada por AMP
- AMPK $\alpha_1$  – Subunidade alfa 1 da proteína quinase ativada por AMP
- AMPK $\alpha_2$  – Subunidade alfa 2 da proteína quinase ativada por AMP
- AMP – Adenosina monofosfato
- ATP – Trifosfato de adenosina
- ADP – Difosfato de adenosina
- AB – Dobra cutânea abdominal
- AF – Atividade física
- AKT – Proteína quinase B ou PKB
- CC – Circunferência da Cintura
- CX – Dobra cutânea da coxa
- CpG – Ilha CpG
- CG – Citosina-Guanina
- CT – Colesterol Total
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DZ – Gêmeo Dizigótico
- DNMT – DNA metiltransferases
- dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* ou Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- FC – Frequência cardíaca
- GÊMEO-1 – Gêmeo com maior aptidão cardiorrespiratória em relação ao seu irmão.
- GÊMEO-2 – Gêmeo com menor aptidão cardiorrespiratória em relação ao seu irmão.
- GLUT 1 – *Glucose transporter* ou Transportador de glicose do tipo 1
- GLUT 4 – *Glucose transporter* ou Transportador de glicose do tipo 4
- HDL-C – *High density lipoprotein cholesterol*
- HOMA-IR – *Homeostatic Model Assessment Method for Insulin Resistance*
- HOMA- $\beta$  – *Homeostatic Model Assessment Method for Insulin Secretion*
- IMC – Índice de massa corporal
- miRNA – Micro RNA
- Kg/m<sup>2</sup> – Quilogramas por metro quadrado
- L/min – Litros por minuto

- LDL-C - *Low density lipoprotein cholesterol*
- MC – Massa corporal
- MBD – Domínio de Ligação Metil CpG
- MeCP2 – Methyl CpG binding protein 2
- mL - Microlitro
- $\mu\text{L}$  – Microlitros
- $\mu\text{U}/\text{mL}$  – Microunidades por microlitro
- $\text{ml}/\text{Kg}/\text{min}$  ou  $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  – Mililitros de oxigênio consumidos por quilo de peso corporal por minuto
- $\text{mmol}/\text{L}$  – milimoles por litro
- MZ – Gêmeo Monozigótico
- $\text{ng}/\text{dL}$  – Nanogramas por decilitro
- pb – Pares de base
- PI3 - *Phosphatidylinositol 3*
- PCr/Cr – Proporção fosfocreatina/creatina
- PCR – *Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia de Polimerase
- PM – Dobra cutânea da perna
- PRKAA2 - Gene AMPK subunidade alfa 2
- QR – Taxa de troca respiratória
- SAM – S-adenosil-L-Metionina
- STR – Short Tandem Repeat ou Sequencias Curtas Repetidas em Tandem
- SB – Dobra cutânea subescapular
- SI – Dobra cutânea suprailíaca
- RNA – Ácido Ribonucleico
- RI – Resistência à Insulina
- rpm – Revoluções por minuto
- TR – Dobra cutânea tricipital
- TEF – Teste de esforço físico
- TG - Triglicérides
- TOTG – Teste Oral de Tolerância à Glicose
- $\text{VO}_2\text{máx}$  - Volume (Consumo) Máximo de Oxigênio
- VE – Volume minuto

- VO<sub>2</sub> – Consumo de oxigênio
- VCO<sub>2</sub> – Produção de dióxido de carbono
- 5-MeC – 5-metilcitosina
- $\alpha$  – Alfa
- $\beta$  – Beta
- $\gamma$  – Gamma
- ♀ - Sexo Feminino
- ♂ - Sexo Masculino

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
EPÍGRAFE	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS – QUADROS – TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>18</b>
3.1 Aptidão Cardiorrespiratória em Crianças e Adolescentes	18
3.2 Exercício Físico e Genética	20
3.3 AMPK e Homeostase Metabólica	22
3.4 Epigenética e metilação do DNA	27
3.5 Importância do estudo com gêmeos monozigóticos	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
4.1 Participantes	34
4.1.1 Medidas Antropométricas	35
4.1.2 Aptidão Cardiorrespiratória	35
4.1.3 Amostras Biológicas	36
4.1.4 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)	36
4.2 Determinação de Parâmetros Laboratoriais	36
4.3 Análise de Metilação do DNA	37
4.3.1 Extração do DNA	37
4.3.2 Quantificação do DNA	38
4.3.3 Tratamento com Bissulfito	38
4.3.4 Amplificação DNA tratado com bissulfito	39
4.3.5 Pirosequenciamento	40
4.4 Tratamento dos dados e análise estatística	41
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
5.1 Descrição da Amostra	42
5.2 Relação entre VO <sub>2</sub> máx, metilação do gene PRKAA2, características físicas e variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose e perfil lipídico	44
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
6.1 Comparação entre aptidão cardiorrespiratória, características físicas e variáveis bioquímicas entre o grupo GÊMEO 1 e GÊMEO 2	48
6.2 Análise do perfil de metilação do gene PRKAA2 com características físicas, aptidão cardiorrespiratória e variáveis bioquímicas entre o grupo GÊMEO 1 e GÊMEO 2	50
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>57</b>
ANEXO I. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	69
ANEXO II. Autorização para Utilização de Amostras Biológicas	70

## 1. INTRODUÇÃO

A prática regular de atividades físicas e uma maior aptidão cardiorrespiratória ( $VO_2máx$ ) são considerados fatores comportamentais/ambientais determinantes na manutenção da saúde. Nesse sentido, tem-se postulado que a maioria das doenças associadas à prática insuficiente de atividades físicas que se manifesta na vida adulta, tem início na infância e adolescência (PARSONS *et al.*, 1999). Além disso, a preocupação também abrange o fato de uma criança, com um determinado fator de risco, possa não apenas se tornar um adulto doente, mas sim que as complicações dos fatores de risco possam provocar o acometimento de doenças ainda na infância.

A maior aptidão cardiorrespiratória por sua vez, tem sido descrita como um fator fundamental para a longevidade, menor conteúdo de gordura corporal, melhor perfil lipídico e metabolismo de glicose, entre outras enormes vantagens (LAAKSONEN *et al.*, 2002). Porém, a adolescência é um período que ocorrem muitas mudanças estruturais, hormonais e bioquímicas dos sistemas fisiológicos (KELLY *et al.*, 2011), que por sua vez interferem no  $VO_2máx$  (TOURINHO; TOURINHO, 1998).

Nesse sentido, é necessário considerar que uma maior aptidão cardiorrespiratória ou alterações metabólicas podem estar mais relacionadas ao *background* genético do indivíduo do que com o seu envolvimento em atividades físicas. Em adição, o exercício físico é capaz de levar a alterações na expressão de genes postulados como importantes para o perfil lipídico e a regulação da homeostase da glicose, e o exercício físico pode aumentar a sensibilidade à insulina por meio de mecanismos largamente dependentes de uma modificação na atividade genômica.

As pesquisas envolvendo a análise da interação ou efeitos do exercício físico com aspectos genéticos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Contudo, o conhecimento a respeito do impacto/efeito do exercício físico sobre o genoma, as limitações ou realce do *background* genético no desempenho físico, ainda são preliminares.

Desse modo, o uso das ferramentas da biologia molecular para investigar os efeitos da atividade física, do desempenho físico e da aptidão cardiorrespiratória em outros fenótipos (características) é cada vez mais frequente. Informações apontam para o papel da aptidão cardiorrespiratória e da atividade física na expressão de genes em tecidos alvo, como músculo esquelético, músculo liso e tecido adiposo, que está associada a uma melhora na sensibilidade a insulina, no metabolismo de gorduras e de carboidratos (TERANGARCIA *et al.*, 2005).

Como todo fenótipo recebe influências tanto de fatores genéticos quanto ambientais, a falta de controle de um desses implica em se questionar se o resultado encontrado (efeito) é produto dos antecedentes genéticos ou das condições do ambiente. O único modelo de estudo com humanos que permite controlar um desses fatores, nesse caso o fator genético, é o estudo com gêmeos monozigóticos (MZ), denominado de caso controle. Em tese, como compartilham 100% de seus genes, toda a diferença (discordância) fenotípica entre gêmeos MZ é provocada por fatores ambientais (MUSTELIN *et al.*, 2008).

Nesse sentido, investigou-se o efeito da discordância para atividade física entre gêmeos MZ na composição corporal (SAMARAS *et al.*, 1998), produção de glicose hepática e secreção e ação da insulina (VAAG *et al.*, 1995; OPPERT *et al.*, 1995) independente do genoma. Mais recentemente, investigou-se o papel da aptidão cardiorrespiratória na expressão de genes em gêmeos (MZ) discordantes para consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx). O estudo revelou que, apesar da similaridade genética, o membro do par com maior  $VO_2$ máx apresentou significativamente maior transcrição do mRNA de genes relacionados ao metabolismo da glicose do que seu contrapartido menos apto (QUEIROGA, 2010). Outro estudo realizado com gêmeos MZ demonstrou que a obesidade e a baixa aptidão cardiorrespiratória provocam falhas na expressão de genes responsáveis pelo funcionamento das vias oxidativas mitocondriais do tecido adiposo (MUSTELIN *et al.*, 2008). Portanto, a aptidão cardiorrespiratória, enquanto fenótipo mostra-se como um importante fator ambiental capaz de provocar alterações de natureza molecular.

Embora venha se acumulando informações na literatura sobre o efeito de fatores ambientais, como atividade física e a aptidão cardiorrespiratória, ainda são raros os estudos que investigam quanto dessas alterações estão envolvidas diretamente com modificações no DNA (epigenética). A epigenética é definida como as alterações na expressão de genes que ocorrem sem mudanças na sequência de DNA (WOLFFE; GUSCHIN, 2000; EGGER *et al.*, 2004) e pode ser transmitido através de mitose ou da meiose (FLEISCH, *et al.*, 2012). Ainda, muitas das alterações epigenéticas são eventos precoces na perda da homeostase celular, podendo preceder alterações genéticas (ESTELLER, 2007).

Considerando que há evidências sugerindo que a prática de atividade física e uma maior aptidão cardiorrespiratória influenciam a expressão de genes independente de efeitos genéticos (BOOTH; NEUFER, 2005; GREENFIELD *et al.*, 2003; SAMARAS *et al.*, 1999; RÖNNEMAA *et al.*, 1997; QUEIROGA, 2010), não há conhecimento de estudos sobre efeitos ambientais (aptidão cardiorrespiratória) e genéticos na metilação do DNA. Desta forma, pretendemos verificar se uma melhor aptidão cardiorrespiratória é capaz de provocar

mudanças nas concentrações bioquímicas de glicose, insulina, perfil lipídico e na metilação de DNA do gene PRKAA2, independente da sequência genômica.

Para tanto, utilizamos o modelo de gêmeos MZ com a finalidade de determinar se o co-gêmeo com menor aptidão cardiorrespiratória apresenta diferenças nas variáveis investigadas em relação ao co-gêmeo com maior aptidão cardiorrespiratória.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Investigar o impacto da aptidão cardiorrespiratória na metilação do gene PRKAA2 de gêmeos monozigóticos.

#### **2.1.1 Específicos**

- Comparar as características físicas de gêmeos MZ discordantes para a aptidão cardiorrespiratória.
- Verificar a correlação entre aptidão cardiorrespiratória e metabolismo da glicose e lipídios;
- Verificar a correlação entre aptidão cardiorrespiratória e metilação do gene PRKAA2, relacionado ao metabolismo da glicose;
- Verificar a correlação entre aptidão cardiorrespiratória e metilação do gene PRKAA2, relacionado ao perfil lipídico;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Aptidão cardiorrespiratória em crianças e adolescentes

A aptidão ou resistência cardiorrespiratória é entendida como a capacidade de realizar exercícios físicos dinâmicos de intensidade moderada a alta, envolvendo a participação de grandes grupos musculares por período de tempo prolongado (ACSM, 2000), enquanto o consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx) é a mais alta captação de oxigênio que um indivíduo pode alcançar durante um trabalho físico respirando ar ao nível do mar (ASTRAND; RODAHL, 1987).

A capacidade aeróbia mensurada por meio do  $VO_2$ máx, é o melhor indicador da condição cardiovascular, sendo um importante parâmetro preditivo de morbidades associadas (ASTRAND *et al.*, 2006), e é dependente de componentes cardiovasculares, respiratórios, hematológicos e de mecanismos oxidativos do músculo em exercício (RODRIGUES *et al.*, 2006).

No que diz respeito à aptidão cardiorrespiratória em crianças e adolescentes, é importante salientar que este período é marcado pelo aumento progressivo do sistema cardiorrespiratório, com consequente aprimoramento do desempenho de resistência. Sendo assim, a aptidão aeróbia máxima aumenta conforme a criança cresce (ROWLAND, 2008).

Contudo, durante a adolescência – considerando a transição para a idade adulta - ocorrem muitas mudanças estruturais, hormonais e bioquímicas dos sistemas fisiológicos, que por sua vez interferem no  $VO_2$ máx (TOURINHO; TOURINHO, 1998). Em função dessas alterações fisiológicas e funcionais naturais é possível assumir que na infância uma redução no  $VO_2$ máx seria improvável, mesmo com pouca atividade física (QUEIROGA, 2010).

Em relação ao desenvolvimento da aptidão cardiorrespiratória, ocorre um aumento do  $VO_2$ máx em termos absolutos (L/min) ao longo da idade, com maior aceleração em meninos do que em meninas. Esse aumento está intimamente relacionado com o aumento da massa muscular, de forma que, ao considerar o  $VO_2$ máx corrigido por indicadores de massa muscular não será observado aumento com a idade em crianças e adolescentes do sexo masculino ( $VO_2$ máx/kg peso corporal permanece constante), enquanto ocorre um declínio progressivo em meninas ( $VO_2$ máx/kg peso corporal reduz com a idade).

Nesse sentido, enquanto a massa muscular média, como percentual da massa corporal nos meninos, aumenta de 42% aos 5 anos para 53% aos 17 anos, nas meninas, nenhuma mudança considerável é observada (41 e 42%, respectivamente) ao longo do mesmo período (ROWLAND, 2008).

Todavia, é necessário ponderar que os altos valores de  $VO_2$ máx em alguns indivíduos podem estar mais relacionados ao seu *background* genético, e não necessariamente ao seu envolvimento com atividades físicas. Não obstante, é importante considerar o  $VO_2$ máx sob o ponto de vista da interação entre fatores genéticos e ambientais, ou seja, genótipo e estilo de vida (mais ou menos ativo).

O nível de aptidão cardiorrespiratória é classificado de acordo com pontos de corte específicos para idade e sexo. Os padrões de referência usados para classificar a aptidão cardiorrespiratória de crianças e adolescentes de 12 a 19 anos são baseados em critérios do *FITNESSGRAM program* (CURETON; WARREN, 1990).

É importante ressaltar que a aptidão cardiovascular baixa é definida com um  $VO_2$ máx menor do que o 20º percentil e aptidão moderada com valores entre o 20º e 59º percentil, sendo considerado níveis altos (elevados) com valores iguais ou superiores ao 60º percentil (NCHS, 2004) (Quadro 1 e 2).

**Quadro 1 - Classificação quanto ao nível de aptidão cardiorrespiratória em crianças e adolescentes do sexo feminino**

Idade	Aptidão Cardiorrespiratória - $VO_2$ máx (ml/kg/min)		
	BAIXA	MODERADA	ALTA
♀			
<b>12</b>	< 37	37 a 45,99	> 46
<b>13</b>	< 36	36 a 44,99	≥ 45
<b>14</b>	< 35	35 a 43,99	> 44
<b>15 a 19</b>	< 35	35 a 42,99	≥ 43

Nota: Critérios do *FITNESSGRAM program* (CURETON; WARREN, 1990)

**Quadro 2 - Classificação quanto ao nível de aptidão cardiorrespiratória em crianças e adolescentes do sexo masculino**

IDADE	Aptidão Cardiorrespiratória - $VO_2$ máx (ml/kg/min)		
	Baixa	Moderada	Alta
♂			
<b>12 a 19</b>	< 42	42 a 51,99	> 52

Nota: Critérios do *FITNESSGRAM program* (CURETON; WARREN, 1990)

Considerando a influência da variação genética nos valores de  $VO_2$ máx, sob o ponto de vista de interações metabólicas, torna-se também importante considerar a influência genética no nível habitual de atividades físicas do indivíduo. O estudo de Bouchard *et al.* (1997) mostrou que fatores genéticos podem ser responsáveis por até 30% das diferenças individuais no nível de atividade física habitual.

A contribuição de fatores hereditários para vários componentes relacionados com a saúde varia entre 20 e 50% (BOUCHARD *et al.*, 1997; BOUCHARD; RANKINEN, 2001).

Nesse sentido, tem-se admitido que há grandes diferenças individuais na magnitude dos efeitos da atividade física regular sobre os componentes relacionados à aptidão física e a saúde, e que estas diferenças são fortemente influenciadas por fatores genéticos.

Independente da significativa influência que os fatores genéticos exercem sobre a variação da aptidão cardiorrespiratória ( $VO_2$ máx) há um consenso de que este é o componente da aptidão física relacionada à saúde mais importante. Evidências indicam que indivíduos com maior aptidão cardiorrespiratória possuem maior longevidade, mais disposição, menor conteúdo de gordura corporal, melhor perfil lipídico e metabolismo de glicose, entre outras enormes vantagens (LAAKSONEN *et al.*, 2002).

Corroborando, Lakka e Bouchard (2004) afirmam que a atividade física regular aumenta a sensibilidade das células à insulina, melhora o perfil de lipídios e lipoproteínas no sangue, reduz a pressão arterial e a adiposidade corporal, afeta favoravelmente fatores hemostáticos, melhora a função endotelial e pode reduzir a resposta inflamatória, diminui o risco de desenvolver doença cardíaca e, possivelmente, acidente vascular cerebral isquêmico e doença vascular periférica, alguns tipos de câncer, diminui também o risco de desenvolver osteoporose, síndrome metabólica e diabetes tipo 2, além de melhorar o controle metabólico de indivíduos com diabetes tipo 1 ou 2. Além disso, a atividade física ajuda manter a capacidade funcional e a vida independente na terceira idade. Também reduz sentimentos de depressão e ansiedade e promove o bem-estar psicológico e geral.

Enfim, a atividade física regular é um elemento chave de um estilo de vida saudável e o exercício físico regular melhora inúmeros componentes relacionados à saúde, reduzindo o risco do acometimento de várias doenças.

### **3.2 Exercício Físico e Genética**

As pesquisas envolvendo a análise da interação ou efeitos do exercício físico com aspectos genéticos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Contudo, o conhecimento a respeito do impacto/efeito do exercício físico sobre o genoma, as limitações ou realce do *background* genético no desempenho físico, ainda são preliminares.

Tem sido argumentado que o genoma humano evoluiu ao longo de um período quando altos níveis de atividade física eram fundamentais para a sobrevivência, o que sustenta a visão de que existe uma ligação entre o exercício e a regulação da expressão gênica (BOOTH *et al.*, 2002).

Estudos envolvendo o exercício físico e genética tem sido desenvolvidos sob a abordagem de um gene candidato, ou seja, um gene de importante potencial fisiológico e

relevância metabólica para a característica investigada. Considerando as evidências a partir de estudos de epidemiologia genética, sugerindo a existência de que componentes genéticos afetam os fenótipos relacionados ao exercício, pesquisas têm sido desenvolvidas baseadas na comparação de alelos e genótipos de marcadores genéticos entre grupos de indivíduos (MOOREN; VÖLKER, 2012), por exemplo, grupo com elevado  $VO_2$ máx e um grupo controle.

Os efeitos benéficos do exercício físico orientado são muitos, e em diversos fatores de risco para doenças crônicas. Entretanto, existem diferenças individuais na adaptação e resposta ao exercício. Não obstante, essa variabilidade individual é um fenômeno biológico normal, o qual pode refletir a diversidade genética (BOUCHARD; RANKINEN, 2001).

Um exemplo do papel da variação genética na determinação da eficácia de atividade física regular, é que o mesmo programa de exercícios e treinamento aplicado em homens jovens e saudáveis resultou em nenhuma mudança no  $VO_2$ máx entre alguns indivíduos, enquanto que em outros, o aumento no  $VO_2$ máx foi de até um litro por minuto (BOUCHARD *et al.*, 1999). Ainda, Bouchard *et al.* (1992) verificaram que em pares de gêmeos, a resposta de  $VO_2$ máx a programas de treinamento padronizados mostrou de seis a nove vezes mais variância inter-genótipos (dizigóticos) do que intra-genótipos (monozigóticos).

Em relação às pesquisas envolvendo genética e exercício físico, mais especificamente o  $VO_2$ máx, é importante considerar que a capacidade máxima de consumo de oxigênio é influenciada por outros fenótipos, como por exemplo, débito cardíaco, transporte de oxigênio e/ou capacidade oxidativa dos músculos. Talvez a influência de outros fenótipos e não apenas de um gene candidato seja uma das causas de até o momento os estudos não terem encontrado um gene principal pelo consumo de oxigênio. Para Mooren e Völker (2012), a adaptação aguda ou crônica ao exercício é dependente do nível de expressão de genes específicos, e ação integrada de múltiplos genes. Em uma análise genômica ampla para o consumo máximo de oxigênio, Bouchard *et al.* (2000) não encontraram nada além de sinais sugestivos para o  $VO_2$ máx em condição de sedentarismo em resposta ao treinamento, considerando *loci* de características quantitativas.

Por outro lado, dentro do campo de compreensão acerca das interações entre exercícios físicos e componentes genéticos, é importante compreender os mecanismos moleculares que contribuem para o desempenho físico, também é de fundamental importância compreender as condições que prejudicam ou causam intolerância ao exercício físico, e que certamente tem ligação com características genótípicas.

Em adição, o exercício físico é capaz de levar a alterações na expressão de genes postulados como importantes para a regulação da homeostase, e pode, por exemplo, aumentar a sensibilidade à insulina por meio de mecanismos largamente dependentes de uma modificação coordenada na expressão gênica (VAAG *et al.*, 1995; OPPERT *et al.*, 1995; TERANGARCIA *et al.*, 2005; MUSTELIN *et al.*, 2008). Nesse sentido, a compreensão dos efeitos do exercício físico sobre a homeostase é de fundamental importância não somente para o entendimento dos efeitos e vias metabólicas associadas ao exercício físico, como também na utilização deste como ferramenta preventiva e até mesmo profilática, considerando distúrbios metabólicos, como por exemplo, o diabetes melito.

### 3.3 AMPK e Homeostase Metabólica

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK), é uma proteína heterotrimérica, composta de uma subunidade catalítica ( $\alpha$ ) e duas subunidades não catalíticas ( $\beta$  e  $\gamma$ ), sendo duas isoformas da subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  e três isoformas de subunidades  $\gamma$  (WINDER, 2001). A atividade desta proteína pode aumentar em resposta a uma elevação na razão AMP/ATP e uma diminuição na taxa de PCr/Cr e em resposta à fosforilação das quinases AMPK (RUDERMAN *et al.*, 1999). Ainda, a AMPK é considerada um sensor do *status* de energia celular, uma espécie de “interruptor metabólico” (KAHN *et al.*, 2005; CANTÓ *et al.*, 2009)

Figura 1.

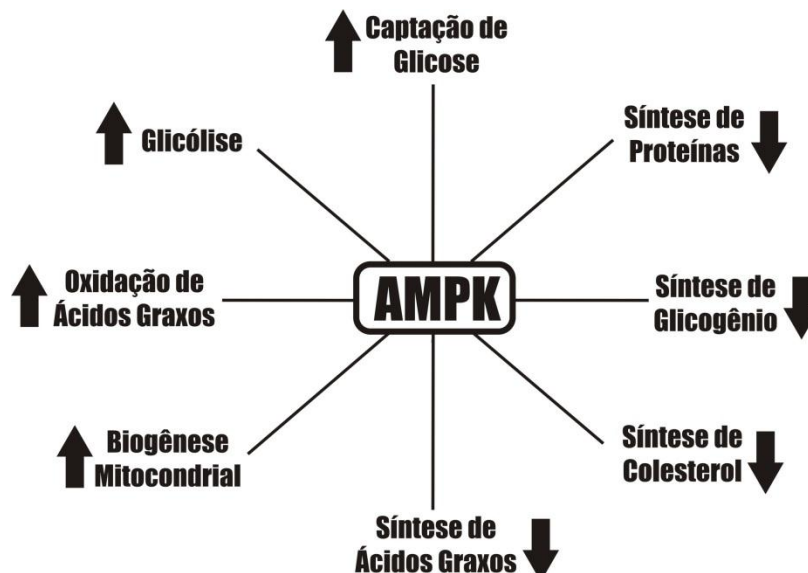


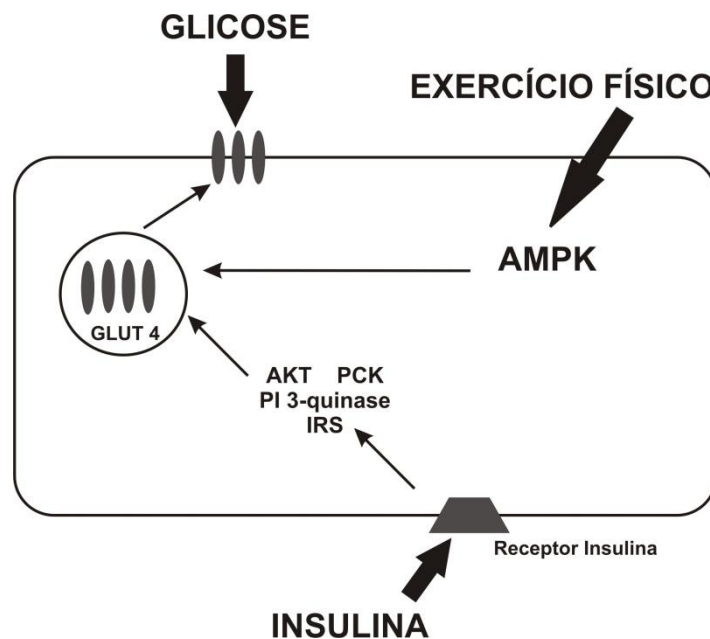
Figura 1 – Vias de sinalização da AMPK (Adaptado de Hardie, 2007)

Nota: O aumento na atividade da AMPK estimula a captação de glicose, a glicólise, aumento na oxidação de ácidos graxos e biogênese mitocondrial. Por outro lado, inibe a síntese de ácidos graxos, colesterol, glicogênio e também a síntese de proteínas.

A atividade tanto de AMPK $\alpha_1$  como de AMPK $\alpha_2$  aumentam em resposta ao exercício (CHEN *et al.*, 2000), e a atividade da AMPK $\alpha_1$  permanece em níveis de repouso após atividade contínua, prolongada de baixa intensidade (WOJTASZEWKI *et al.*, 2000) enquanto a atividade da AMPK  $\alpha_2$  é aumentada durante o exercício de intensidade moderada, com aumento na oxidação de ácidos graxos (STEPHENS *et al.*, 2002).

A AMPK é um candidato que pode mediar parte do efeito do exercício no metabolismo da glicose e lipídico. Para Hardie (2011), a ativação prolongada de AMPK causa adaptações crônicas com o exercício de *endurance*, como aumento na expressão de GLUT-4 e biogênese mitocondrial.

A AMPK foi identificada como uma das proteínas chave na sinalização da via mediada pela contração muscular para o transporte da glicose, tendo um aumento de sua atividade em resposta ao exercício físico, e tem-se correlacionado este fato com o aumento na translocação de GLUT-4 e transporte de glicose no músculo esquelético (BERGERON *et al.*, 2001; HAYASHI *et al.*, 1999; MERRILL *et al.*, 1997). A figura 2 mostra um exemplo simplificado desse mecanismo.



**Figura 2 - Interação da AMPK e GLUT-4** (Adaptado de Mooren & Völker, 2012)

Nota: Descrição esquemática da sinalização celular no músculo esquelético em resposta à insulina ou exercício físico. O transporte de glicose mediado por insulina acontece via receptor de insulina, seguido de ativação de uma cascata de quinases. Os efeitos do exercício físico na captação de glicose são independentes de insulina e parcialmente mediados pela via da AMPK. Ambas as vias liberam transportadores de glicose (GLUT 4) de vesículas para a membrana celular, e a glicose é então captada.

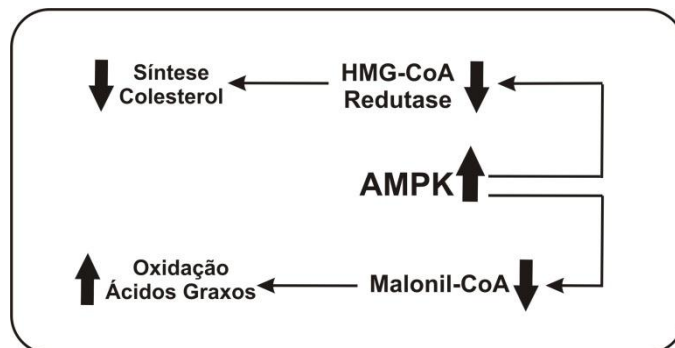
Para o músculo esquelético o transporte de glicose ocorre por meio de um mecanismo de transporte passivo que não requer ATP, é saturável, e este processo é mediado por

proteínas transportadoras de glicose (GLUT – do inglês: *glucose transporter*), sendo que duas isoformas atuam em nível muscular, o GLUT1 e GLUT4 (DOUEN *et al.*, 1990).

A ligação da insulina ao seu receptor específico nas células induz a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática, envolvendo um aumento da exocitose de vesículas contendo este transportador e conseqüentemente um aumento na absorção de glicose nos tecidos alvos. Quando o estímulo da insulina é finalizado, o GLUT-4 é rapidamente internalizado por endocitose, e redirecionado a compartimentos intracelulares de armazenamento (KANZAKI, 2006; WATSON; PESSIN, 2001).

De acordo com Lund *et al.* (1995), considerando o aumento na captação de glicose após uma sessão de exercícios, a captação de glicose mediada pelo exercício ocorre por meio de uma translocação de GLUT-4 para a membrana da célula, pouco conhecida e independente de insulina. Para Holloszy (2003) o exercício é um estímulo potente para a captação de glicose pelo músculo esquelético, sendo que, tanto o transporte de glicose estimulado por insulina como por exercício são mediados pela translocação dos transportadores de glicose dos sítios de estocagem intracelular para a superfície da membrana (RICHTER *et al.*, 2001; HOLLOSZY, 2003).

A AMPK também está relacionada ao metabolismo lipídico, com ativação via exercício físico, com aumento na oxidação de ácidos graxos (ASCHENBACH *et al.*, 2004; STEPHENS *et al.*, 2002). Os estoques de glicose representam uma fonte finita de ATP, particularmente em estados de exercício ou jejum, enquanto os estoques de gordura endógena são recrutados para a produção de energia, por meio da oxidação lipídica, sendo uma fonte três vezes maior de ATP quando comparada aos carboidratos (OSLER; ZIERATH, 2008). A figura 3 mostra um exemplo simplificado desse mecanismo.



**Figura 3 – Regulação do metabolismo lipídico via AMPK** (Adaptado de Viollet *et al.*, 2006)

Nota: A ativação da AMPK leva à inibição da síntese de colesterol em função da inativação de HMG-CoA redutase. Da mesma forma, a inibição de malonil-CoA com o aumento da atividade da AMPK aumenta a oxidação de ácidos.



Portanto, a AMPK responde ao esgotamento dos estoques de energia, PCr/Cr e ATP, provocando à oxidação lipídica, onde o músculo pode adquirir uma persistente e potencialmente fonte de energia (WINDER; HARDIE, 1996; LONG *et al.*, 2005).

De acordo com Winder *et al.* (1997), a AMPK inativa a enzima que catalisa a conversão de acetil-CoA para malonil-CoA, reduzindo então a síntese de malonil-CoA. Possivelmente por ativação da malonil-CoA descarboxilase, a enzima que catalisa a descarboxilação de malonil-CoA em acetil-CoA (PARK *et al.*, 2002; SAHA *et al.*, 2000). Conseqüentemente, a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e fígado são aumentados. Isto acontece em função da malonil-CoA inibir a carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT-1), uma enzima limitante na absorção de ácidos graxos para a mitocôndria e posterior  $\beta$ -oxidação e produção de ATP via ciclo de krebs (McGARRY; BROWN, 1997).

No entanto, a malonil-CoA não é exclusivamente a responsável pela regulação de toda a oxidação lipídica que ocorre e outros fatores podem também ter influência na oxidação de ácidos graxos, como por exemplo, concentração de ácidos graxos (LONG; ZIERATH, 2006), disponibilidade de carnitina (KIENS, 2006), e disponibilidade de CoA na matriz mitocondrial (RUBINIK; WINDER, 2005). Nesse sentido, alguns autores (KAHN *et al.*, 2005; HARDIE, 2007; SPENCER-JONES *et al.*, 2006) tem investigado e relacionado a atividade e relação da AMPK com perfil lipídico, mostrando que além de promover a oxidação de ácidos graxos, a síntese de colesterol também parece ser inibida.

Portanto, os transportadores de glicose e a cascata de sinalização insulínica, intermediários da via de oxidação de ácidos graxos e atividade da AMPK, podem ser o passo inicial da sinalização conectando as respostas metabólicas do exercício físico à homeostase da glicose e perfil lipídico.

Contudo, grande parte das pesquisas que trabalham na tentativa de melhorar o entendimento destas vias utilizam animais, seres humanos em idade adulta, ou então atletas, e, certamente mais desafiador ainda é o entendimento dessas vias sob a influência do exercício físico ou aptidão cardiorrespiratória em crianças e adolescentes, devido às particularidades metabólicas nesta faixa etária, postulada muitas vezes como sendo influenciada pelo estágio maturacional.

Atualmente o entendimento da cascata de sinalização celular gerada pelos receptores associados a enzimas tirosina quinase, como por exemplo, o receptor de insulina, tem despertado grande interesse científico, devido ao importante papel que estes receptores desempenham na embriogênese, sobrevivência, diferenciação e proliferação celular, apoptose e metabolismo da glicose (BERTI, 2010). Por sua vez, disfunções na sinalização destes

receptores levam ao desenvolvimento de doenças severas em humanos, como câncer, síndromes inflamatórias crônicas e diabetes (GRAY *et al.*, 2003; HUNTER, 2000; KHOLODENKO, 2006; SCHLESSINGER, 2000). Sendo que o diabetes está associado a um aumento na adiposidade, resistência à insulina (BOYKE *et al.*, 2000), e a incapacidade subsequente das células  $\beta$  pancreáticas compensarem adequadamente esta resistência à insulina (KHAN, 2001).

Em crianças, esse processo é susceptível de ser semelhante, mas pode ser exacerbado, pelo rápido aumento na adiposidade durante o período da adolescência e resistência à insulina transitória que aparece durante a puberdade (CAPRIO *et al.*, 1996; GORAN; GOWER, 2001) e no aumento dos hormônios sexuais, em relação ao seu período pré-púbere e pós-púbere (AMIEL *et al.*, 1986).

A transição da puberdade é um tempo durante o qual mudanças rápidas e dinâmicas ocorrem em vários sistemas metabólicos, hormonais, incluindo mudanças na gordura corporal e na sua distribuição, assim como a aumentada resistência à insulina (KELLY *et al.*, 2011). A sensibilidade à insulina parece ser maior antes do início da puberdade e atinge o seu ponto mais baixo no meio do caminho até a maturação, aproximando-se os níveis próximos da pré-puberdade no final de maturação (GORAN; GOWER, 2001; CAPRIO *et al.*, 1989). Em crianças caucasianas, a secreção de insulina é aumentada para compensar esta diminuição transitória da sensibilidade à insulina durante a adolescência (CAPRIO *et al.*, 1989).

A adiposidade e os riscos associados de diabetes também têm sido relacionado aos hormônios sexuais que poderiam explicar as diferenças sexuais no metabolismo de doenças (KELLY *et al.*, 2011), associação esta particularmente importante quando crianças e adolescentes são avaliados.

Em uma análise de corte transversal, considerando os efeitos da puberdade em crianças latinas com excesso de peso, não foi verificado diferenças na sensibilidade à insulina, ou função de células  $\beta$  em diferentes fases de maturação (BALL *et al.*, 2005). Curiosamente, indivíduos com maturação mais precoce mostraram um aumento compensatório na resposta de insulina aguda (ou seja, uma compensação adequada pelas células  $\beta$ ), enquanto sujeitos nos últimos estágios de maturação apresentaram uma reduzida compensação (KELLY *et al.*, 2011).

Nesse sentido, é necessário ponderar que diferenças no metabolismo da glicose e perfil lipídico em crianças e adolescentes podem estar relacionadas não apenas com o *background* genético, ou estágio maturacional, mas também relacionados às diferenças na composição corporal, principalmente devido aos hábitos diários. Portanto, é importante considerar também

o estilo de vida (mais ou menos ativo) dos indivíduos analisados, uma vez que tem sido postulado benefícios na regulação do metabolismo da glicose mediado pela prática regular de atividades e exercícios físicos (HUOT *et al.*, 2011; HENDERSON *et al.*, 2012).

Não obstante, tem sido observado um número crescente de doenças genéticas, que por sua vez afetam o metabolismo da saciedade ou energético, como por exemplo, a síndrome de resistência à insulina associada à obesidade, dislipidemia, aterosclerose, hipertensão, e diabetes mellitus tipo 2, sendo que estas tem impacto direto na qualidade de vida e conseqüentemente na longevidade. Logo, o entendimento de mecanismos genéticos e metabólicos ligados a distúrbios ou a propensão a estes é de suma importância para ações relacionadas à saúde.

### **3.4 Epigenética e metilação do DNA**

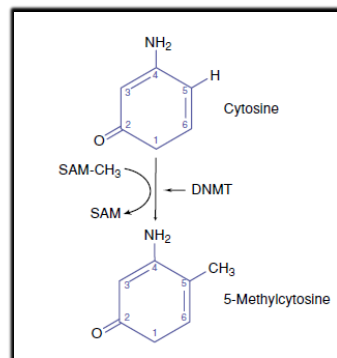
O termo epigenética é utilizado para definir a herança dos padrões de expressão gênica, sejam elas mitóticas ou meióticas, que não são determinados pelas mudanças na sequência do DNA (EGGER *et al.*, 2004; FLEISCH, *et al.*, 2012; WOLFFE; GUSCHIN, 2000). É considerado um processo herdável, por ser transmitido de forma estável após sucessivos ciclos de divisão celular, e reversível, por não alterar a sequência do DNA. Entretanto, a modificação do DNA não é o único objeto de estudo da epigenética, uma vez que as histonas também podem sofrer modificações, como por exemplo, metilação, fosforilação e acetilação (LEADER *et al.*, 2006).

Os principais mecanismos epigenéticos incluem a metilação do DNA, as modificações covalentes pós-traducionais das histonas e o silenciamento mediado por micro RNA's. Estes diferentes mecanismos estão intimamente ligados e, muitas vezes, agem conjuntamente como uma forma de regular os diferentes processos celulares (VAISSIÈRE *et al.*, 2008).

Ainda na década de 1970, Riggs (1975) e Holliday e Pugh (1975) sugeriram que a metilação da molécula de DNA poderia ter fortes efeitos na expressão gênica, e as alterações no padrão de metilação do DNA poderiam explicar como genes estão “ligados” ou “desligados” em diferentes tipos celulares e como o sistema “liga-desliga” dos genes ocorre durante o desenvolvimento.

Assim, a metilação do DNA é a modificação epigenética mais estudada e melhor caracterizada até o momento atuando de forma indispensável no silenciamento e regulação gênica, especialmente no *imprinting* genômico, na inativação do cromossomo X e no silenciamento de transposons (BIRD, 2002).

A metilação consiste na adição covalente de um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) no carbono 5 da citosina seguida por uma guanina no dinucleotídeo CpG (VASSIÈRE *et al.*, 2008; HANDEL *et al.*, 2010), formando então a 5-metilcitosina (5-MeC) (Figura 1). Aproximadamente 60-70% dos sítios CpG estão metilados no genoma de mamíferos. Isto inclui diversos tipos de sequências: genes de cópia única, sequências intergênicas, assim como elementos repetitivos. As exceções compreendem regiões caracterizadas por alta densidade de CpG, denominadas ilhas CpG, e que estão localizadas principalmente nos promotores e exóons de genes *housekeeping* (ROTTACH *et al.*, 2009).



**FIGURA 4 – Mecanismo de Metilação do DNA**

Nota: Adaptado de Strathdee & Brown (2002)

Como a metilação do DNA é uma modificação química reversível das bases da molécula do DNA, a manutenção e a precisa transmissão dos padrões de metilação para as células filhas são processos essenciais durante o ciclo celular. As enzimas responsáveis pela metilação do DNA nos dinucleotídeos CpG são membros de uma família de proteínas chamadas DNA metiltransferases (DNMT). Estas enzimas estabelecem e mantêm os padrões de metilação do genoma e utilizam a S-adenosil-L-metionina (SAM) como doador de grupos metil (ESPADA; ESTELLER, 2010). Ainda, os doadores de radical metil são obtidos pela dieta e são principalmente a metionina, seguido do folato, colina e vitamina B12 (WATERLAND; JIRTLE, 2003; WATERLAND, 2006; ZEISEL, 2009).

Foram identificados cinco membros da família das DNA metiltransferases em mamíferos: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L, sendo que a primeira (DNMT1) é a mais abundante em células somáticas, e tem forte preferência por DNA hemimetilado, portanto, atuando na forquilha de replicação durante a fase S do ciclo celular.

Presume-se que a DNMT1 é a principal enzima responsável pela cópia e manutenção dos padrões de metilação do DNA durante a replicação. Enquanto que a DNMT3A e 3B são expressas principalmente em células embrionárias e não diferenciadas. São críticas durante o

desenvolvimento embrionário quando ocorrem eventos sequenciais de metilação *de novo* no genoma. As duas são assim conhecidas como DNMTs *de novo*.

Entretanto, alguns relatos indicam que DNMT1 assim como DNMT3A e 3B podem ter ambas as funções de manutenção e *de novo in vivo*, cooperando para a geração de um padrão global de metilação. A DNMT2 e 3L não contêm domínios regulatórios compartilhados pelas outras enzimas, assim possuem atividade de metiltransferase muito baixa (BESTOR, 2000; ESPADA; ESTELLER, 2010).

Outro grupo de enzimas é responsável pela desmetilação do DNA. O processo denominado de desmetilação ativa, envolve as demetilases e parece ser necessário para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em respostas a perturbações ambientais. A desmetilação pode ainda ser passiva, quando não há envolvimento de demetilases, e ocorre quando a manutenção pelas metiltransferases é inativa durante o ciclo celular (ZHU, 2009). Assim, o nível e padrão de 5-MeC são determinados por ambos os processos, metilação e desmetilação, e as enzimas envolvidas nesses processos devem estar altamente reguladas.

Embora esteja bem estabelecido que a consequência predominante da metilação seja a repressão da transcrição, ainda não está claro se a inibição ocorre direta ou indiretamente. A inibição direta da transcrição pode ocorrer através do bloqueio da ligação dos fatores de transcrição ao promotor contendo CpG metilado. Já a repressão indireta pode envolver proteínas como MeCP2 (*methyl CpG binding protein 2*) que especificamente se ligam ao DNA metilado através de um domínio de ligação a metil-CpG (MBD). Proteínas contendo este domínio MBD mediam a repressão da transcrição recrutando desacetilases de histonas, resultando em uma estrutura repressiva da cromatina (BIRD, 2002).

A alteração dos padrões de metilação é frequentemente relatada em muitas doenças humanas, incluindo principalmente o câncer. A hipometilação global do DNA e a hipermetilação de promotores são comumente observadas em tumores em estágio inicial. Isto sugere que as alterações epigenéticas são eventos precoces na perda da homeostase celular, podendo preceder alterações genéticas (ESTELLER, 2007).

Atualmente, são comuns as pesquisas envolvendo a metilação de DNA estarem focadas no estudo de genes relacionados ao desenvolvimento de câncer. Contudo, é crescente o interesse, e número de pesquisas com estudos envolvendo metilação de DNA e doenças inflamatórias, fatores de envelhecimento, e, sobretudo, questões de regulação do metabolismo e consequentemente as interações com o exercício físico, tanto do ponto de vista da *performance* esportiva, quanto relacionado à saúde.

### 3.5 Importância do estudo com gêmeos monozigóticos

A realização de estudos utilizando gêmeos passou a ser significativa em diversas ciências, contribuindo para identificar a magnitude das diferenças entre os pares de gêmeos de um óvulo, ou monozigóticos (MZ) e de dois óvulos, ou dizigóticos (DZ), fornecendo uma estimativa da hereditariedade e da influência do ambiente num dado fenótipo. Na opinião de diversos pesquisadores, na espécie humana o estudo com gêmeos constitui-se no melhor exemplo de experiências naturais que permitem testar a importância relativa da genética e da formação, em determinados fenótipos (FERNANDES; MAIA, 2006; MacGREGOR *et al.*, 2000).

Por isso, os estudos com gêmeos agregam um grande valor científico tanto na área de biologia quanto na medicina. Desde que a zigosidade (MZ ou DZ) dos gêmeos seja conhecida, eles podem compor delineamentos de pesquisas em diferentes áreas. Os estudos com gêmeos MZ fornecem dados sob a perspectiva de controle dos efeitos de fatores ambientais por apresentarem estrutura genética idêntica, enquanto os DZ possibilitam estudar os efeitos de diferentes genótipos em um meio similar, uma vez que compartilham metade dos genes.

Corroborando, alguns autores (FERNANDES; MAIA, 2006; BEIGUELMAN, 2008) destacam que, a utilização de gêmeos para estimar a importância relativa dos genes e do ambiente na determinação de um fenótipo apoia-se em premissas que devem ser destacadas com base na literatura, como por exemplo: 1) os gêmeos compartilham, na fase pré-natal, o mesmo ambiente e por isso estão sujeitos às mesmas influências maternas relacionadas à idade, paridade, condições de saúde, poluição, dieta, cigarro e medicamentos; 2) os fatores ambientais (pós-natal) que agem sobre os gêmeos MZ, provocando diferenças intrapar, são os mesmos que atuam sobre os pares DZ; 3) o ambiente dos gêmeos é aparentemente igual ao ambiente de outros indivíduos da população; 4) os integrantes de cada par de gêmeos estão sujeitos aos mesmos efeitos ambientais, que interagindo com o genótipo produzem o fenótipo (neste caso mesmo efeito epigenético) e; 5) os gêmeos podem ser considerados uma amostra da população geral.

Nesse sentido, assume-se uma normalidade na distribuição de características entre os gêmeos e os outros indivíduos. Contudo, apesar de estas premissas fornecerem sustentação teórica para a utilização dos gêmeos em estudos científicos, estão também sujeitas a diversas críticas. Uma delas se baseia no fato da similaridade, pois como os gêmeos MZ são mais parecidos poderiam ser tratados de modo mais semelhante do que os DZ, principalmente na

infância. Isto certamente poderia contribuir para acentuar a variância entre os gêmeos MZ e DZ (QUEIROGA, 2010).

A maioria dos gêmeos MZ compartilham a mesma placenta (monocoriônico) isto pode resultar tanto na competição entre os gêmeos para um limitado suprimento de nutriente, como acarretar anastomoses vasculares graves (LOOS *et al.*, 2001; RAMOS-ARROYO *et al.*, 1988), enquanto os gêmeos dizigóticos não compartilham a mesma placenta (dicoriônico).

Portanto, a formação da estrutura embrionária pode influenciar a divisão de suprimentos no útero e contribuir para um ambiente muito adverso entre os gêmeos MZ e DZ. No entanto, os efeitos provocados pela estrutura embrionária na variância entre os gêmeos poderiam ser minimizados a partir do seguinte achado: como o nascimento dos pares DZ está sujeita a idade materna e que mães mais velhas possuem condições de gestação piores do que as mães mais jovens, que dão a luz mais frequentemente a MZ, supõe-se que o ambiente intrauterino, considerando a faixa etária, seja mais adverso para os DZ do que para os MZ (BEIGUELMAN, 2008).

Mesmo assumindo que os gêmeos MZ sejam mais concordantes do que o DZ, Guo (2001) não admite que todos os fenótipos concordantes sejam causados por fatores ambientais. Outra crítica, e talvez a mais importante, aborda fatores que atuam no ambiente intrauterino provocando menor desenvolvimento fetal, refletido no peso de nascimento, geralmente baixo em gêmeos.

O peso no nascimento é resultado do crescimento intrauterino, e um indicador importante do quadro de saúde do recém-nascido, porém, muitas variáveis podem influenciá-lo, por exemplo, o *status* nutricional da mãe e ganho de peso maternal durante a gestação (MALINA *et al.*, 2009). Estudos relatam uma associação inversa entre baixo peso de nascimento e aumento na incidência de hipertensão arterial, obesidade, dislipidemias, doenças coronárias e diabetes mellitus em adultos (BARKER, 1992; LANGLEY-EVANS; McMULLEN, 2010).

Consequentemente, a maior taxa de concordância para doenças observada em MZ poderia ser devido ao baixo peso de nascimento e não a presença de genes para doenças específicas (PHILLIPS, 1993). No entanto não há concordância em relação a essa declaração. Foi notado que o menor peso corporal de nascimento não foi preditor de pressão arterial e nem de tolerância à glicose em gêmeos (BAIRD *et al.*, 2001; WILLIAMS; POULTON, 1999). Por sua vez, Ross (1999) reconhece que os insultos fetais que causam malformação no peso e na estatura dos gêmeos, como cigarro e fornecimento de nutrientes, podem afetar qualquer tipo de gestação, não proibindo o uso de gêmeos em estudos desta natureza. Não

obstante, Malina *et al.*, (2009) alertam que recém nascidos com excesso de peso de nascimento também correm risco de desenvolvimento de doenças na idade adulta.

Apesar da discussão em relação às premissas empregadas para justificar o uso de gêmeos em estudos que investigam a importância do genótipo na determinação do fenótipo, elas são aceitas por uma grande parcela da comunidade científica (BOOMSMA *et al.*, 2002).

Existem diversas variações de modelos que utilizam gêmeos em estudos científicos. Em geral resumem-se em realizar comparações entre MZ e DZ (quantitativo e qualitativo) ou apenas empregar irmãos MZ's (estudo de caso controle). No entanto, após o clássico estudo de Bouchard *et al.* (1990) com gêmeos MZ, este modelo passou a ser mais explorado.

O modelo de estudo com gêmeos MZ é conhecido como modelo de caso-controle, ou clone-controle (PIETILÄINEN *et al.*, 2008). É considerada uma poderosa ferramenta para investigar a relação entre variáveis (fenótipos) de duas pessoas geneticamente idênticas (SAMARAS *et al.*, 1999; RÖNNEMAA *et al.*, 1997). Em uma amostra de pares de gêmeos MZ são selecionados apenas aqueles discordantes para uma determinada característica (ou outros fatores de risco). Este método foi usado para investigar o efeito da atividade física na composição corporal (SAMARAS *et al.*, 1998), no índice de amplificação na pressão arterial sistólica (GREENFIELD *et al.*, 2003), na produção de glicose hepática e na secreção e ação da insulina (VAAG *et al.*, 1995; OPPERT *et al.*, 1995)

A análise de caso-controle é considerada o único e bem estabelecido modelo pelo qual o efeito de fatores ambientais e físicos sobre uma característica pode ser quantificado independente de influências genéticas (SAMARAS *et al.*, 1999). Como os gêmeos MZ compartilham 100% de seus genes este modelo permite controlar os fatores genéticos potencialmente intervenientes (GREENFIELD *et al.*, 2003).

Nessa perspectiva, estima-se que qualquer diferença dentro dos pares de gêmeos para uma variável seja em função de fatores físicos e ambientais para os quais os pares de gêmeos são discordantes.

Os estudos com gêmeos MZ comumente são provenientes de grandes bases de dados de nascimentos múltiplos existentes principalmente na Europa. Os trabalhos apoiam-se no pressuposto de que como os gêmeos MZ são geneticamente idênticos a descoberta de concordância para uma determinada característica indica fortemente efeito genético, enquanto a discordância sugere um efeito ambiental (QUEIROGA, 2010).

Ainda, a maioria dos estudos localizados até o momento utilizaram amostras de gêmeos adultos. Essa característica parece bastante aplicada ao modelo, uma vez que para se determinar discordância entre os gêmeos MZ para uma determinada variável, a idade é



fundamental, fato que torna surpreendente o achado de discordância na idade infantil em gêmeos.

Em se tratando de gêmeos, o tempo de exposição ao ambiente e o fato de separarem depois de um tempo (estudar, constituir família) pode permitir padrões de discordâncias mais evidentes. Enquanto que na infância e adolescência, os gêmeos vivem na mesma casa e compartilham seus hábitos e atividades a maior parte do tempo (QUEIROGA, 2010). Desta forma, a discordância será menos evidente, porém é importante verificar se pequenas diferenças fenotípicas nessa faixa etária podem ser capazes de afetar o comportamento de outra variável independente de fatores genéticos.

Todavia, é fato que o uso dos gêmeos em estudos genéticos depende dos cuidados metodológicos adotados, principalmente como os gêmeos são amostrados e investigados (HAWKES, 1997). Admite-se que estudos com gêmeos, que sejam bem conduzidos, são capazes de mudar completamente a direção de um problema científico e possibilitam reorientações constantes no foco da pesquisa (MARTIN, 2005).

Portanto, com o auxílio da tecnologia, com equipamentos cada vez mais avançados, utilizando-se principalmente da biologia molecular como uma ferramenta, o estudo com gêmeos permite a comparação entre os pares em relação a epigenética, expressão gênica, ativação ou silenciamento genético e mudanças na estrutura da cromatina, dentre outras investigações, colaborando para o entendimento metabólico, seja devido ao genótipo, ou as influências ambientais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado para o presente estudo material do banco de dados que envolveu o estudo de gêmeos monozigóticos na cidade de Rio Claro-SP. A utilização do material foi autorizada, conforme termo de autorização em anexo. Os métodos envolvendo as análises tanto realizados como à realizar constam descritos a seguir.

### 4.1 Participantes

Por meio de um levantamento populacional realizado em 2008 foram localizados no município de Rio Claro-SP, noventa e oito pares de gêmeos do mesmo sexo (53 pares de moças e 45 pares de rapazes), dois trigêmeos de ambos os sexos (02 rapazes e 04 moças) e um 1 trigêmeo do mesmo sexo (03 meninas). Todos os gêmeos eram estudantes do ensino fundamental ou médio, e apresentavam idade entre 11 a 18 anos (nascidos entre 1990 a 1997). A pesquisa foi divulgada em jornais, rádio e televisão e todas as Escolas Estaduais (19) e Particulares (5) do município foram visitadas. Do total cadastrado, 13 pares (13,3%) não foram localizados nos endereços fornecidos pela escola, outros 31 pares (36,5%) e um trigêmeo recusaram-se a fazer parte do estudo. Portanto, dos 98 pares e três trigêmeos inicialmente cadastrados, 54 pares (35 pares meninas e 19 meninos) e dois trigêmeos (um rapaz e cinco meninas) participaram do estudo, totalizando 114 jovens.

A atribuição de monozigosidade (MZ) e dizigosidade (DZ) aos gêmeos foi realizada por intermédio da investigação da concordância dos gêmeos em relação a marcadores genéticos (DNA), como os genes de locus de minissatélites, também conhecidos pela sigla STR (*short tandem repeat*) (HILL; JEFFREYS, 1985). Em todas as amostras de DNA, a análise de 16 STRs autossômicos (CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D5S51, FGA, TH01, TPOX, vWA e o locus da Amelogenina) foi efetuada por amplificação por PCR, utilizando o kit comercial Identifiler, de acordo com as instruções do fabricante (AB Applied Biosystems). Os resultados revelaram que a amostra avaliada possuía 38 pares de gêmeos MZ e 16 pares de gêmeos DZ.

Nesse sentido, os 38 pares de gêmeos monozigóticos foram avaliados em relação à aptidão cardiorrespiratória, e aqueles que apresentaram diferença intrapar igual ou superior à  $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  foram selecionados para o presente estudo. Dessa forma, 09 pares de gêmeos monozigóticos apresentaram diferença intrapar entre 10,4 e 22,5  $\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , e foram então selecionados para o estudo.

Os gêmeos e seus pais foram previamente informados quanto aos objetivos do estudo. Após tomarem ciência dos procedimentos de medidas os responsáveis assinaram um termo de consentimento livre esclarecido. Os protocolos de intervenção foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista (protocolo n°. 3143 - UNESP) e acompanham as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

#### **4.1.1 Medidas antropométricas**

As medidas antropométricas de massa corporal (MC) e estatura foram verificadas seguindo as recomendações de GORDON *et al.* (1991). A partir destas medidas, foi calculado o Índice de Massa Corporal ( $IMC = Kg/m^2$ ). A circunferência da cintura (CC) foi medida em duplicata no ponto médio entre as últimas costelas e a crista ilíaca com auxílio de uma fita métrica inextensível (Mabis<sup>®</sup>Japan).

#### **4.1.2 Aptidão Cardiorrespiratória**

Os participantes compareceram ao laboratório para receber informações sobre o desenvolvimento do estudo. Um teste de esforço físico (TEF) foi realizado com a finalidade de determinar o consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2máx}$ ). O TEF foi realizado em esteira ergométrica modelo ATL Super<sup>®</sup> (Inbrasport), com 1% de inclinação, nos períodos matutino e vespertino entre as 09:00-11:30h e 14:00-18:00h, em uma sala com temperatura ambiente mantida entre 20 a 25° Celsius. Após período de 5 minutos de familiarização com o ergômetro a diferentes velocidades (4 a 7 km/h), os avaliados permaneceram cinco minutos em repouso na esteira em posição ortostática. Em seguida, foi iniciado o teste utilizando-se de um protocolo que previa velocidade inicial de 4 km/h com incremento progressivo da carga de trabalho de 1 km/h por minuto. Incentivo verbal foi empregado na tentativa de obter o esforço físico máximo. Além da exaustão voluntária, também foram utilizadas como indicadores de interrupção do teste a taxa de troca respiratória (QR) superior a 1,15, a classificação do esforço percebido em 20 (BORG, 1982) e a frequência cardíaca máxima prevista para a idade (220-idade).

Em repouso e durante o TEF foram continuamente registrados o volume minuto (VE), o consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) e a produção de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ) pela análise de trocas gasosas pulmonares (analisador metabólico MedGraphics VO2000<sup>®</sup> - Aerosport Inc.). O equipamento foi calibrado previamente ao desenvolvimento da pesquisa e, no início de cada TEF por meio de auto-calibração. O  $VO_{2máx}$  foi coletado respiração a respiração (breath

by breath) e o valor adotado para análise dos dados foi registrado como o consumo de oxigênio médio nos 30 segundos que antecediam a interrupção do TEF. A frequência cardíaca (FC) foi obtida *on-line* pelo programa do Aerograph<sup>®</sup>.

#### **4.1.3 Amostras biológicas**

Aproximadamente uma semana após a avaliação da capacidade cardiorrespiratória ( $VO_2$ máx) os gêmeos, acompanhados de seus responsáveis, foram orientados a comparecerem ao laboratório em condição de jejum noturno (10 a 12 horas). A coleta sanguínea foi realizada no laboratório de análises clínicas HEMODIAG de Rio Claro-SP com auxílio de profissionais treinados. Após permanecerem por 30 minutos em repouso, foram submetidos aos procedimentos de coleta sanguínea em jejum e pós-carga de glicose.

Todos os procedimentos nesta fase duraram aproximadamente 3 horas. A coleta foi realizada mediante punção da veia antecubital utilizando o sistema de coleta a vácuo (Vacutainer<sup>™</sup> Becton Dickinson Company, Plymouth, Reino Unido), sendo em tubos de 4,0 mL com anticoagulante (fluoreto associado ao EDTA 1 mg/mL sangue e EDTA 1 mg/mL) e tubos de 3,5 mL com heparina. Uma parte do plasma foi utilizada para determinação da glicose e insulina em jejum e 120 minutos e do perfil lipídico (HDL-C, TG e CT).

#### **4.1.4 Teste oral de tolerância a glicose (TOTG)**

O TOTG consistiu em, após coleta de sangue em jejum, da ingestão, durante o período de 5 minutos, de 1,75 g/Kg de glicose por via oral diluída em 300 ml de água fresca. Uma nova coleta de sangue foi realizada 120 minutos após o procedimento para dosagem de glicose e insulina (2h pós carga de glicose).

Durante o teste, o avaliado permaneceu confortavelmente sentado, sendo permitido andar um pouco, sem, entretanto, realizar qualquer exercício físico intenso, fumar ou consumir café antes e no decorrer da prova.

#### **4.2. Determinação dos parâmetros laboratoriais**

As concentrações em jejum de glicose, insulina e lipídios (HDL-C, TG e CT) foram determinadas mediante kits específicos. O LDL-C foi estimado por meio da fórmula de Friedewald:  $LDL-C = CT - HDL - (TG/5)$  (FRIEDEWALD *et al.*, 1972).

Vale destacar que esta fórmula se aplica somente a amostras que apresentariam concentração de TG inferior a 400 mg/dL, no entanto, ressalta-se que não houve nenhum caso com valor superior a este critério. A estimativa da resistência à insulina e da função das

células beta foi realizada a partir do índice Homa (Homa-RI e Homa- $\beta$ , respectivamente) que é conhecido como método da homeostase glicêmica (*homeostasis model assessment*) (MATTHEWS *et al.*, 1985). O índice Homa-RI foi calculado por meio da fórmula:

- $\text{Homa RI} = (\text{insulina em jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose em jejum (mmol/L)}) / 22,5;$

Por sua vez, o cálculo do índice Homa-Beta, que avalia a função secretora das células beta, foi calculado mediante fórmula:

- $\text{Homa } \beta = 20 \times (\text{insulina em jejum } (\mu\text{U/ml}) / (\text{glicemia em jejum (mmol/L)}) - 3,5.$

### 4.3. Análise de metilação do DNA

Para a coleta de DNA, aproximadamente 20  $\mu\text{L}$  de sangue de cada participante foram coletados e pipetado diretamente para o QIAcard<sup>®</sup> FTA Spots da QIAGEN<sup>®</sup> com tecnologia Whatman. Ainda, os procedimentos para extração do DNA foram realizados em duplicata.

#### 4.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se do QIAamp<sup>®</sup> DNA Micro Kit e protocolo de isolamento de DNA genômico a partir de amostras de sangue seco (QIAcard<sup>®</sup> FTA Spots), fornecido pelo fabricante QIAGEN<sup>®</sup>, sendo que: inicialmente, foi retirado do QIAcard uma punção de 10mm de sangue seco em tubos de 1,5mL, e adicionados 180 $\mu\text{L}$  de *Buffer* ATL e 20 $\mu\text{L}$  de proteinase K, que foram devidamente misturados utilizando-se do vórtex. Os microtubos foram incubados por 1h, a 900rpm, em temperatura de 56 °C, utilizando a função *shaker* do equipamento extrator de DNA/RNA QIAcube<sup>®</sup>.

Após breve centrifugação (*spin*) para retirar as gotas do produto que por ventura estivessem aderidas à tampa, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de *Buffer* AL e 1  $\mu\text{L}$  de *carrier* RNA, sendo a solução homogeneizada no vórtex por 10s. Na sequência, os tubos de 1,5mL foram novamente incubados, agora por 10min, a 900rpm, em temperatura de 70 °C. Ao final, novamente as amostras foram submetidas à um *spin*, para remover possíveis gotas aderidas à tampa.

O material lisado foi cuidadosamente transferido para colunas (QIAamp MinElute column) fornecidos pela QIAGEN<sup>®</sup>, e centrifugados por 1min a 8000 rpm. Os dois próximos passos constaram a adição de 500  $\mu\text{L}$  de *Buffer* AW1 e 500  $\mu\text{L}$  de *Buffer* AW2, respectivamente, sempre com descarte dos tubos e troca por novos, sendo ambos submetidos à 8000 rpm x 1min.

Na sequência, as amostras foram centrifugadas à 13.000 rpm x 3min, para que a membrana secasse completamente, para que as colunas fossem colocadas em novos tubos de 1,5mL, e então 60 µL de *Buffer* AE foram pipetados no centro da membrana. Após fechar a tampa, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 25min. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm x 1min.

#### 4.3.2 Quantificação de DNA

Para a quantificação de DNA foi utilizado o fluorímetro Qubit, da empresa Life Technologies<sup>®</sup>. Inicialmente foi preparada uma solução de DNA-HS (*high sensitive*) com fluoróforo, na proporção de 199/1 µL. Cada tubo com amostra continha 199 µL desta solução, e 1 µL de DNA extraído. Para a leitura de quantificação, foi estabelecida uma curva (com valor 0 e 200), utilizando duas soluções padrão, respectivamente, na quantidade de 10 µL para 190 µL da solução DNA-HS mais o fluoróforo. Nesse sentido, a leitura de quantificação foi feita pelo equipamento, e a unidade de medida transformada em ng/µL (Tabela 1).

**Tabela 1 – Valores da quantificação do DNA extraído (ng/µL)**

	Par 1	Par 2	Par 3	Par 4	Par 5	Par 6	Par 7	Par 8	Par 9
<b>GM A</b>	0,38	0,38	0,29	0,43	0,47	0,49	0,29	0,72	0,44
<b>GM B</b>	0,42	0,38	0,35	0,47	0,50	0,28	0,30	0,65	0,42

GM A/B – Gêmeo A/B independente dos valores referentes à aptidão cardiorrespiratória (VO<sub>2</sub>máx)

#### 4.3.3 Tratamento com Bissulfito

O tratamento das amostras de DNA com bissulfito para conversão dos resíduos de citosina não metilados em uracila e posterior quantificação das citosinas metiladas, foi realizado utilizando o EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite Kit, seguindo orientações do fabricante, QIAGEN<sup>®</sup>. Tendo em vista os valores de quantificação do DNA extraído, para o tratamento com bissulfito foi calculado a quantidade de 5ng/µL de DNA em cada amostra. De acordo com a quantidade de DNA foi adicionado água, até atingir o volume de 40 µL. Foram adicionados também 800 µL de RNase – *free water*, 85 µL de Mix Bissulfito e 15 µL de DNA *Protect Buffer*. As reações para o tratamento com bissulfito foram preparadas em tubos de 200 µL, para PCR, conforme Tabela 2.

Após a conversão por bissulfito, os tubos foram centrifugados brevemente, e o conteúdo transferido para tubos de 1,5 mL, onde 560 µL *Buffer* BL contendo 10 µg/mL de *carrier* RNA foram adicionados a cada amostra, homogeneizados no vórtex, seguido de *spin*.

Essa mistura foi transferida para colunas e centrifugada a 13.000 rpm x 1 min. O conteúdo do tubo foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo.

Na sequência, 500 µL de *Buffer BW (buffer wash)* foram adicionados a cada coluna, seguido de centrifugação de 13.000 rpm x 1 min. O conteúdo do tubo foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo. Seguido da adição de 500 µL de *Buffer BD* a cada coluna, e centrifugação de 13.000 rpm x 1 min. O conteúdo do tubo foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo, e incubada em temperatura ambiente por 15 min.

**TABELA 2 – Programação termociclador para tratamento com bissulfito**

<b>ETAPA</b>	<b>TEMPO</b>	<b>TEMPERATURA</b>
<b>Desnaturação</b>	5 min	95 °C
<b>Incubação</b>	25 min	60 °C
<b>Desnaturação</b>	5 min	95 °C
<b>Incubação</b>	85 min	60 °C
<b>Desnaturação</b>	5 min	95 °C
<b>Incubação</b>	175 min	60 °C
<b>Hold*</b>	≈ 12h	20 °C

\*O DNA convertido pode ser deixado no termociclador *overnight* sem perda de atuação

Posteriormente à incubação, 500 µL de *Buffer BW (buffer wash)* foram adicionados a cada coluna, seguido de centrifugação de 13.000 rpm x 1 min. O conteúdo do tubo foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo. Este passo foi repetido mais uma vez, e as colunas foram transferidas para outros tubos, e centrifugadas a 13.000 rpm x 1 min. para eliminar qualquer líquido residual.

Finalmente, as colunas foram colocadas em novos tubos de 1,5mL, e 27 µL de *Buffer EB* foram dispensados no centro de cada membrana da coluna. Para a eluição do DNA purificado, foi centrifugado por 12.000 rpm x 1 min.

Para a quantificação do DNA tratado com bissulfito foi adotado o mesmo procedimento do item 4.3.2.

#### **4.3.4 Amplificação DNA tratado com bissulfito**

A amplificação do DNA tratado com bissulfito foi realizado utilizando o Kit PyroMark CpG Assay<sup>®</sup>, referente ao gene PRKAA2, seguindo orientações do fabricante, QIAGEN<sup>®</sup>. Para tanto, 12,5 µL de Pyromark Mastermix, 2,5 µL de Coralload Concentrate, 2

$\mu\text{L}$  de Primer PCR e 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPEC foram adicionados a cada 4  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA. Um controle (BR) é feito, onde não é adicionada a amostra de DNA. A amplificação do DNA no termociclador seguiu como descrito na Tabela 3.

**TABELA 3 – Programação termociclador para amplificação do DNA tratado com bissulfito**

ETAPA		TEMPO	TEMPERATURA
<b>Desnaturação Inicial</b>		15 min	95 °C
<b>Amplificação (45 ciclos)</b>	<b>Desnaturação</b>	30 seg	94 °C
	<b>Hibridização</b>	30 seg	56 °C
	<b>Extensão</b>	30 seg	72 °C
<b>Extensão Final</b>		10 min	72 °C

#### 4.3.5 Pirosequenciamento

Os procedimentos para o pirosequenciamento foram realizados utilizando o Kit PyroMark CpG Assay<sup>®</sup>, referente ao gene PRKAA2, seguindo orientações do fabricante, QIAGEN<sup>®</sup>. Nesse sentido, 70  $\mu\text{L}$  do “Mix de Beads” foi adicionado às placas fundas, cuja composição foi, 2  $\mu\text{L}$  de Beads, 40  $\mu\text{L}$  de Binding Buffer e 28  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPEC por placa. Do produto da PCR, 10  $\mu\text{L}$  foram adicionados em cada placa, exceto na placa de controle de *primer's*. A placa de controle de amostra continha o Mix de Beads e o BR. Na sequencia, este material foi agitado a 1500 rpm, a 25°C por 10 min.

Em cartucho específico do pirosequenciador foram adicionados de acordo com informações do fabricante do PyroMark Q24<sup>®</sup> – QIAGEN<sup>®</sup>, a enzima (108  $\mu\text{L}$ ), o substrato (108  $\mu\text{L}$ ) e dNTPs (A: 66  $\mu\text{L}$ ; C: 59  $\mu\text{L}$ ; G: 68  $\mu\text{L}$ ; e T: 70  $\mu\text{L}$ ). Na placa rasa foram adicionados 24,25  $\mu\text{L}$  de Anneling Buffer e 0,75  $\mu\text{L}$  de Primer de Sequenciamento. Sendo que na placa de controle de amostra foram adicionados apenas 25  $\mu\text{L}$  de Anneling Buffer.

A corrida ou análise de pirosequenciamento é iniciada após a aspiração do conteúdo da placa funda, seguida de passagem por álcool 70% e *Denaturation Solution*, ambos por 5 segundos, e *wash buffer* por 10 segundos. O material deve ser colocado em contato com a placa rasa, que posteriormente deve ficar incubada por 2 min. a 80°C, antes de ser colocada no pirosequenciador.

Os resultados são analisados em software específico, como mostrado na Figura 5.



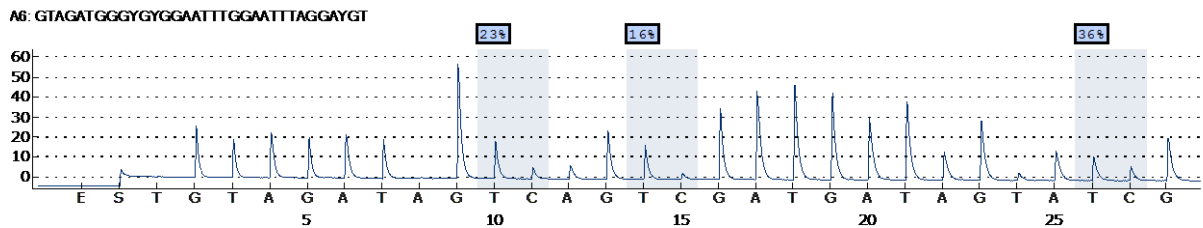


FIGURA 5 – Exemplo de resultado da análise de metilação de DNA, gene PRKAA2.

#### 4.4 Tratamento dos dados e análise estatística

De acordo com os objetivos do presente estudo, os gêmeos foram separados em dois grupos, separando os irmãos de acordo com a aptidão cardiorrespiratória, ou seja, o irmão com o maior valor de  $VO_2$ máx fez parte do grupo Gêmeo-1, enquanto o co-irmão com o menor valor de  $VO_2$ máx fez parte do grupo Gêmeo-2, com a finalidade de controlar os efeitos genéticos. As análises foram realizadas com auxílio do pacote estatístico SPSS versão 15.0 adotando como nível de significância  $p < 0,05$ . Inicialmente o teste de Shapiro Wilk foi utilizado para a análise da distribuição dos dados. Variáveis com distribuição normal foram apresentadas em valores de média e desvio-padrão ( $\pm$ ) enquanto variáveis assimétricas em valores de mediana (mínimo-máximo).

Dessa forma, considerando a similaridade genética entre os irmãos em função da monozigosidade, e o desenho metodológico do presente estudo, do tipo caso-controle, o teste *t-student* para amostras pareadas foi empregado para testar a diferença entre as médias das variáveis intrapar, enquanto coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para análise das associações estatísticas entre  $VO_2$ máx, metilação do gene PRKAA2, variáveis antropométricas e bioquímicas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Descrição da Amostra

Os gêmeos foram classificados em maior (GÊMEO-1) e menor (GÊMEO-2) VO<sub>2</sub>máx (intrapar), ou seja, o irmão mais apto integra o grupo Gêmeo-1, enquanto seu co-irmão que é menos apto, integra o grupo Gêmeo-2. Portanto, o intuito foi analisar a consequência desta diferença (VO<sub>2</sub>máx) em outros fenótipos, isolando o efeito em função do *background* genético, haja vista que o estudo foi desenvolvido com gêmeos idênticos.

A amostra foi constituída de 09 pares de gêmeos MZ, dentre os quais cinco pares do sexo feminino e quatro pares do sexo masculino. A Tabela 4 apresenta os valores descritivos dos gêmeos em relação à faixa etária, características físicas e aptidão cardiorrespiratória (VO<sub>2</sub>máx). Não foi observada diferença estatística nas variáveis, exceto VO<sub>2</sub>máx, como já era previsto, cuja diferença intrapar variou de 10,4 a 22,5 ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

**Tabela 4 – Idade, características físicas e VO<sub>2</sub>máx (9 pares de gêmeos)**

Variáveis	Gêmeo-1	Gêmeo-2
Idade (anos)	13,9±2,2	
MC (Kg)	46,4±9,0	46,2±8,7
EST (cm)	155,7±11,5	156,4±11,0
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	18,9±1,4	18,7±1,5
CC (cm)	66,5±4,5	65,7±5,0
VO <sub>2</sub> máx	<b>45,9±10,0</b>	<b>32,1±10,6**</b>

Nota: MC: Massa Corporal; EST: Estatura; IMC: Índice de Massa Corporal; CC: Circunferência da Cintura; VO<sub>2</sub>máx: consumo máximo de oxigênio (ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>);

Dados apresentados como média e desvio padrão (±);

\*\* p<0,01: Maior VO<sub>2</sub>máx vs. Menor VO<sub>2</sub>máx, teste *t-student* pareado.

A TABELA 5 mostra as características bioquímicas relacionadas à homeostase da glicose e perfil lipídico. O grupo GÊMEO-1 apresentou valores de glicose em jejum (GLI<sub>je</sub>) estatisticamente menores em relação ao grupo GÊMEO-2. Além disso, não foi observada diferença estatística entre os gêmeos para as demais variáveis apresentadas na tabela 5. Após teste de normalidade (Shapiro-Wilk), observou-se a presença de variáveis com distribuição assimétrica que, em função disso, foram apresentadas em forma de mediana (md) e valores mínimos e máximos, enquanto as variáveis com distribuição normal estão exibidas como média e desvio padrão (±).

Tabela 5 – Características bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose e perfil lipídico.

Variáveis	Gêmeo 1	Gêmeo 2
GLI <sub>je</sub>	82,9±7,3	86,7±7,6*
GLI <sub>2h</sub>	88,0±20,9	83,0±18,4
INS <sub>je</sub>	5,5±1,5	6,0±1,6
INS <sub>2h</sub>	25,8 (5,7 – 199,0)	25,3±13,7
HOMA-IR	1,2±0,4	1,3±0,4
HOMA-β	106,1 (77,4 – 194,9)	98,6±34,0
TG	77,2 ± 26,1	74,9 ± 27,1
CT	151,2 ± 42,1	161,7 ± 36,4
HDL-C	42,6 ± 5,3	44,2 ± 5,6
LDL-C	93,2 ± 40,1	102,5 ± 34,6

Nota: GLI<sub>je</sub>: glicemia em jejum (mg/dL); GLI<sub>2h</sub>: glicemia pós carga (mg/dL); INS<sub>je</sub>: insulina em jejum (mg/dL); INS<sub>2h</sub>: insulina pós carga (mg/dL); HOMA-RI: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); Homa-β: função secretora das células beta; TG: triglicérides (mg/dL); CT: colesterol total (mg/dL); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade (mg/dL).

Dados apresentados como média e desvio padrão (±) para variáveis com distribuição normal e mediana (mínimo-máximo) para variáveis assimétricas.

\*p<0,05: Maior VO<sub>2</sub>máx vs. Menor VO<sub>2</sub>máx, teste *t-student* pareado.

Na TABELA 6 são apresentados os dados quanto ao perfil de metilação do gene PRKAA2 dos gêmeos monozigóticos discordantes para VO<sub>2</sub>máx. Foi analisada a região promotora do gene, contendo regiões de ilhas CpG. Não foi verificada diferença no perfil de metilação total (global) na região promotora do gene PRKAA2.

Tabela 6 – Perfil de metilação do gene PRKAA2.

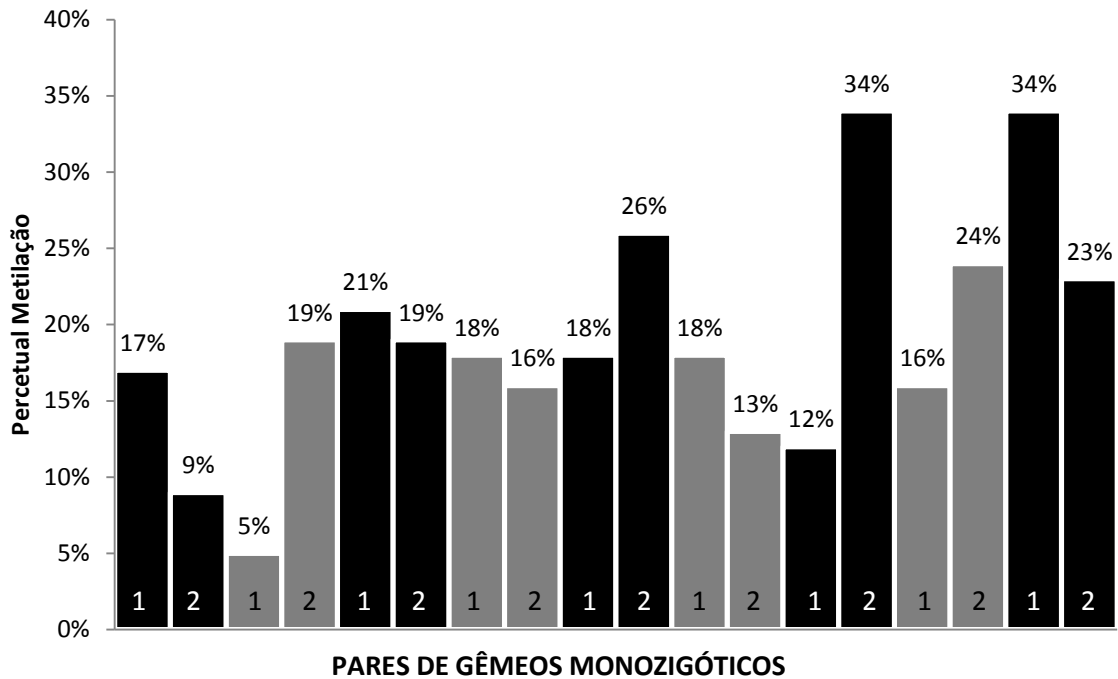
Variáveis	Gêmeo 1 (%)	Gêmeo 2 (%)
PRKAA2 (total)	17,7±7,7	20,3±7,5

Nota: PRKAA2 (total): gene AMPK $\alpha_2$  – somatório do percentual de metilação na região promotora do gene, composta por 06 regiões de ilhas CpG.

Dados relativos apresentados como média e desvio padrão (±) para variáveis com distribuição normal e mediana (mínimo-máximo) para variáveis assimétricas.

\*p<0,05: Maior VO<sub>2</sub>máx vs. Menor VO<sub>2</sub>máx, teste *t-student* pareado.

Contudo, a diferença intrapar em relação a metilação do gene variou de 2% a 22%. A Figura 6, mostra os dados descritivos do perfil de metilação de todos os indivíduos.



**FIGURA 6 - Perfil de metilação do gene PRKAA2**

Nota: os pares de gêmeos estão discriminados de acordo com a cor das colunas, e cada indivíduo está representado por números (GÊMEO-1 e GÊMEO-2).

Dados apresentados como percentual total de metilação na região promotora do gene PRKAA2.

## 5.2 Relação entre VO<sub>2</sub>máx, metilação do gene PRKAA2, características físicas e variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose e perfil lipídico

A análise do coeficiente de correlação (Pearson) entre VO<sub>2</sub>máx, e características físicas, demonstrou relação positiva entre massa corporal com estatura ( $r= 0,941$ ), IMC ( $r=0,815$ ) e circunferência da cintura ( $r= 0,894$ ) para o grupo GÊMEO-1. A estatura e IMC também apresentaram relação positiva com CC ( $r=815$  e  $r= 768$ ), respectivamente. Não foi observada relação entre aptidão cardiorrespiratória e as demais variáveis (Tabela 7).

**Tabela 7 – Relação entre VO<sub>2</sub>máx e características físicas para o grupo de gêmeos com maior aptidão cardiorrespiratória – GÊMEO 1**

	MC	EST.	IMC	CC
VO <sub>2</sub> máx	0,187	0,325	- 0,166	0,046
MC		<b>0,941**</b>	<b>0,815**</b>	<b>0,894**</b>
EST.			0,574	<b>0,815**</b>
IMC				<b>0,768*</b>

Nota: VO<sub>2</sub>máx: consumo máximo de oxigênio (ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>); MC: Massa Corporal; EST: Estatura; IMC: Índice de Massa Corporal; CC: Circunferência da Cintura.

\* $p<0,05$  e \*\* $p<0,01$ : Coeficiente de Correlação de Pearson.

Por sua vez, a Tabela 8 demonstra a análise do coeficiente de correlação (Pearson) entre VO<sub>2</sub>máx e características físicas para o grupo de gêmeos com valores inferiores de VO<sub>2</sub>máx (GÊMEO-2), em relação ao co-irmão. Os resultados não apresentaram relação entre

aptidão cardiorrespiratória e as demais variáveis. A massa corporal teve relação positiva com estatura ( $r= 0,905$ ), IMC ( $r=0,774$ ) e circunferência da cintura ( $r= 0,810$ ). Além disso, a estatura demonstrou relação positiva com circunferência da cintura ( $r=0,743$ ).

**Tabela 8 – Relação entre VO<sub>2</sub>máx e características físicas para o grupo de gêmeos com menor aptidão cardiorrespiratória – GÊMEO 2**

	MC	EST.	IMC	CC
<b>VO<sub>2</sub>máx</b>	0,187	0,189	0,043	0,130
<b>MC</b>		<b>0,905**</b>	<b>0,774*</b>	<b>0,810**</b>
<b>EST.</b>			0,434	<b>0,743*</b>
<b>IMC</b>				0,636

Nota: VO<sub>2</sub>máx: consumo máximo de oxigênio ( $\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ); MC: Massa Corporal; EST: Estatura; IMC: Índice de Massa Corporal; CC: Circunferência da Cintura.

\* $p<0,05$  e \*\* $p<0,01$ : Coeficiente de Correlação de Pearson.

A relação entre aptidão cardiorrespiratória e variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose não foi observada no grupo GÊMEO-1. Entretanto, a insulina jejum (INS<sub>je</sub>) mostrou relação positiva com insulina 2h pós carga de glicose (INS<sub>2h</sub>) ( $r=0,736$ ), glicose jejum (GLI<sub>je</sub>) ( $r=0,747$ ), glicose 2h pós carga (GLI<sub>2h</sub>) ( $r= 0,794$ ) e HOMA-IR ( $r= 0,988$ ).

A relação também foi positiva entre HOMA-IR com INS<sub>2h</sub>, GLI<sub>je</sub> e GLI<sub>2h</sub> com ( $r= 0,678$ ;  $r= 0,836$  e  $r= 0,729$ ), respectivamente. Uma relação negativa foi observada entre GLI<sub>je</sub> e HOMA- $\beta$  ( $r= -0,747$ ). No que se refere à metilação do gene PRKAA2, houve relação positiva com INS<sub>2h</sub> ( $r=0,722$ ) (TABELA 9).

**Tabela 9 – Relação entre VO<sub>2</sub>máx, metilação do gene PRKAA2 e variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose para o grupo de gêmeos com maior aptidão cardiorrespiratória – GÊMEO 1**

	INS <sub>je</sub>	INS <sub>2h</sub>	GLI <sub>je</sub>	GLI <sub>2h</sub>	HOMA- $\beta$	HOMA-IR	PRKAA2
<b>VO<sub>2</sub>máx</b>	0,027	-0,109	-0,070	-0,231	0,435	0,029	0,227
<b>INS<sub>je</sub></b>		<b>0,736*</b>	<b>0,747*</b>	<b>0,794*</b>	-0,207	<b>0,988**</b>	0,457
<b>INS<sub>2h</sub></b>			0,313	0,655	0,048	<b>0,678*</b>	<b>0,722*</b>
<b>GLI<sub>je</sub></b>				0,382	<b>-0,747*</b>	<b>0,836**</b>	0,345
<b>GLI<sub>2h</sub></b>					0,064	<b>0,729*</b>	0,088
<b>HOMA-<math>\beta</math></b>						-0,331	-0,064
<b>HOMA-IR</b>							0,467

Nota: VO<sub>2</sub>máx: consumo máximo de oxigênio ( $\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ); INS<sub>je</sub>: insulina em jejum (mg/dL); INS<sub>2h</sub>: insulina pós carga (mg/dL); GLI<sub>je</sub>: glicemia em jejum (mg/dL); GLI<sub>2h</sub>: glicemia pós carga (mg/dL); Homa- $\beta$ : função secretora das células beta; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); PRKAA2: subunidade alfa 2 do gene AMPK – dados percentuais de metilação total.

\* $p<0,05$  e \*\* $p<0,01$ : Coeficiente de Correlação de Pearson.

Assim como no grupo GÊMEO-1, a análise entre aptidão cardiorrespiratória e variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose no grupo GÊMEO-2 não demonstrou relação. Foi observada relação positiva entre INS<sub>je</sub> e HOMA-IR ( $r= 0,968$ ), e INS<sub>2h</sub> com GLI<sub>2h</sub> ( $r= 0,712$ ). Igualmente ao grupo GÊMEO-1, o grupo GÊMEO-2 também mostrou relação negativa entre GLI<sub>je</sub> e HOMA- $\beta$  ( $r= -0,808$ ) (TABELA 10).

**Tabela 10 – Relação entre VO<sub>2</sub>máx, metilação do gene PRKAA2 e variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose para o grupo de gêmeos com menor aptidão cardiorrespiratória – GÊMEO 2**

	INS <sub>je</sub>	INS <sub>2h</sub>	GLI <sub>je</sub>	GLI <sub>2h</sub>	HOMA-β	HOMA-IR	PRKAA2
<b>VO<sub>2</sub>máx</b>	-0,407	0,012	-0,077	0,135	-0,094	-0,355	-0,195
<b>INS<sub>je</sub></b>		-0,149	0,266	-0,255	0,312	<b>0,968**</b>	-0,181
<b>INS<sub>2h</sub></b>			0,361	<b>0,712*</b>	-0,448	-0,055	-0,095
<b>GLI<sub>je</sub></b>				-0,080	<b>-0,808**</b>	0,491	0,002
<b>GLI<sub>2h</sub></b>					-0,025	-0,266	-0,077
<b>HOMA-β</b>						0,073	0,016
<b>HOMA-RI</b>							-0,198

Nota: VO<sub>2</sub>máx: consumo máximo de oxigênio (ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>); INS<sub>je</sub>: insulina em jejum (mg/dL); INS<sub>2h</sub>: insulina pós carga (mg/dL); GLI<sub>je</sub>: glicemia em jejum (mg/dL); GLI<sub>2h</sub>: glicemia pós carga (mg/dL); Homa-β: função secretora das células beta; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); PRKAA2: subunidade alfa 2 do gene AMPK – dados percentuais de metilação total.

\*p<0,05 e \*\*p<0,01: Coeficiente de Correlação de Pearson.

Na Tabela 11 são apresentados os dados da relação entre VO<sub>2</sub>máx, metilação do gene PRKAA2 e perfil lipídico para o grupo de gêmeos com valores superiores de VO<sub>2</sub>máx (GÊMEO-1), em relação ao co-irmão. Os resultados não apresentaram relação entre aptidão cardiorrespiratória e as demais variáveis. Os triglicérides exibiram relação positiva com CT (r=0,757) e também com LDL-C (0,687). O colesterol total também teve relação positiva com LDL-C (r= 0,988), enquanto que o HDL-C foi a única variável do perfil lipídico a apresentar relação com a metilação do gene PRKAA2, sendo esta negativa (r=-0,744).

**Tabela 11 – Relação entre VO<sub>2</sub>máx, metilação do gene PRKAA2 e perfil lipídico para o grupo de gêmeos com maior aptidão cardiorrespiratória – GÊMEO 1**

	TG	CT	HDL-C	LDL-C	PRKAA2
<b>VO<sub>2</sub>máx</b>	0,371	0,554	0,014	0,532	0,227
<b>TG</b>		<b>0,757*</b>	-0,165	<b>0,687*</b>	-0,037
<b>CT</b>			-0,268	<b>0,988**</b>	0,213
<b>HDL-C</b>				-0,391	<b>-0,744*</b>
<b>LDL-C</b>					0,326

Nota: VO<sub>2</sub>máx: consumo máximo de oxigênio (ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>); TG: triglicérides (mg/dL); CT: colesterol total (mg/dL); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); PRKAA2: subunidade alfa 2 do gene AMPK – dados percentuais de metilação total.

\*p<0,05 e \*\*p<0,01: Coeficiente de Correlação de Pearson.

Por outro lado, considerando a análise da relação entre VO<sub>2</sub>máx, metilação do gene PRKAA2 e perfil lipídico para o grupo de gêmeos com valores inferiores de VO<sub>2</sub>máx (GÊMEO-2), apresentados na Tabela 12, nenhuma relação entre aptidão cardiorrespiratória e as demais variáveis foi verificada, enquanto que o colesterol total teve relação positiva com LDL-C (r= 0,985). Porém, foi possível observar relação positiva do gene PRKAA2 com CT (r=0,728) e LDL-C (r=-0,728).

**Tabela 12 – Relação entre VO<sub>2</sub>máx, metilação do gene PRKAA2 e perfil lipídico para o grupo de gêmeos com menor aptidão cardiorrespiratória – GÊMEO 2**

	<b>TG</b>	<b>CT</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>PRKAA2</b>
<b>VO<sub>2</sub>máx</b>	0,412	0,462	-0,091	0,436	-0,195
<b>TG</b>		0,615	-0,347	0,546	0,456
<b>CT</b>			-0,191	<b>0,985**</b>	<b>0,728*</b>
<b>HDL</b>				-0,309	-0,214
<b>LDL</b>					<b>0,728*</b>

Nota: VO<sub>2</sub>máx: consumo máximo de oxigênio (ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>); TG: triglicérides (mg/dL); CT: colesterol total (mg/dL); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); PRKAA2: subunidade alfa 2 do gene AMPK – dados percentuais de metilação total.

\*p<0,05 e \*\*p<0,01: Coeficiente de Correlação de Pearson.

Ainda, nenhuma relação foi observada entre as variáveis bioquímicas do metabolismo da glicose com as variáveis do perfil lipídico, tanto no grupo Gêmeo-1 como no grupo Gêmeo-2.

## 6. DISCUSSÃO

Após pareamento dos dados, características físicas, bioquímicas e perfil de metilação do gene PRKAA2, os grupos GÊMEO-1 e GÊMEO-2 foram comparados.

### 6.1 Comparação entre aptidão cardiorrespiratória, características físicas e variáveis bioquímicas entre o grupo GÊMEO-1 e GÊMEO-2

Inicialmente foi verificado se haviam diferenças entre os grupos Gêmeo-1 e Gêmeo-2 (discordantes para VO<sub>2</sub>máx) nas características físicas. Os resultados não revelaram diferenças em relação a massa corporal (MC), IMC e CC. Em relação às variáveis bioquímicas, o grupo Gêmeo-1 apresentou valores significativamente menores de glicose em jejum (GLI<sub>je</sub>), quando comparado com o grupo Gêmeo-2. Não foi verificada diferenças para insulina jejum (INS<sub>je</sub>), glicose (GLI<sub>2h</sub>) e insulina (INS<sub>2h</sub>) 2h pós carga de glicose. Os índices HOMA-RI e HOMA-β, assim como dados do perfil lipídico, também não apresentaram diferenças entre os gêmeos discordantes para VO<sub>2</sub>máx.

Contudo, vale ressaltar que a diferença na aptidão cardiorrespiratória intrapar variou de 16,9% a 41,6%. De acordo com critérios do FITNESSGRAM *program* (CURETON; WARREN, 1990), foi possível observar para o grupo Gêmeo-2, que, 66,6% (n=06) obtiveram classificação equivalente à “baixa”, e 33,3% (n=03) classificação equivalente à “moderada”, enquanto que para o grupo Gêmeo-1, apenas 11,1% (n=01) na classificação de “baixa”, 33,3% (n=03) na “moderada” e 55,6 % (n=05) na “alta” aptidão cardiorrespiratória, respectivamente (dados não mostrados).

Alguns estudos tem investigado a relação entre a aptidão cardiorrespiratória e a sensibilidade à insulina, porém, os resultados tem sido conflitantes. A aptidão cardiorrespiratória foi associada independentemente à sensibilidade à insulina (RUIZ *et al.*, 2007; ALLEN *et al.*, 2007; KAZA-VUBU *et al.*, 2005), enquanto outros trabalhos sugerem que os efeitos da aptidão cardiorrespiratória na sensibilidade à insulina são indiretos e provavelmente em função da composição corporal (BALL *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2006; HENDERSON *et al.*, 2012).

De acordo com Lee *et al.* (2005), para um dado nível de gordura visceral, subcutânea e circunferência da cintura, a aptidão cardiorrespiratória elevada está associada substancialmente a diminuição do risco metabólico à saúde. Corroborando, Nagano *et al.* (2004) descrevem que a aptidão cardiorrespiratória esta associada com baixo risco de hiperinsulinemia em indivíduos com intolerância a glicose e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).



Não obstante, no presente estudo onde indivíduos normoglicêmicos, com idade média de  $13,9 \pm 2,2$  anos foram investigados, não foi observada diferença em relação à composição corporal, mesmo quando analisado de acordo com o gênero (dados não mostrados). Entretanto, os grupos Gêmeo-1 e Gêmeo-2 apresentaram algumas diferenças nas relações entre as variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose (Tabelas 09 e 10) e perfil lipídico (Tabelas 11 e 12).

O estudo de Leite *et al.* (2009) também com normoglicêmicos, porém adultos e que apresentavam fator de risco para o desenvolvimento de DM2, mostrou que a diminuição no  $VO_2$ máx está correlacionada com a piora na sensibilidade a insulina, que por sua vez pode levar à resistência a insulina e DM2. Outros pesquisadores, Nyholm *et al.* (1996), Eriksson e Lindgärde (1996) também mostraram em seus estudos uma associação significativa entre resistência à insulina e baixa aptidão cardiorrespiratória em indivíduos não diabéticos. Ainda, a baixa aptidão cardiorrespiratória está associada com a piora na glicose em jejum (WEI *et al.*, 1999), e a diminuição progressiva do  $VO_2$ máx ocasiona um declínio na regulação do metabolismo da glicose (ERIKSSON; LINDGÄRDE, 1991).

Nesse sentido, tem-se demonstrado que o exercício físico está associado ao aumento na sensibilidade à insulina, na melhora da função das células beta pancreática e no aumento da tolerância à glicose (LAKKA *et al.*, 2004; DELA *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 1999). Ainda, o exercício físico melhora a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos e reduz as concentrações de insulina e de glicose plasmática tanto em idosos como em jovens (COKER *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2002). Corroborando, Queiroga (2010) investigou o papel da aptidão cardiorrespiratória na expressão de genes em gêmeos monozigóticos (MZ) discordantes para consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx). O estudo revelou que, apesar da similaridade genética, o membro do par com maior  $VO_2$ máx apresentou significativamente maior transcrição do mRNA de genes relacionados ao metabolismo da glicose do que seu contrapartido menos apto.

Portanto, considerar o estilo de vida dos indivíduos analisados, é de suma importância, uma vez que tem sido postulado benefícios na regulação do metabolismo da glicose mediado pela prática regular de atividades e exercícios físicos (HUOT *et al.*, 2011; HENDERSON *et al.*, 2012). Nesta perspectiva, é importante considerar a influência do enfoque metodológico dos estudos, uma vez que as diferenças entre estes dificultam o estabelecimento de um entendimento mais conciso e eficaz a respeito do impacto do  $VO_2$ máx no metabolismo da glicose.

Ainda, no que diz respeito às variáveis bioquímicas relacionadas ao perfil lipídico, nenhuma relação foi observada entre aptidão cardiorrespiratória e perfil lipídico em ambos os grupos (Gêmeo-1 e Gêmeo-2), assim como diferença entre os grupos após teste *t-student* pareado.

Considerando a amostra avaliada neste estudo, é surpreendente o achado de discordância entre gêmeos MZ saudáveis durante a infância, uma vez que as diferenças tornam-se evidentes normalmente com o passar do tempo, sugerindo que mudanças epigenéticas aumentam com o tempo (FRAGA *et al.*, 2005), permitindo padrões de discordâncias mais evidentes. Além disso, na infância e adolescência, os gêmeos vivem na mesma casa e compartilham seus hábitos e atividades a maior parte do tempo, fazendo com que as discordâncias sejam menos evidentes (QUEIROGA, 2010).

Todavia, vale salientar que os indivíduos analisados neste estudo não apresentaram diferenças intrapar em relação a índices relacionados à saúde considerando as medidas antropométricas, e a diferença em relação à aptidão cardiorrespiratória parece ter sido suficiente para causar uma divergência em relação ao metabolismo da glicose.

Além disso, tendo em vista que o presente estudo investigou indivíduos com idade média de  $13,9 \pm 2,2$  anos, é importante ressaltar que não foi observada a presença de diferenças maturacionais intrapar (dados não mostrados), pois durante o período da adolescência tem-se verificado resistência à insulina transitória que aparece durante a puberdade (CAPRIO *et al.*, 1996; GORAN; GOWER, 2001).

A importância destes dados se dá diante da possibilidade do  $VO_2$ máx poder ser visto como um preditor para o desenvolvimento de doenças no futuro (ASTRAND *et al.*, 2006), durante a vida adulta, além da possibilidade de antecipação de diagnóstico e tratamento. Entretanto, os hábitos adotados durante a vida certamente influenciam a pré-disposição para o acometimento de enfermidades ao longo do tempo, haja vista a influência do  $VO_2$ máx no metabolismo (LAAKSONEN *et al.*, 2002; LAKKA; BOUCHARD, 2004).

## **6.2 Análise do perfil de metilação do gene PRKAA2 com características físicas, aptidão cardiorrespiratória e variáveis bioquímicas entre o grupo GÊMEO 1 e GÊMEO 2**

A análise do perfil de metilação do gene PRKAA2 ( $AMPK\alpha_2$ ) entre os grupos Gêmeo 1 e 2 (discordantes para  $VO_2$ máx), considerando as regiões em separado, ou o somatório do percentual de metilação destas (metilação total na região promotora do gene), não apresentou diferença estatisticamente significativa. Ainda, nenhuma relação entre  $VO_2$ máx e perfil de metilação do gene PRKAA2 foi observada.

Estudos entre gêmeos monozigóticos envolvendo metilação de DNA têm mostrado maiores diferenças entre gêmeos com o passar dos anos (idade) em comparação com aqueles mais jovens, e estas diferenças na metilação individual não são estáveis ao longo do tempo (PILSNER *et al.*, 2007; FRAGA *et al.*, 2005). Portanto, é razoável admitir que a metilação de DNA é algo dinâmico, e atua constantemente influenciando vias metabólicas. Nesse sentido, o estudo de Zhao *et al.* (2012) demonstrou que a metilação global de DNA a partir de sangue periférico estava significativamente associada com resistência a insulina, em uma amostra de gêmeos monozigóticos, independente de fatores de risco.

Corroborando, Nakajima *et al.* (2010) descobriram que os homens e mulheres idosos que praticaram atividade física (caminhada) durante seis meses apresentaram um percentual significativamente maior de metilação em comparação ao grupo controle. Neste estudo, os genes responsáveis pela secreção de citocinas pró-inflamatórias foram investigados, sugerindo que a metilação do DNA pode estar vinculada a atividade física e a inflamação crônica, como um mecanismo subjacente para o desenvolvimento de câncer.

Por outro lado, em um estudo que verificou a relação entre câncer e metilação do DNA, não foi verificado um impacto significativo da atividade física na metilação de DNA, porém, os autores sugerem um risco elevado de hipometilação global associado com baixos níveis de atividade física (ZHANG *et al.*, 2011).

Os estudos envolvendo metilação de DNA e exercício físico ainda são escassos na literatura, e aqueles existentes tem abordado o tema sob diferentes enfoques, o que torna desafiador o estudo nesta área, assim como interpretações a cerca dos trabalhos disponíveis. Este é o primeiro trabalho envolvendo a metilação do gene PRKAA2, aptidão cardiorrespiratória e variáveis bioquímicas referentes ao metabolismo da glicose e perfil lipídico.

Em relação ao gene PRKAA2, McGee *et al.* (2009) sugerem que a AMPK pode estar envolvida na regulação de histonas durante o exercício, e esta interação pode ser dependente de um certo número de fatores, incluindo o tipo de exercício, a intensidade e a duração. A AMPK tem sido considerada um sensor do *status* de energia celular (KAHN *et al.*, 2005; CANTÓ *et al.*, 2009), sendo ativada pelo exercício físico, levando à efeitos benéficos, como aumento na oxidação de ácidos graxos (ASCHENBACH *et al.*, 2004; STEPHENS *et al.*, 2002) e aumento na captação de glicose (MU *et al.*, 2001; HAYASHI *et al.*, 1999; MERRILL *et al.*, 1997).

No que diz respeito às variáveis bioquímicas, a metilação do gene PRKAA2 apresentou relação positiva com insulina (INS<sub>2h</sub>) 2h pós carga de glicose ( $r=0,722$ ) no grupo

GÊMEO1. Por outro lado, no grupo GÊMEO2 não foi observada relação entre metilação e variáveis relacionadas ao metabolismo da glicose.

Contudo, foi possível observar que o grupo de gêmeos com maior aptidão cardiorrespiratória (GÊMEO-1), mesmo sem apresentar relação entre  $VO_2$ máx e metilação do gene PRKAA2, mostrou relação negativa entre PRKAA2 e HDL-C ( $r=-0,744$ ). Por outro lado, o grupo GÊMEO-2 - que também não apresentou relação entre o  $VO_2$ máx e metilação do gene PRKAA2 - a relação foi positiva entre a metilação do gene PRKAA2 e CT ( $r=0,728$ ), assim como PRKAA2 com LDL-C ( $r=0,728$ ). Portanto, apesar de não ser verificada diferença entre os grupos Gêmeo-1 vs. Gêmeo-2 foi possível observar diferenças entre os grupos para a relação entre metilação e perfil lipídico.

No estudo de McGee *et al.* (2003) com homens destreinados após exercício agudo, foi possível observar um aumento da AMPK $\alpha_2$  nuclear no músculo esquelético. A AMPK parece também regular a expressão de genes, por meio do controle da atividade transcricional de vários reguladores (CANTÓ *et al.*, 2009). Em humanos, os complexos da AMPK  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  parece mediar respostas metabólicas ao exercício no músculo esquelético (FUJII *et al.*, 2000). No entanto, o exercício de *sprint* máximo durante 30 segundos ativa ambas subunidades, AMPK $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  (CHEN *et al.*, 2000), enquanto que a atividade AMPK  $\alpha_2$  é aumentada durante o exercício de intensidade moderada, com aumento na oxidação de ácidos graxos (STEPHENS *et al.*, 2002).

A AMPK é um “interruptor metabólico”, uma proteína alvo chave, capaz de controlar o fluxo através de vias metabólicas de cetogênese hepática, síntese de colesterol, lipogênese, síntese dos triglicerídeos, lipólise nos adipócitos e no músculo esquelético, além da oxidação de ácido graxos (KAHN *et al.*, 2005, HARDIE, 2007). De acordo com Spencer-Jones *et al.* (2006) a atividade da AMPK inibe a biossíntese de ácidos graxos e colesterol, além de promover a oxidação de ácidos graxos, fato este que poderia impedir o acúmulo de lipídeos e desenvolvimento de resistência à insulina em tecidos não-adiposos.

Em um estudo com camundongos *knockout* para AMPK $\alpha_2$ , foi possível observar aumento de peso corporal e massa gorda quando expostos a uma dieta com alto teor de gordura (VILLENNA *et al.*, 2004), e também uma diminuição na sensibilidade a insulina (VIOLETT *et al.*, 2003). Ainda, Stroup e Ramsaran (2005) mostraram que a síntese e eliminação de colesterol são regulados por meio da fosforilação de AMPK.

Considerando a perspectiva de saúde metabólica, muito do que se sabe sobre metabolismo energético dependente da AMPK, foi revelado por meio da análise de diferentes estados de aptidão metabólica (OSLER; ZIERATH, 2007). Por exemplo, o estado metabólico

de um atleta altamente treinado é caracterizado pela extrema flexibilidade na transição entre a glicose e oxidação de lipídios, no intuito de alcançar o mais vantajoso equilíbrio energético, poupando glicose e tendo eficiência em termos de energia (HENRIKSSON, 1995). Por outro lado, o indivíduo sedentário, obeso, perde a capacidade de recrutar energia da mesma forma (STORLIEN, *et al.*, 2004; KELLEY; MANDARINO, 2000). Esta flexibilidade metabólica pode ser descrita como a capacidade de alternar entre a utilização de carboidratos e lipídios, no intuito de poupar glicose para outros órgãos tais como o cérebro (STORLIEN *et al.*, 2004).

Nesse sentido, Osler e Zierath (2007) descrevem que o acúmulo de evidências sugere que a regulação na utilização de combustível (carboidratos ou lipídios) via sensoriamento da cascata de sinalização da AMPK poderia ser uma característica fundamental, subjacente aos estados distintos de aptidão metabólica. Ativadores de AMPK tem mostrado a capacidade desta para normalizar os estados de inflexibilidade metabólica em ratos obesos (BERGERON *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2004). Não obstante, a intervenção com exercícios físicos exerce melhorias semelhantes (POLD *et al.*, 2005). Portanto, tem-se postulado que a ativação crônica da AMPK poderia permitir a recuperação ou manutenção de um metabolismo “flexível”, e assim, manter um grande potencial como terapia de intervenção ou prevenção contra distúrbios metabólicos.

Considerando os dados do presente trabalho, em uma amostra de indivíduos normoglicêmicos e com valores lipídicos e antropométricos dentro de escalas de normalidade, onde o efeito do *background* genético foi controlado, o achado de diferenças para aptidão cardiorrespiratória, glicose em jejum e relação de colesterol com metilação do gene PRKAA2, torna-se surpreendente. Contudo, é preciso atentar-se ao fato de que a metilação por si só não é capaz de evidenciar todos os mecanismos de regulação gênica, uma vez que dentro do aspecto da epigenética, o papel dos miRNA's (micro RNA's) também deve ser considerado, assim como uma análise transcriptômica, proteômica. Enfim, para um entendimento mais aguçado, um conjunto de análises é requerida.

Todavia, se clinicamente tais dados ainda não representam ou indicam a necessidade de um tratamento diferenciado, cientificamente este pode ser um ponto de partida para o entendimento não somente da ação da AMPK, mas sobretudo, dos efeitos do exercício físico no metabolismo.

Ainda, os resultados deste estudo, sugerem que o modelo de caso-controle empregado, sustenta a hipótese de que a aptidão cardiorrespiratória pode modular a concentração plasmática de glicose em jejum, independentemente de fatores genéticos. Não obstante, é importante abordar algumas limitações do estudo.

Inicialmente em relação ao tamanho amostral, relativamente pequeno, apesar do rastreio populacional de 98 pares na cidade de Rio Claro-SP, que possibilitou a investigação de 38 pares de gêmeos monozigóticos, dos quais 9 foram discordantes para a aptidão cardiorrespiratória. Contudo, o achado de discordância ainda na infância/adolescência não é comum, uma vez que os efeitos epigenéticos tornam as diferenças mais evidentes com o passar do tempo, na idade adulta (FRAGA *et al.*, 2005). Nesse sentido, a identificação de divergências ainda na infância em nível metabólico molecular, podem vir a se tornar fatores de risco no futuro.

Por outro lado, pesquisas têm sido desenvolvidas com amostras maiores (BOUCHARD *et al.*, 1997; BOUCHARD; RANKINEN, 2001; HENDERSON *et al.*, 2012; KELLY *et al.*, 2011; QUEIROGA, 2010), e apesar do número crescente de estudos com o intuito de avaliar fatores de risco para o desenvolvimento de doenças, independente da genética, a utilização do modelo de casos-controle com gêmeos MZ discordantes para aptidão cardiorrespiratória ainda é escasso. Pesquisas que se utilizam de gêmeos discordantes tem utilizado um tamanho amostral variado, com amostras bastante grandes (MUSTELIN *et al.*, 2008; SAMARAS *et al.*, 1999) enquanto outra parte realiza investigações com amostras menores (OPPERT *et al.*, 1995; PIETILÄINEN *et al.*, 2008; RÖNNEMAA *et al.*, 1997; VAAG *et al.*, 1995), e em ambos os casos a avaliação de indivíduos adultos é a mais comum, com diferenças epigenéticas mais evidentes e geralmente estas divergências intra-par são mais discrepantes.

Outra limitação diz respeito ao uso de células sanguíneas ao invés de biópsias de tecido para identificar a metilação de genes. Entretanto, devemos considerar as dificuldades inerentes à faixa etária a qual o estudo investigou, uma vez que seria eticamente e operacionalmente difícil justificar a realização de biópsias em tecidos de crianças saudáveis. Em função disso, a opção foi em verificar a metilação de DNA a partir do sangue periférico, e não nos tecidos.

Nesse sentido, estudos têm sido desenvolvidos no intuito de mostrar que células sanguíneas podem se tornar uma opção para estudos envolvendo metilação de DNA, além da utilização desta análise como um potencial biomarcador. Nesse sentido, tem aumentado o número de estudos com fluídos corporais como urina, lavagem brônquica, leite materno, expectoração, plasma e sangue periférico (SHIVAPURKAR; GAZDAR, 2010). De acordo com Li *et al.* (2012), muitos estudos tem encontrado que a obesidade, dieta e atividade física estão associados com a metilação global do DNA extraído a partir de sangue periférico.

Não obstante, é importante considerar que devido a fácil acessibilidade e ao menor impacto causado na utilização de sangue periférico do que de uma biópsia, o perfil de metilação de genes a partir de sangue periférico pode se tornar uma ferramenta promissora no diagnóstico molecular.

Portanto, considerando as limitações do estudo e os resultados encontrados até o momento, é possível sugerir que o modelo de estudo de caso-controle empregado, sustenta a hipótese de que a aptidão cardiorrespiratória pode modular o metabolismo da glicose na infância e adolescência.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados do presente estudo não mostraram um impacto da aptidão cardiorrespiratória na metilação do gene PRKAA2. Porém, quando fatores genéticos são controlados, crianças e adolescentes com baixa aptidão cardiorrespiratória são suscetíveis a apresentar maior concentração de glicose em jejum. Além disso, a condição de maior VO<sub>2</sub>máx demonstrou influenciar significativamente na relação entre as concentrações sanguíneas de insulina e glicose, independente da metilação do gene PRKAA2. Por outro lado, foi possível observar que no grupo GÊMEO-1 (mais apto que seu co-irmão), existiu uma relação negativa entre metilação do gene PRKAA2 e HDL-C, enquanto que no grupo GÊMEO-2 (menos apto que seu co-irmão) a relação foi positiva entre metilação e CT e LDL-C.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, D.B. *et al.* Fitness is a stronger predictor of fasting insulin levels than fatness in overweight male middle-school children. **J. Pediatric.** v. 150, p. 383-387, 2007.
2. AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE - ACSM. **Manual do ACSM para teste de esforço e prescrição de exercício.** 5. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
3. AMIEL, S.A; SHERWIN, R.S; SIMONSON, D.C; LAURITANO, A.A; TAMBORLANE, W.V. Impaired insulin action in puberty: a contributing factor to poor glycemic control in adolescents with diabetes. **N. Engl. J. Med.** v. 315, p. 215–219, 1986.
4. ASCHENBACH, W.G. *et al.* 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, metabolism and exercise. **Sports Med.** v. 34, p. 91-103, 2004.
5. ASTRAND, P-O; RODAHL, K. **Tratado de fisiologia do exercício.** Rio de Janeiro, 2ª Ed, Guanabara Koogan, 1987.
6. ASTRAND, P-O; RODAHL, K; DAHL, H.A; STROMME, S.B. **Tratado de fisiologia do trabalho.** Porto Alegre. Art Med, 2006.
7. BALL, G.D. *et al.* Insulin sensitivity, cardiorespiratory fitness and physical activity in overweight hispanic youth. **Obes. Res.** v. 12, p. 77-85, 2004.
8. BALL, G.D; *et al.* Insulin sensitivity, insulin secretion and  $\beta$ -cell function during puberty in overweight Hispanic children with a family history of type 2 diabetes. **IJO,** v. 29, p. 1471–1477, 2005.
9. BAIRD, J. *et al.* Testing the fetal origins hypothesis in twins: the Birmingham twin study. **Diabetologia,** New York, v. 44(1), p. 33-9, 2001.
10. BARKER, D.J. The fetal origins of diseases of old age. **Eur. J. Clin. Nutr.,** London, v. 46(3) S3-9, 1992.
11. BEIGUELMAN, B. **O estudo de gêmeos.** Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008.
12. BERGERON, R; PREVIS, S.F. CLINE, G.W. *et al.* Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. **Diabetes.** v. 50, p. 1076-1082, 2001.
13. BERTI, D.A. **Peptídeos intracelulares na obesidade e resistência à insulina.** 2010. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Tecidual - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42134/tde-19052010-131337/pt-br.php>. Acesso julho de 2012.

14. BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet.** v. 9(16), p. 2395-2402, 2000.
15. BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev.** v. 16, p. 6-21, 2002. .
16. BOOMSMA, D. *et al.* Classical twin studies and beyond. **Nat. Rev. Genet.**, London, v. 3(11), p. 872-882, 2002.
17. BOOTH, F.W. *et al.* Exercise and gene expression.: physiological regulation of the human genome through physical activity. **J. Physiol.** v. 543, p. 399-411, 2002.
18. BOOTH, F.W; NEUFER, P.D. Exercise Controls Gene Expression. **American Scientist**, v. 93(1), p. 28-35, 2005.
19. BORG, G. A. V. Psychophysical bases of perceived exertion. **Med. Sci. Sports Exercise**, v. 14, n. 5, p. 377-381, 1982.
20. BOUCHARD, C. *et al.* Familial aggregation of VO<sub>2</sub>max response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. **J. Appl. Physiol.** v.87, p. 1003-1008, 1999.
21. BOUCHARD, C. *et al.* Genetics of aerobic and anaerobic performances. **Exerc. Sport Sci. Rev.** v. 20, p. 27-58, 1992.
22. BOUCHARD, C. *et al.* **Genetics of fitness and physical performance.** Champaign, II Human Kinetics, 1997.
23. BOUCHARD, C. *et al.* Genomic scan for maximal oxygen uptake and its response to training in the HERITAGE Family Study. **J. Appl. Physiol.** v. 88, p. 551-559, 2000.
24. BOUCHARD, C. *et al.* Using MZ twins in experimental research to test for the presence of a genotype environment interaction effect. **Acta Genet Med Gemellol.**, Roma, v.39, p. 85-89, 1990.
25. BOUCHARD, C; RANKINEN, T. Individual differences in response to regular physical activity. **Med. Sci. Sports Exercise.** v. 33, p. 446-451, 2001.
26. BOYKE, E.J; FUJIMOTO, W.Y; LEONETTI, D.L; NEWELL-MORRIS, L.L. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 23, p. 465-472, 2000.
27. CANTÓ, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. **Nature.** v. 458, p. 1056-1062, 2009.

28. CAPRIO, S; BRONSON, M; SHERWIN, R.S; RIFE, R; TAMBORLANE, W.V; Co-existence of severe insulin resistance and hyperinsulinemia in pre-adolescent obese children. **Diabetologia**, v.39, p. 1489–1497, 1996.
29. CAPRIO, S; PLEWE, G; DIAMOND, M.P; SIMONSON, D.C; BOULWARE, S; SHERWIN, R.S; TAMBORLANE, W.V. Increased insulin secretion in puberty: a compensatory response to reductions in insulin sensitivity. **J. Pediatr.**, v. 114, p. 963–967, 1989.
30. CHEN, Z.P *et al.* AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. **Am. J. Physiol.** v. 279, p. 1202-1206, 2000.
31. COKER, R. H. *et al.* Exercise-induced changes in insulin action and glycogen metabolism in elderly adults. **Med Sci Sports Exerc.** v. 38, n. 3, p. 433-8, 2006.
32. CURETON, K. J.; WARREN, G. L. Criterion-Referenced Standards for Youth Health-Related Fitness Tests: A Tutorial. **Res Q Exerc Sport, Reston**, v. 61, n. 1, p. 7-19, 1990.
33. DELA, F. *et al.* Physical training may enhance beta-cell function in type 2 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 287, p. E1024-E1031, 2004.
34. DOUEN, A. G. *et al.* Exercise induces recruitment of the “insulin-responsive glucose transporter”. Evidence for distinct intracellular insulin and exercise recruitable transporter pools in skeletal muscle. **J. Biochem.** v. 265, p. 13427-13430, 1990.
35. EGGER G, LIANG G, APARICIO A, JONES PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature.** v. 429, p. 457-463, 2004.
36. ERIKSSON, K.F; LINDGARDE, F. Poor physical fitness and impaired early insulin response but late hyperinsulinemia, as predictor of NIDDM in middle-aged Swedish men. **Diabetologia.** v. 39, p. 573-579, 1996.
37. ERIKSSON, K.F; LINDGARDE, F. Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmö feasibility study. **Diabetologia.** v. 34, p. 891-898, 1991.
38. ESPADA, J; ESTELLER, M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. **Semin Cell Dev Biol.** v. 21, p. 238-246, 2010.
39. ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nat Rev Genet.** v. 8, p. 286-298, 2007.
40. FERNANDES, S.C.C; MAIA, J. A. R. (Org). **O código relacional na atividade física e aptidão associada à saúde. Efeitos genéticos e ambientais.** Porto-PT, Artes gráficas, 2006.

41. FLEISCH, A.F. *et al.* Environmental epigenetics: a role in endocrine disease? **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 49, p, 61–67, 2012.
42. FRAGA, M.F. *et al.* Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 102, p, 10604-10609, 2005.
43. FRIEDEWALD, W. T. *et al.* Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin Chem.*, v. 18, p. 499-502, 1972.
44. FUJII, N. *et al.* Exercise induces isoform-specific increase in 5' AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 273, p. 1150-1155, 2000.
45. GRAY, S.G. *et al.*, The insulin-like growth factors and insulin-signalling systems: na appealing target for breast câncer therapy? **Horm. Metab. Res.**, v.35(11-12), p. 857-871, 2003.
46. GREENFIELD, J. R. *et al.* Physical activity reduces genetic susceptibility to increased central systolic pressure augmentation: a study of female twins. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v.42(2), p. 264-270, 2003.
47. GORAN, M.I; GOWER, B.A. Longitudinal study on pubertal insulin resistance. **Diabetes**, p. 2444–2450, 2001.
48. GORDON, C. C. *et al.* Stature, recumbent length, and weight. In: LOHMAN, T. G; ROCHE, A. F; MARTORELL, R. **Anthropometric standardization reference manual**. Champaign: Human kinetics, p.39-54, 1991.
49. GUO, S-W. Does higher concordance in monozygotic twins than in dizygotic twins suggest a genetic component? **Hum Hered.**, Basel, v. 51(3) p. 121-32, 2001.
50. HANDEL, A.E; EBERS, G.C; RAMAGOPALAN, S.V. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. **Trends Mol Med.** v. 16, p. 7-16, 2010.
51. HARDIE, D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** v. 8, p. 774-785, 2007.
52. HARDIE, D.G. Plenary Lecture Energy sensing by the AMP-activated protein kinases and its effects on muscle metabolism. **Proceedings Nutr. Society.** v. 70, p. 92-99, 2011.
53. HAWKES, C. H. Twin studies in medicine--what do they tell us? **Q. J. Med.**, Oxford, v. 90(5), p. 311-321, 1997.

54. HAYASHI, T. *et al.* Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. **Diabetes**. v. 49, p. 527-531, 1999.
55. HENDERSON, M.; *et al.* How Are Physical Activity, Fitness, and Sedentary Behavior Associated With Insulin Sensitivity in Children? **Diabetes Care**. v. 35, p. 1272–1278, 2012.
56. HENRIKSSON, J. Muscle fuel selection: effect of exercise and training. *Proc. Nutr. Soc.* v. 54, p. 125-138, 1995.
57. HILL, A. V, JEFFREYS, A. J. Use of minisatellite DNA probes for determination of twin zygosity at birth. **Lancet**, v. 2, n. 8469(70), p. 1394-1395, 1985.
58. HOLLIDAY, R; PUGH, J.E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science**. v. 187(4173), p. 226-232, 1975.
59. HOLLOSZY, J.O. A forty-year memoir of research on the regulation of glucose transport into muscle. **Am. J. Physiol.** v. 284, p. 453-467, 2003.
60. HUNTER, T. Signaling-2000 and beyond. **Cell**, v. 100(1), p. 113-137, 2000.
61. HUOT, M. *et al.* Insulin Resistance, Low Cardiorespiratory Fitness, and Increased Exercise Blood Pressure Contribution of Abdominal Obesity. **Hypertension**. v. 58, p.1036-1042, 2011.
62. KAHN, B.B. *et al.* AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding metabolism. **Cell Metabolism**. v. 01, p. 15-25, 2005.
63. KAHN, S.E. The Importance of  $\beta$ -Cell Failure in the Development and Progression of Type 2 Diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, p. 4047–4058, 2001.
64. KANG, H. S. *et al.* Physical training improves insulin resistance syndrome markers in obese adolescents. **Med Sci Sports Exerc**. v. 34, n. 12, p. 1920-1927, 2002.
65. KANZAKI, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. **Endocr. J.**, v. 53(3), p. 267-293, 2006.
66. KAZA-VUBU, J.Z. *et al.* Cardiovascular fitness and exercise as determinants of insulin resistance in postpubertal adolescent females. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 90, p. 849-854, 2005.
67. KELLEY, D.E; MANDARINO, L.J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. **Diabetes**. v. 49, p. 677-683, 2000.

68. KELLY, L.A. *et al.* Pubertal Changes of Insulin Sensitivity, Acute Insulin Response and  $\beta$ -Cell function in Overweight Latino Youth. **J. Pediatr.** v.158(3), p. 442–446, 2011.
69. KHOLODENKO, B.N. Cell-signalling dynamics in time and space. **Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.**, v. 7(3), p. 165-176, 2006.
70. KIENS, B. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. **Physiol. Rev.** v. 86, p. 205-243, 2006.
71. LAAKSONEN, D. E. *et al.* Low levels of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness predict development of the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 25, p. 1612-18, 2002.
72. LAKKA, T; BOUCHARD, C. Genetics, physical activity, fitness and health: what does the future hold? **J. Royal Soc. Prom. Health.** v. 124, p. 14-15, 2004.
73. LAKKA, T. A. *et al.* Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and changes in glucose homeostasis in response to regular exercise in nondiabetic individuals: the HERITAGE family study. **Diabetes.** v. 53 (6) p. 1603-1608, 2004.
74. LANGLEY-EVANS, S.C; McMULLEN, S. Developmental Origins of Adult Disease. **Med Princ Pract.** v.19, p. 87–98, 2010.
75. LEADER, J.E; WANG, C.; FU, M.; PESTELL, R.G. Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors. **Biochemical Pharmacology.** v.76, p. 1589-1596, 2006.
76. LEE, S. *et al.* Cardiorespiratory Fitness Attenuates Metabolic Risk Independent of Abdominal Subcutaneous and Visceral Fat in Men. **Diabetes Care.** v. 28, p. 895-901, 2005.
77. LEE, S. *et al.* Cardiorespiratory Fitness in youth: relationship to insulin sensitivity and beta-cell function. **Obesity.** v. 14, p. 1579-1585, 2006.
78. LEITE, S.A.O. *et al.* Low cardiorespiratory fitness in people at risk for type 2 diabetes: early marker for insulin resistance. **Diabetology & Metab. Syndrome.** 2009.
79. LI, L. *et al.* DNA methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology. **J. Epidemiol.** v. 22(5), p. 384-394, 2012.
80. LONG, Y.C. *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression. Of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse White skeletal muscle. **Diabetologia.** v. 48, p. 2354-2364, 2005.
81. LONG, Y.C.; ZIERATH, J.R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. **J. Clin. Invest.** v. 116, p. 1776-1783, 2006.

82. LOOS, R. J. *et al.* Twin studies and estimates of heritability. **Lancet**, Minneapolis, v. 357(9266) p. 1445, 2001.
83. LUND, S. *et al.* Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT 4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.92, p. 5817-5821, 1995.
84. MacGREGOR, A. J. *et al.* Twins. Novel uses to study complex traits and genetic diseases. **Trends Genet.** v. 16 (3) p. 131-4, 2000.
85. MALINA, R.M; BAR-OR, O; BOUCHARD, C. **Crescimento, maturação e atividade física.** Ed. Phorte. São Paulo, 2009.
86. MATTHEWS, D.R.H.J.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F.; TURNER, R.I. Homeostasis model assessment, insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. **Diabetologia.** v. 28, p. 412-419, 1985.
87. MARTIN, G. M. Epigenetic drift in aging identical twins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 102(30), p. 10413-10414, 2005.
88. McGARRY, J.D.; BROWN, N.F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. **Eur. J. Biochem.** v. 244, p. 1-14, 1997.
89. McGEE, S.L. *et al.* Exercise increase nuclear AMPK $\alpha_2$  in human skeletal muscle. **Diabetes.** v. 52, p. 926-928, 2003.
90. McGEE, S.L. *et al.* Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. **J. Physiol.** v. 587 (24), p. 5951-5958, 2009.
91. MERRILL, G.F. *et al.* AICA ribose increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. **Am. J. Physiol.** v. 273, p. 1107-1112, 1997.
92. MOOREN, F.C; VÖLKER, K. **Fisiologia do Exercício Molecular e Celular.** São Paulo. Ed. Santos, 2012.
93. MU, J. *et al.* A role for AMP-activated protein kinase in contraction and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. **Mol. Cell.** v. 7, p. 1085-1094, 2001.
94. MUSTELIN, L. *et al.* Acquired obesity and poor physical fitness impair expression of genes of mitochondrial oxidative phosphorylation in monozygotic twins discordant for obesity. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 295, n. 1, p. E148-54, 2008.
95. NAKAJIMA, K. *et al.* Exercise effects on methylation of ASC gene. **Int. J. Sports Med.** v. 31, p. 671-675, 2010.

96. NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS - NCHS. **The NHANES Cardiovascular Fitness Procedure Manual**. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics, 2004. Disponível: <http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/cv.pdf>. Acesso maio de 2009.
97. NAGANO, M. *et al.* The contribution of cardiorespiratory fitness and visceral fat to risk factors in japanese patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. **Metabolism**. v. 53, p, 644-649, 2004.
98. NYHOLM, B. *et al.* Insulin resistance in relatives of NIDDM patients: the role of physical fitness and muscle metabolism. **Diabetologia**. v. 39, p. 813-822, 1996.
99. OPPERT, J. M. *et al.* Plasma glucose, insulin, and glucagon before and after long-term overfeeding in identical twins. **Metabolism**, Philadelphia, v. 44(1), p. 96-105, 1995.
100. OSLER, M.E; ZIERATH, J.R. Minireview: Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. **Endocrinology**. v. 149(3), p. 935-941, 2008.
101. PARK, H. *et al.* Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 32571-32577, 2002.
102. PARSONS, T. J. *et al.* Childhood predictors of adult obesity: a systematic review. **Int J Obes Relat Metab Disord**. v. 23(8), p. S1-107, 1999.
103. PIETILÄINEN, K.H. *et al.* Global transcript profiles of fat in monozygotic twins discordant for BMI: pathways behind acquired obesity. **PLoS Med.**, New York, v.5(3), p. e51, 2008.
104. PILSNER, J.R. *et al.* Genomic methylation of peripheral blood leukocyte DNA: influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 86, p. 1179-1186, 2007.
105. PHILLIPS, D.I. Twin studies in medical research: can they tell us whether diseases are genetically determined? **Lancet**, Minneapolis, v. 341(8851) p. 1008-1009, 1993.
106. POLD, R. *et al.* Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats. **Diabetes**. v. 54, p. 928-934, 2005.
107. QUEIROGA, M.R. **Análise da expressão de genes em gêmeos monozigóticos: impacto da aptidão cardiorrespiratória**. 2010. Tese de Doutorado em Biodinâmica da Motricidade Humana - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista— Rio Claro, 2010. Disponível em:



- <http://www.acervodigital.unesp.br/handle/123456789/38901>. Acesso em maio de 2011.
108. RAMOS-ARROYO, M. A. *et al.* Twin study: relationship between birth weight, zygosity, placentation, and pathologic placental changes. **Acta Genet Med Gemellol.**, Roma, v. 37(3-4), p. 229-238, 1988.
  109. RICHTER, E.A. *et al.* Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. **J. Physiol.** v.535, p. 313-322, 2001.
  110. RIGGS, A.D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. **Cytogenet Cell Genet.**; v. 14(1), p. 9-25, 1975.
  111. RODRIGUES, A. N. *et al.* Valores de consumo máximo de oxigênio determinados pelo teste cardiopulmonar em adolescentes: uma proposta de classificação. **J Pediatr.**, Rio Janeiro, v. 82, n.6, p. 426-430, 2006.
  112. RÖNNEMAA, T. *et al.* Glucose metabolism in identical twins discordant for obesity. The critical role of visceral fat. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v.82(2), p. 383-387, 1997.
  113. ROSS, C. N. Twins and the fetal origins hypothesis. Fetal insult may cause vascular changes and growth retardation. **Br. J. Nutr.**, London, v. 319(7208), p. 517-518, 1999.
  114. ROTTACH, A; LEONHARDT, H; SPADA, F. DNA methylation-mediated epigenetic control. **J Cell Biochem.** v. 108, p. 43-51, 2009.
  115. ROWLAND, T. W. **Fisiologia do exercício na criança.** São Paulo: Editora Manole, 2008.
  116. RUBINIK, D.S; WINDER, W.W. Effect of phosphorylation by AMP-activated protein kinase on palmitoyl-CoA inhibition of skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. **J. Appl. Physiol.** v. 98, p. 1221-1227, 2005.
  117. RUDERMAN, N. B. *et al.* Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. **Am. J. Physiol.** v. 276, p. E1-E18, 1999.
  118. RUIZ, J.R. *et al.* Markers of insulin resistance are associated with fatness and fitness in school-aged children: the European Youth Heart Study. **Diabetologia.** v. 50, p. 1401-1408, 2007.
  119. SAHA, A.K. *et al.* Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 24279-24283, 2000.

120. SAMARAS, K. *et al.* Genes versus environment: the relationship between dietary fat and total and central abdominal fat. **Diabetes Care**, Alexandria, v.21, p. 2069-2076, 1998.
121. SAMARAS, K. *et al.* Genetic and environmental influences on total-body and central abdominal fat: the effect of physical activity in female twins. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 130, p. 873-882, 1999.
122. SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell.**, v. 103(2), p. 211-225, 2000.
123. SHIVAPURKAR, N; GAZDAR, A.F. DNA methylation based biomarkers in non-invasive cancer screening. **Curr. Mol. Med.** v.10, p. 123-132, 2010.
124. SPENCER-JONES, N.J. *et al.* AMP-kinase  $\alpha 2$  subunit gene PRKAA2 variants are associated with total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol and high density lipoprotein-cholesterol in normal women. **J. Med. Genet.** v. 43, p.936-942, 2006.
125. STEPHENS, T.J. *et al.* Progressive increase in human skeletal muscle AMPK $\alpha 2$  activity and ACC phosphorylation during exercise. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 282, p. 688-694, 2002.
126. STORLIEN, L. Metabolic flexibility. **Proc. Nutr. Soc.** v. 63, p. 363-368, 2004.
127. STRATHDEE G; BROWN, R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. **Expert. Rev. Mol. Med.** v. 4(4), p. 1-17, 2002.
128. STROUP, D.; RAMSARAN, J.R. Cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase is phosphorylated at multiple amino acids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 329, p. 957-965, 2005.
129. TERAN-GARCIA, M. *et al.* Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 288, p. E1168-E1178, 2005.
130. TOURINHO, F.H; TOURINHO, L.S. Crianças, adolescentes e atividade física: aspectos maturacionais e funcionais. **Rev. Paul. Educ. Fís.** v. 12, p. 71-84, 1998.
131. VAAG, A. *et al.* Insulin secretion, insulin action, and hepatic glucose production in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Invest.**, New Haven, v.95(2), p. 690-698, 1995.
132. VAISSIÈRE, T; SAWAN, C; HERCEG, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. **Mutat Res.** v. 659, p. 40-48, 2008.

133. VILLENA, J.A. *et al.* Induced adiposity and adipocyte hypertrophy in mice lacking the AMP-activated protein kinase alpha 2 subunit. **Diabetes**. v. 53, p. 2242–2249, 2004.
134. VIOLLET, B. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. **J. Physiol**, v. 574(1) p. 41–53, 2006.
135. VIOLLET, B. *et al.* The AMP-activated protein kinase alpha 2 catalytic subunit controls whole body insulin sensitivity. **J. Clin. Invest.** v.111, p.91–98, 2003.
136. WATERLAND, R. A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **J Nutr.**v.136(6), p. 1706S–1710S, 2006.
137. WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Mol Cell Biol.** v.23(15), p. 5293–5300, 2003.
138. WATSON, R. T; PESSIN, J.E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 56, p. 175-193, 2001.
139. WEI, M. *et al.* The association between cardiorespiratory fitness and impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus in men. **Ann Intern Med., Philadelphia**, v. 130, n. 2, p. 89-96, 1999.
140. WILLIAMS, S; POULTON, R. Twins and maternal smoking: ordeals for the fetal origins hypothesis? A cohort study. **Br. J. Nutr.**, London, v. 318(7188) p. 897-900, 1999.
141. WINDER, W.W. Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** v. 91, p. 1017-1028, 2001.
142. WINDER, W.W. *et al.* Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase. **A. J. Appl. Physiol.** v. 82, p. 219-225, 1997.
143. WINDER, W.W.; HARDIE, D.G. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. **Am. J. Physiol.** v. 270, p. 299-304, 1996.
144. WOJTASZEWSKI, J.P.F. *et al.* Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. **J. Physiol.** v. 528(8), p. 221-226, 2000.
145. WOLFFE, A.P; GUSCHIN, D. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. **Journal of Structural Biology**, v.129, p, 102–122, 2000.

146. YU, X. *et al.* Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. **Diabetologia**. v. 47, p. 2012-2021, 2004.
147. ZEISEL, S.H. Importance of methyl donors during reproduction. **Am. J. Clin. Nutr.** v.89(2), p. 673S-7S, 2009.
148. ZHANG, F.F. *et al.* Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. **Epigenetics**. v. 6(3), p. 293-299, 2011.
149. ZHAO, J. *et al.* Global DNA methylation is associated with insulin resistance a monozygotic twin study. **Diabetes**, v. 61, p. 542–546, 2012.
150. ZHU, J.K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. **Annu. Rev. Genet.** v. 43, p. 143-166, 2009.

**Protocolo nº: 5093 (20-08-09)****Data Registro CEP: 21-08-2009**

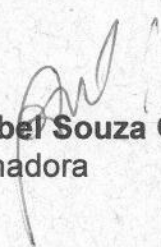
Rio Claro, 1º de setembro de 2009.

Ofício CEP 110/2009

Prezado Senhor,

Aprovo "ad referendum" do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro (CEP-IB-UNESP), o projeto de pesquisa intitulado "*Interações entre atividade física e aptidão física na herdabilidade de marcadores moleculares e bioquímicos relacionados à sensibilidade à insulina: estudo em gêmeos*", sob sua responsabilidade –colaboradores: Mário Hiroyuki Hirata; Marcos Roberto Queiroga e Ricardo Augusto Barbieri, protocolo 5093 de 20.08.2009, data de registro CEP 21.08.2009.

Atenciosamente,

  
Prof. Dra. **Maria Izabel Souza Camargo**  
Coordenadora

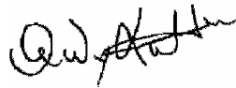
Ilmo. Sr.

**Prof. Dr. EDUARDO KOKUBUN**DD. Docente do Departamento de Educação Física – I.B.  
UNESP - CRC

**AUTORIZAÇÃO**

Autorizamos o aluno Anderson Vulczak, matriculado no Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UNICENTRO, a utilizar o material biológico proveniente do projeto de pesquisa “Interações entre Atividade Física e Aptidão Física na herdabilidade de marcadores moleculares e bioquímicos relacionados a sensibilidade á insulina: estudo em gêmeos”, com o objetivo de Investigar o padrão de metilação da região promotora do gene *IL-8* em gêmeos monozigóticos. O projeto possui como coordenador o professor Dr. Eduardo Kokubun e como colaboradores o Professor Dr. Mario Hiroyuki Hirata, Dr. Marcos Roberto Queiroga e Ms. Ricardo Augusto Barbieri.

Rio Claro, 25 de maio de 2011



Dr. Eduardo Kokubun



Dr. Mario Hiroyuki Hirata



Marcos Roberto Queiroga



Ms. Ricardo Augusto Barbieri