



**GILBERTO SANTOS MORAIS JUNIOR**

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE O PERFIL  
INFLAMATÓRIO E DE METILAÇÃO DE DNA EM IDOSOS  
DIABÉTICOS USUÁRIOS DE METFORMINA**

**BRASÍLIA - DF**

**2021**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**GILBERTO SANTOS MORAIS JUNIOR**

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE O PERFIL  
INFLAMATÓRIO E DE METILAÇÃO DE DNA EM IDOSOS  
DIABÉTICOS USUÁRIOS DE METFORMINA**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Área de concentração: Fisiopatologia Médica  
Orientador: Dr. Otávio de Toledo Nóbrega

**BRASÍLIA - DF**

**2021**

**GILBERTO SANTOS MORAIS JUNIOR**

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE O PERFIL  
INFLAMATÓRIO E DE METILAÇÃO DE DNA EM IDOSOS  
DIABÉTICOS USUÁRIOS DE METFORMINA**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Aprovado em: 12/ julho / 2021

**BANCA EXAMINADORA**

Otávio de Toledo Nóbrega – Presidente  
Universidade de Brasília

Jorge Luís L Zeredo – Membro Interno  
Universidade de Brasília

Aparecido Pimentel Ferreira – Membro Externo  
Centro universitário ICESP

Ciro Martins Gomes – Membro Externo  
Universidade de Brasília

Ciro José Brito – Suplente  
Universidade de Juiz de Fora

**BRASÍLIA - DF**

**2021**

*A minha mãe Eucaristia, que sempre me ensinou o  
caminho do bem e a sempre buscar meus  
sonhos.*

*Aos meus irmãos, Kátia e Ricardo pelo companheirismo  
de sempre.*

*Aos meus afilhados, Arthur (in memoriam) e Lara por  
tornarem minha vida mais alegre.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao nosso bom Deus, por toda a saúde, inspiração e pelo dom da vida.

A minha Mãe, por toda a educação, apoio e incentivo incondicionais prestados ao longo de toda a minha vida. Mãe dedico a senhora essa Tese, pois foi a senhora quem sempre me incentivou a seguir esse árduo caminho.

Aos meus Irmãos Kátia e Ricardo, por todo apoio, suporte prestado ao longo desses quatro anos do doutorado, até na minha ausência vocês se mostraram presentes.

Ao meu amigo e orientador Prof. Otávio, por toda a paciência, ensinamentos, conselhos e incentivos prestados, pois tudo isso contribuiu para eu me tornar o profissional que sou hoje. Obrigado grande mentor e amigo, você é um ser humano incrível.

Aos amigos e mentores Prof. Ciro e Prof. Roberto Jerônimo, por todo o aprendizado e incentivos prestados ao longo da minha vida acadêmica. Sim, foi devido aos exemplos de vida de vocês que me fizeram trilhar esse caminho. Obrigado meus amigos, vocês demais.

Aos meus amigos Vinícius e Lorena, por todo o acolhimento, apoio e suporte prestado ao longo dos anos que passei no Distrito Federal, saibam que a amizade de vocês tornou mais fácil a minha vida na capital. Obrigado meus amigos vocês são seres humanos incríveis.

As grandes amigas do grupo de pesquisa de Brasília, Vinícius Carolino, Clayton Franco, Audrey Tonet, Willian Khalil, Einstein Camargos, Adriane Dallanora, Wilcelly Machado, Gleiciane Contijo, Elisa de Souza, por todo o acolhimento e aprendizado durante esse período. Sim vocês contribuíram diretamente para essa pesquisa.

Aos amigos Andressa Melo, Danilo Moraes, Josy e Walfran, vocês estiveram durante todo o processo de coleta de dados, tornando possível essa pesquisa.

Cabe aqui também agradecer a todos os idosos que de livre e espontânea vontade participaram da pesquisa, sem os senhores nada disso seria possível e não poderia esquecer de agradecer a todo o suporte da Secretaria de Saúde de Cedro de São João em especial ao secretário de saúde e também amigo de mestrado Danilo Moraes.

A quaisquer outros que embora não foram citados, mas participaram direta ou indiretamente dessa conquista.

O meu mais sincero sentimento de gratidão a todos vocês.

*“O grande inimigo do conhecimento não é a ignorância, é a ilusão de ter conhecimento”*

*Stephen Hawking*

## RESUMO

**Introdução:** O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é responsável por uma alteração no padrão inflamatório e de metilação de DNA no organismo em idosos, em contrapartida o treinamento resistido juntamente com o uso de metformina parece exercer um efeito positivo sobre essas alterações. **Objetivo:** Analisar o efeito agudo do treinamento resistido sobre o perfil inflamatório e sobre a metilação do DNA em pacientes idosos com DM2 usuários de metformina. **Métodos:** Foram estudados 23 idosos de ambos sexos ( $68,2 \pm 5,3$  anos), sendo 13 com DM2 tratada com metformina (D) e 10 não diabéticos (ND). Os participantes foram submetidos a um protocolo de treinamento resistido em forma de circuito, com 8 exercícios, na configuração de alternado por segmento com 40 minutos de realização, apresentados em 3 series de 40" execução, com um intervalo de 20" de descanso por exercício. **Resultados:** Houve maior concentração sérica de IL-10 basal no grupo D em relação ao ND ( $p = 0,019$ ). Um aumento em IL-6 ocorreu após a intervenção no grupo D ( $p = 0,035$ ). Nenhum efeito foi observado sobre a metilação total do DNA ( $1,7 \pm 0,8$  vs  $1,7 \pm 1,1$  para D e ND, respectivamente). **Conclusão:** O protocolo de exercício agudo aplicado modula a concentração circulante de IL-10 e IL-6 em idosos com DM2 em uso corrente de metformina e sem paralelo entre idosos não diabéticos, não tendo sido observadas alterações no padrão epigenético dos sujeitos.

**Palavras-chave:** diabetes, exercício físico, interleucina-6, idosos, metilação de DNA.



## ABSTRACT

**Introduction:** Type 2 diabetes mellitus (DM2) is responsible for an alteration in the inflammatory pattern and DNA methylation in the body in the elderly, in contrast, resistance training together with the use of metformin seems to exert a positive effect on these alterations. **Objective:** This study aimed to analyze the effect of acute resistance training on the inflammatory profile and on DNA methylation in elderly patients with T2DM using metformin. **Methods:** For this purpose, 23 male and female older adults ( $68.2 \pm 5.3$  yrs.), 13 with controlled T2DM+metformin (D) and 10 nondiabetics (ND). Participants underwent a circuit-shaped resistance training protocol, with 8 exercises, in the alternating configuration per segment with 40 minutes of performance, presented in 3 series of 40" execution, with a 20" rest interval per exercise. **Results:** The main results indicated a significant difference between groups for baseline IL-10, with a higher concentration in group D compared to ND ( $p=0.019$ ). An increase in IL-6 concentration after intervention was observed in group D ( $p=0.035$ ). No effect was observed in total DNA methylation ( $1.7 \pm 0.8$  and  $1.7 \pm 1.1$ ; for D and ND respectively). **Conclusion:** This acute exercise protocol applied modulate the IL-10 and IL-6 concentration in elderly with T2DM and metformin use, with no effect on non-diabetic elderly. No effects were observed in DNA methylation.

**Keywords:** diabetes, physical exercise, Interleukin-6, elderly, DNA Methylation.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Mecanismos da metilação de DNA com os fatores ambientais.....	33
<b>Figura 2:</b> Esquematização do metabolismo da glicose dependente de insulina na musculatura esquelética.....	37
<b>Figura 3</b> - Desenho esquemático da distribuição amostral.....	45
<b>Figura 4</b> - Cálculo da zona-alvo do treinamento.....	46
<b>Figura 5</b> - Comparação entre grupos das leituras absolutas das citocinas, em diferentes momentos de mensuração.....	52
<b>Figura 6</b> - Comparação de log-transformado para IL-6.....	53

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Caracterização antropométrica da amostra por sexo.....	50
<b>Tabela 1 -</b> Caracterização clínica e bioquímica basal dos grupos diabéticos e não diabéticos.....	51

## Lista de Abreviaturas e Siglas

- 5-mC**- 5 metilcitosina
- ADA**- Associação Americana de Diabetes
- AGEs** - Produtos finais de glicação
- CC**- Circunferência da cintura
- CGIs** - Ilhas de CpGs
- CQ**- Circunferência do quadril
- D**- Diabéticos
- DM**- Diabetes Mellitus
- DM1**- Diabetes Mellitus do tipo 1
- DM2**- Diabetes Mellitus do tipo 2
- DMRs** - Regiões diferencialmente metilada
- DNA**- Ácido Desoxirribonucleico
- EDTA**- Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
- FC<sub>máx</sub>**- Frequência cardíaca máxima
- FC<sub>rep</sub>**- Frequência cardíaca de repouso
- FC<sub>reserva</sub>**- Frequência cardíaca de reserva
- GAPDH** - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GLUT4** - Transportador de glicose tipo 4
- HDAC** - Histona deacetiltransferase;
- HDL** - Colesterol de lipoproteína de alta densidade
- IBGE** – Instituto brasileiro de geografia e estatística
- IFN- $\gamma$** - Interferon- $\gamma$
- IL-2**- Interleucina 2
- IL-4**- Interleucina 4
- IL-6**- Interleucina 6
- IL-10**- Interleucina 10
- IMC**- Índice de massa corporal

**IRS-1** - Substrato do receptor de insulina

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**MeCP2** - Proteína de ligação metil CpG-2.

**mG3PDH** - Mitocôndria glicerol fosfato desidrogenase

**MODY** - Maturity Onset Diabetes of the Young

**NADH** - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

**NAPDH** - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

**NCor** - Nuclear receptor correspondente

**ND**- Não diabéticos

**NF-kB** - Fator nuclear kappa B

**OMS**- Organização Mundial da Saúde

**PAI-1** - Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1

**PDH** - Piruvato desidrogenase.

**PI3K** - Fosfoinositido 3-quinase.

**PKC** - Proteína quinase C

**PPARGC1A** - Receptor ativador-proliferador de peroxissoma, coativador gama 1

**QRMDNA**- Quantidade relativa de DNA metilado

**RAGEs** - Receptores para AGEs

**RCQ** - Relação Cintura-Quadril

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio

**RPM**- Rotações por minuto

**TCLE**- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TNF- $\alpha$** - Fator de necrose tumoral- $\alpha$

**TGF- $\beta$ 1** – Fator de necrose tumoral-1 $\beta$

## Sumário

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
<b>2.1 – DIABETES MELLITUS</b> .....	19
2.1.1 – EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.1.2 – FISIOPATOLOGIA, TIPOS, COMPLICAÇÕES E TRATAMENTO.....	21
2.1.3 – METFORMINA E INFLAMAÇÃO .....	28
2.1.4 – CITOCINAS E DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	29
<b>2.2 – METILAÇÃO DO DNA</b> .....	31
2.2.1 – CONCEITOS E CONSEQUÊNCIAS DA METILAÇÃO DO DNA.....	31
2.2.2 – METILAÇÃO DE DNA E DIABETES MELLITUS .....	32
2.2.3 – METILAÇÃO E METFORMINA .....	35
<b>2.3 – EXERCÍCIO FÍSICO</b> .....	36
2.3.1 – EXERCÍCIO, DIABETES MELLITUS E CITOCINAS .....	36
2.3.2 – EXERCÍCIO E METILAÇÃO DO DNA .....	40
<b>3 – JUSTIFICATIVA</b> .....	42
<b>4 – OBJETIVO</b> .....	43
4.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>5 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
5.1 – DESENHO EXPERIMENTAL.....	44
5.2 – AMOSTRA .....	44
5.3 – MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS.....	45
5.4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	45
5.5 – TREINAMENTO RESISTIDO EM CIRCUITO .....	46
5.6 – PROCEDIMENTO DE COLETA SANGUÍNEA.....	47
5.7 - CONTROLE GLICÊMICO E PERFIL INFLAMATÓRIO .....	48
5.8 – EXTRAÇÃO E METILAÇÃO DE DNA.....	48
5.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
<b>6 – RESULTADOS</b> .....	50
<b>7 – DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>8 – CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	57

**ANEXO A – ARTIGO APROVADO NO PERIÓDICO NEUROIMMUNOMODULATION.....75**

## 1 – INTRODUÇÃO

Atualmente a população de idosos vem crescendo rapidamente no mundo. Durante esse processo de envelhecimento o corpo humano passa por uma série de alterações, fisiológicas e metabólicas naturais que podem levar a pessoa idosa a um estado de doença, fator que pode contribuir com o aumento do risco de mortalidade dessa população (1). Dentre essas alterações, são destacadas: a diminuição das capacidades funcionais dos órgãos e tecidos; alterações nas funções metabólicas; diminuição da massa óssea; sarcopenia e a diminuição/redistribuição da gordura corporal (2, 3). Essas alterações levam o idoso a um estado de inatividade física e, conseqüentemente, ao aumento do risco de acometimento por doenças crônicas degenerativas, principalmente o diabetes (4-6).

O diabetes mellitus (DM) é um conjunto de distúrbios metabólicos resultantes da não produção de insulina e do defeito na ação da insulina produzida (7). Devido a sua fisiopatologia, o DM induz o corpo humano a uma série de complexas modificações metabólicas, vasculares e neurológicas, e a associação desses três fatores comprometem a função vascular levando o indivíduo a sofrer complicações cardiovasculares aumentando os índices de morbidade e mortalidade da população portadora do DM (8).

O DM é um problema de saúde mundialmente conhecido, estima-se que a população de portadores do DM seja da ordem de 387 milhões de pessoas, podendo alcançar a casa dos 471 milhões de diabéticos até o ano de 2030, este crescimento é reflexo do envelhecimento populacional, bem como o aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo (9). No Brasil, os resultados da pesquisa nacional de saúde evidenciaram a influência da idade sobre a prevalência do DM, sendo observado um aumento significativo de 2,7% na faixa etária dos 30 aos 59 anos para 17,4% para a população entre 60 e 69 anos, evidenciando a alta prevalência do DM nos idosos (10).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), juntamente com a Associação Americana de Diabetes (ADA), classifica o DM em quatro formas distintas: DM do tipo 1 (DM1), DM do tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e o DM gestacional (11). O DM2, é a forma mais comum da doença, é responsável por 90 a 95% dos casos, sendo caracterizado por defeitos na regulação da produção de



glicose no fígado e deficiências na ação da insulina produzida pelo pâncreas, tendo como consequência a menor captação de glicose para dentro da célula, resultando em um estado de hiperglicemia sistêmica (11). Esta condição está diretamente associada à predisposição genética, à inatividade física e aos maus hábitos alimentares (7, 12).

Evidências científicas indicam que a resistência à insulina está associada à ativação inespecífica do sistema imune, promovendo inflamação subclínica crônica, embora os mecanismos associados ainda não estejam totalmente descritos (13, 14). Pacientes com DM2 geralmente apresentam níveis diferenciados de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e de mediadores anti-inflamatórios, como interleucina-4 e -10 (IL-4 e IL-10), acompanhado de desequilíbrio de outros marcadores como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (15, 16). Além disso, outros estudos indicam que o desenvolvimento do DM2 está diretamente associado a fatores epigenéticos (17, 18), sob a forma de um padrão diferencial de metilação do DNA (19, 20).

A metilação do DNA geralmente ocorre por uma adição covalente de um grupo metila no anel de carbono das citosinas incorporadas ao DNA (produzindo 5-metilcitosina, ou 5-mC) encontrada quase exclusivamente no contexto de dinucleotídeo simulado emparelhado CpG (19). Evidências científicas sugerem que a metilação desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo humano, bem como no desenvolvimento do DM2 (21, 22). Estudos realizados por Nilsson et al (23) e Ribel-Madsen et al (24) revelaram um padrão geral diferenciado de metilação de DNA nos tecidos muscular e adiposo de pacientes com DM2 quando comparados com um grupo controle. Há também uma mudança na expressão de genes específicos essenciais ao metabolismo, e essa diferença está associada à menor proliferação de células  $\beta$  pancreáticas e à secreção de insulina, prejudicando o DM2 (25).

O tratamento clínico do DM2 visa controlar os níveis glicêmicos, pressóricos e lipêmicos, bem como prevenir complicações da doença, sendo compreendido em duas formas: farmacológica e não farmacológica. O primeiro envolve o uso de drogas hipoglicemiantes, como a metformina, que visa reduzir os níveis glicêmicos do paciente, suprimindo a gliconeogênese hepática (26). O tratamento não farmacológico envolve a adoção de prática regular de exercícios físicos e modificações dietéticas (11, 27). Evidências científicas mostram que pacientes

diabéticos submetidos a diferentes protocolos de exercícios físicos (cardiovasculares ou treinamento resistido, por exemplo) e com intensidades diferentes (moderadas a altas) apresentam aumento da sensibilidade à insulina e redução efetiva da pressão arterial e características antropométricas (28).

## **2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 – DIABETES MELLITUS**

#### **2.1.1 – EPIDEMIOLOGIA**

A população vem passando por uma transformação epidemiológica nos últimos anos, onde contingente idoso cresce em proporção quando comparado a décadas passadas. Assim torna-se de fundamental importância o incentivo à adoção de políticas públicas voltadas para a terceira idade, que tenham como principal objetivo a adoção e incentivo de práticas regulares de exercício físico, bem como a adoção de uma alimentação saudável com a finalidade de minimizar os efeitos advindos do processo de envelhecimento (29, 30).

No Brasil, dados do instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE) dão conta de que em 1960 o número da população idosa atingia a marca de 3 milhões, com um acréscimo de 24 milhões nas últimas 4 décadas (31). Assim, tendo em vista o rápido aumento da população idosa, e sabendo que com o processo de envelhecimento o corpo humano sofre uma série de modificações morfo-fisiológicas que acabam comprometendo o bom funcionamento do organismo (2, 3). Tais fatores somados aos altos índices de inatividade física levam o idoso ao aumento do risco das doenças crônicas degenerativas com o Diabetes Mellitus (DM) (5).

Em 1980 a organização mundial da saúde estimava que 108 milhões de pessoas viviam com o DM, sendo que esse número poderia quadruplicar até 2014 (32). Em 2017, o número de pessoas com DM atingiu a marca de 425 milhões no intervalo etário entre 20-79 anos de idade em todo o mundo, com a projeção de que esse número pode alcançar a marca de 629 milhões em 2045 (33). Em idosos, estima-se que possam ocorrer a partir de 2017 uma média anual de mortes de 5 milhões em decorrência das complicações do DM (34).

Em países desenvolvidos, 19% da população com faixa etária de 60-74 anos possuem o DM, e esse número tende a aumentar em 22 % para a faixa etária entre 75-79 anos (33). Para os países subdesenvolvidos, estima-se que a prevalência do

DM atingiu um pico de 8% para a faixas entre 55-64 anos, esse número tende a triplicar quando comparado aos países desenvolvidos. Entretanto para o continente americano a maior prevalência do DM foi encontrada na América do Norte e Caribe onde estima-se em 10,8%, em contraste ao continente Africano, que apresenta os menores índices do DM, com um total de 4,2% (33). Contudo a região que abriga o maior número de portadores do DM é a do Pacífico Ocidental, com um total de 164,8 milhões de pessoas, 37% da população global. Globalmente 79% dos indivíduos com algum tipo do DM vivem em países de baixa e média renda.

As estimativas específicas entre os sexos e o ambiente em que vivem, mostram que o DM tem maior prevalência para o sexo masculino (8,9%) em comparação com as mulheres 8,4%. Assim existem cerca de 12,3 milhões a mais de homens (231,7 milhões) do que as mulheres (219,3 milhões). É esperado que em 2045 a diferença da prevalência do DM entre os sexos atinja a marca de 9,9% (33). Em relação ao ambiente em que vivem, estima-se que a zona urbana abriga cerca 10,2% da população doente em comparação a zona rural 6,9%.

No Brasil a realidade não diverge muito em relação ao mundo. Em 2012, a Federação Internacional do Diabetes estimou a prevalência de 10,3% da população brasileira com DM (33). Entretanto esse número pode ser diferente devido à subnotificação. Na pesquisa realizada por Bertoldi e seus colaboradores (35), ficou evidenciado que a prevalência do DM foi de 7,6% em indivíduos entre 30-69 anos, sendo que a maior parcela era em idosos, um fator preocupando foi que 46,5% desses casos não foram diagnosticados. No Brasil, em relação ao mundo, os casos de diabetes entre os sexos não apresentaram diferença, o mesmo aconteceu para o local em que vive (zona rural ou urbana) (36). Para a faixa etária, houve a maior disparidade entre as estatísticas, foi estimado que para a faixa de 30-39 anos o número de portadores de DM 2,7%, em contrapartida esse número foi cinco vezes maior 17,4% para os indivíduos com idade entre 60-69 anos (36).

O Brasil é um país extenso que abrange cerca de 47% do território total da América do Sul. Como a extensão o nível de desigualdades regionais também é enorme, inclusive para a prevalência dos casos do DM (35). Em uma pesquisa recente, ficou evidenciado que as regiões mais desenvolvidas obtiveram maior prevalência do DM, com 8,9% para a região Sul e 8,2% para a região sudeste, nesse mesmo estudo foi descrito uma maior prevalência para os indivíduos com a

faixa etária acima dos 65 anos (16,5%), apresentando também uma prevalência duas vezes maior com analfabetismo/baixa escolaridade (10,2%) para aqueles com mais de 8 anos de estudo (5,1%) (37).

### 2.1.2 – FISIOPATOLOGIA, TIPOS, COMPLICAÇÕES E TRATAMENTO

O diabetes mellitus é conhecido não como uma única doença e sim como uma “constelação” de sintomas não patogênicos, datada há 3500 anos no Egito antigo (38). Foi através do manuscrito intitulado como “The Ebers Papyrus”, encontrado em uma sepultura na região de Tebas ao sul do Egito datado de 1550 a.C, onde se encontrou o primeiro relato de uma síndrome poliúrica, mais tarde intitulada com Diabetes Mellitus (39). Na época os Egípcios sugeriram vários medicamentos à base de trigo e terra para a cura e tratamento dessa síndrome poliúrica (39).

Mais tarde, com a criação do tratado médico de “*Verdic*” da Índia, foi descrito com uma riqueza maior de detalhes o Diabetes Mellitus, bem como a distinção de dois tipos específicos do DM: congênito e adquirido (40). Foi nesse período que começou a se notar a relação do DM com a hereditariedade, dieta alimentar, sedentarismo e obesidade, sugerindo que medicamentos à base de cereais recém colhidos bem como preparação de betuminosas contendo benzoato e sílica como formas de tratamento (40).

Foi apenas nos séculos 5 a 6 d.C., por um notável médico indiano chamado de Sushrant, que foi feita a primeira associação da síndrome poliúrica com o gosto doce (40). Entretanto foi apenas nos anos de (81-138 d.C.), por Araetus da Cappodocia, que chamou essa síndrome poliúrica por Diabetes, por fazer associação da doença com o “derretimento da carne e membros através da urina”, usando o termo “sifão” que faz inferência ao nome Diabetes (41). Nos anos (960-1037), um famoso médico Árabe chamado Avicena, descreveu com precisão as primeiras características clínicas e as complicações do DM, neuropatia periférica, gangrena e disfunção erétil, e também enfatizou a “urina doce” como uma das principais características do DM (42).

A evolução do DM para os tempos modernos só foi possível devido à criação das bases experimentais no ramo da medicina. Em meados do século 18, com as publicações das obras de Claude Bernard (1813-1878) e Brown-Sequard (1817-1894), que foi possível compreender a patogênese do DM (38), onde Claude estabeleceu o conceito de órgãos, glândulas e suas secreções. No ano 1675, o médico Thomas Willis redescobriu o conceito de urina doce e com isso ele adicionou a palavra mellitus que do grego significa mel (38).

Através dos experimentos realizados por Claude Bernard, ficou estabelecido a produção da glicose pelo fígado (gliconeogênese hepática), e assim foi introduzido o conceito da glicose excessiva relacionada ao DM. Mais tarde no ano de 1857 ele denominou essa glicose como glicogênio e constatou um possível papel do pâncreas na fisiopatologia do DM (43). Mais tarde em um estudo realizado com cães, ficou evidenciado uma diferenciação do pâncreas nos cães que apresentaram a poliúria decorrente do DM (44). Na mesma época Paul Langerhans, descreveu macroscopicamente a anatomia/histologia das ilhotas pancreáticas, denominadas de Insulina, entretanto foi apenas no ano de 1927 que ficou evidenciado que o DM resulta de uma lesão no pâncreas (44). Assim nos dias de hoje o DM é conceituado um conjunto de distúrbios (metabólicos, crônicos e endócrinos) resultantes da não produção de insulina e do defeito na ação da insulina produzida (11).

Como toda doença um diagnóstico precoce é uma das melhores formas de conter os agravos da mesma. Para o DM a principal forma de detecção se faz por meio nas alterações da glicose plasmática e/ou após uma sobrecarga de glicose feita por via oral (45). O diagnóstico baseia-se na glicose plasmática em jejum de 8 horas e pelo teste de tolerância à glicose (2 horas após a sobrecarga de 75g de glicose). Para a ADA os valores de corte para o diagnóstico do DM é de  $\geq 126$ mg/dl para o teste de glicemia em jejum e de  $\geq 200$ mg/dl para o teste de tolerância a glicose (45). Vale ressaltar a adição de uma nova categoria “glicose alterada” com valores médios de  $\geq 110$  e  $< 126$ mg/dl para a glicose em jejum e o equivalente a  $\geq 140$  e  $< 200$ mg/dl para o teste de tolerância a glicose, como uma possível forma de detecção precoce do DM (45).

O DM pode ser classificado em suas formas mais comuns DM do Tipo 1, dependente de insulina e o DM do tipo 2, não dependente de insulina. Entretanto o DM pode ser classificado em mais dois tipos, o DM gestacional e outros tipos

específicos do diabetes (45). O DM do tipo 1, é causado pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas, resultando na não produção de insulina, e pode ser subdividida em duas formas: 1A (auto-imune), há um processo de insulite onde o corpo produz anticorpos circulantes que combatem as células pancreáticas e também a insulina, vale ressaltar que o quadro de instalação do tipo auto-imune se dar por forma abrupta (46). O subtipo 1B, também chamado de idiopático, é caracterizado pela ausência dos anticorpos presentes no tipo 1A e a evolução do quadro se dar de forma mais fulminante em comparação ao auto-imune (47). Esse tipo é mais comum em crianças de 10-14 anos, diminuindo a incidência na fase adulta (45).

O DM do tipo 2 é a forma mais comum da doença, e segundo dados da ADA é responsável por 90% dos casos (11). Esse tipo é considerado a forma mais heterogênea da doença e está diretamente associado por distúrbios na ação da secreção à insulina e tem como principal fator de risco a obesidade e o envelhecimento (48). A prevalência desse tipo do DM iniciasse por volta dos 40 anos de idade e atinge o pico de maior incidência aos 60 anos (49).

A medida em que a ciência avança no tocante ao combate e das complicações referentes do DM, surgem os outros tipos da doença, denominados “outros tipos específicos do diabetes”. Esses tipos são consequências de determinados fatores, como: (1) defeitos genéticos na função das células  $\beta$ -pancreáticas; (2) defeitos genéticos da ação da insulina; (3) doenças do pâncreas exócrino; (4) endocrinopatias; (5) por indução de drogas e produtos químicos; (6) infecções e (7) formas incomuns do diabetes imuno-mediado (45). Atualmente tem se dando ênfase em dois tipos novos do DM, o *Maturity Onset Diabetes of the Young – MODY*, e o de origem mitocondrial. O *MODY* tem como principal fator de risco a hereditariedade, com o pico de prevalência por volta dos 25 anos de idade e não sofre influência da obesidade. Assim esse tipo do DM tem como principal característica um defeito da secreção da insulina provenientes de determinados polimorfismos de genes específicos (50-52).

O DM mitocondrial, também conhecido como de herança materna ou com surdez, ocorre devido a uma mutação genética do DNA mitocondrial causando interferência na produção de energia corporal (53). Assim esse tipo específico do DM tem sua maior prevalência em indivíduos jovens e sem obesidade, e tem como

principal característica uma progressão da hiperglicemia e se faz uso de insulina exógena (54).

Por conseguinte, o DM gestacional pode ser definido como diminuição da tolerância a glicose, de variadas intensidades diagnosticada no período gestacional, podendo ou não permanecer após o parto (55). Esse tipo está mais relacionado com o DM2, e tem como principais fatores de risco a obesidade, ganho excessivo de peso durante a gravidez, crescimento fetal excessivo, baixa estatura, hipertensão e antecedentes de morte fetal ou neonatal (55). O diagnóstico pode ser feito a partir de duas medições de glicose em jejum, uma na consulta pré-natal e outra na vigésima semana de gravidez, sendo confirmado entre a 24<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> semanas de gestação, com o ponto de corte  $\geq 85$ mg/dl (56, 57).

Independentemente do tipo do DM, as complicações provenientes desta são comuns em todos os tipos da doença, e pode ser divididas em agudas e crônicas (58). Os efeitos agudos estão diretamente associados as complicações a longo prazo, e são definidas como complicações orais do DM (caries, câncer de boca, boca seca, lesões na mucosa), e ainda não estão bem elucidadas na literatura científica. Em contrapartida as complicações crônicas, estão relacionadas a circulação vascular, agrupadas em doenças microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia), e macrovasculares (cardiovasculares) (59).

A principal complicação do DM é a hiperglicemia, entretanto outras complicações patogênicas exercem influência direta na evolução do quadro do DM, como a resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e a disfunção imunológica (58). A hiperglicemia é o principal fator determinante para o agravamento das complicações do DM. Pesquisas mostram pacientes que tiveram um maior controle glicêmico com DM1 e DM2 obtiveram uma maior redução das complicações microvasculares e macrovasculares (60, 61). As consequências da hiperglicemia dizem respeito principalmente as células endoteliais e nervosas periféricas, assim quando há o aumento da glicose extracelular, acarreta também no aumento da glicose intracelular desencadeado na maior liberação das espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas mitocôndrias, causando a inibição da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), gerando um maior dano tecidual (62).



Verhulst e seus colaboradores citam 4 mecanismos que são ativados pela inibição da enzima GAPDH, que geram o dano celular (58): (1) aumento da cascata de Polioli; (2) aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e aumento da expressão dos receptores para AGEs (RAGEs); (3) ativação da proteína quinase C (PKC) e (4) aumento da via hexosamina (62).

A cascata de polioli converte os componentes tóxicos (aldeídos) em álcool através da enzima aldose redutase, tal produto é inofensivo as células. Em contrapartida devido a hiperglicemia, essa enzima também converte o excesso de glicose intracelular em sorbitol consumindo o NADPH ocasionando na maior oxidação celular, podendo levar a morte das mesmas (63).

Os AGEs são produtos finais de uma interação complexa entre glicose, lipídeos, proteínas e/ou ácidos nucleicos. Em consequência do quadro de hiperglicemia, os AGEs podem alterar as funções das proteínas intracelulares, alterando também a função celular. Em contrapartida os AGEs podem migrar para o ambiente extracelular, causando a interrupção da sinalização da membrana plástica gerando uma disfunção celular (64). A migração dos AGEs para o ambiente extracelular afeta a circulação das proteínas do meio (devido a maior ligação dos AGEs com os seus receptores RAGEs), induzindo assim a liberação de citocinas 6 e 1 alfa (IL-6, IL-1  $\alpha$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), induzido a um estado pro-inflamatório (65, 66).

A ativação da proteína quinase PKC, em decorrência do quadro de hiperglicemia extracelular, pode exercer influência na ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB), assim exercendo influência na resposta inflamatória, através da expressão genica das citocinas 6 e 1 alfa (IL-6, IL-1 $\alpha$  e TNF-  $\alpha$ ) (67). Por fim um importante fator também decorrente da condição da hiperglicemia é o aumento da via da hexosamina, esta por sua vez aumenta também a produção de citocinas inflamatórias como (PAI-1, TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1) que são prejudiciais para a circulação sanguínea (62).

O segundo fator patogênico que exerce influência direta nas complicações do DM é a resistência à insulina. Esta é classificada como a diminuição da sensibilidade da ação da insulina, tem como seu principal fator de risco a obesidade sendo mais comum no DM2, exercendo um papel importante no quadro da hiperglicemia (58).

Entretanto além a resistência à insulina também pode causar o aumento da liberação dos ácidos graxos livres, provenientes do tecido adiposo para a circulação sanguínea, resultando na maior liberação dos ROS e conseqüentemente maior dano tecidual, como já foi discutido previamente (68, 69). Outro mecanismo importante a ser discutido, é que devido a maior síntese do ROS a um aumento da adesão de leucócitos nas células endoteliais resultando em uma maior inflamação, vasoconstrição e na coagulação sanguínea, favorecendo o desenvolvimento das doenças ateroscleróticas (70).

Outro fator que potencializa as complicações do DM é a dislipidemia. Esta é associada a “tríade lipídica”, que tem como característica o aumento dos triglicérides circulantes, diminuição dos níveis do colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL) e do aumento de partículas de colesterol de baixa densidade (71). A dislipidemia é mais comum no DM2, e está diretamente associada a obesidade, devido ao maior acréscimo da gordura visceral (58).

Como mencionado anteriormente, a obesidade bem como a resistência à insulina são fatores de risco para o agravamento das complicações do DM. Entretanto a hipertensão por ter os mesmos fatores de risco e por gerar as mesmas lesões micro e macrovasculares que o DM, influencia diretamente as suas complicações (58, 72). Boulbou e seus colaboradores, evidenciaram que a hipertensão em pacientes com DM2 resulta na maior ativação endotelial, aumentando o quadro inflamatório, além disso há uma redução na disponibilidade do óxido nítrico resultando em uma maior vasoconstrição contribuindo para o dano microvascular (73). Em contrapartida na mesma pesquisa (73), os autores evidenciaram que o controle da pressão arterial nesses pacientes, resultou na diminuição dos danos microvasculares controlando assim as complicações do DM.

Por fim, a disfunção imunológica exerce um papel fundamental na patogênese das complicações do DM. A deficiente resposta imune provenientes da doença gera um maior risco de infecções no organismo, podendo citar: infecções urinárias, respiratórias, na mucosa oral e na derme (74). Vale ressaltar que a principal consequência dessas infecções é o chamado pé de diabético. Por estar com o sistema imunológico debilitado, há uma maior dificuldade na cicatrização gerando úlceras e assim nesses casos a amputação do membro torna-se a única solução

(75). Entretanto, a disfunção imunológica resulta também em um quadro pro-inflamatório crônico.

Como já foi discutido anteriormente, em resposta aos distúrbios metabólicos e hemodinâmicos provenientes do DM, existe uma maior ativação das células endoteliais resultando na liberação de células imunes para os tecidos (58). Assim, podemos citar como exemplo os adipócitos, liberam uma grande variedade de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ ), potencializando o quadro inflamatório, entretanto a persistência desse quadro (inflamação crônica), potencializa a progressão da neuropatia, retinopatia e nefropatia (76-78).

Por ser uma doença que tem como principal componente a hiperglicemia as formas de tratamento e controle do DM2, se baseiam em adoção de hábitos de vida saudáveis, como uma dieta balanceada e prática regular de exercício físico somado ao uso dos fármacos hipoglicemiantes (79). O tratamento medicamentoso mais convencional é o uso da metformina, que tem função suprimir a gliconeogênese hepática, diminuindo a hiperglicemia (80). Estudos mostram que a supressão da gliconeogênese decorrente do uso da metformina se dá por meio de quatro mecanismos diferentes: (1) pela ativação hepática da AMPK (proteína quinase ativada por AMP), através da enzima fígado-quinase B1 (80, 81); (2) através do bloqueio da adenilciclase proveniente da inibição do glucagon; (3) inibição da coenzima dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) e (4) inibição da mitocôndria glicerol fosfato desidrogenase (mG3PDH) (82).

A metformina (dimetilbiguanida), é um composto ativo hipoglicemiante derivado da erva medicinal *Galega officinalis* (83) também conhecida como Lilac Francês. O início do uso dessa erva para o tratamento do DM2 data desde a época medieval europeia e por conseguinte o uso das guanidinas (fenformina, buformina e metformina) datam desde o século passado (83, 84). Pouco é debatido sobre como esse fármaco age no organismo do paciente.

O tratamento farmacológico em idosos tem que ser realizado de forma mais planejada e monitorada devido as alterações farmacocinéticas provenientes do processo de envelhecimento. Com o avanço da idade o risco de reações adversas a medicamentos é elevado, por isso é de fundamental importância estudar a relação benefício/risco, para aumentar a eficácia do tratamento (80). Para o tratamento do

DM2 em idosos, a literatura científica mostra que o recomendado é iniciar com doses mais baixas e aumentando de acordo com a evolução do tratamento (80, 85).

O tratamento com metformina em idosos é indicado para esse grupo etário, por ter baixo risco de produzir hipoglicemia ou insuficiência cardíaca, e torna-se um fármaco seguro e eficaz para o idoso (80, 85, 86). Diversos estudos compararam o uso da metformina com outros fármacos (sulfonilureias), assim ficou evidenciado que os pacientes idosos tratados com metformina tiveram menor incidência de desfechos cardiovasculares, hospitalização por hipoglicemia, risco de quedas e mortalidade, do que os tratados com outros fármacos (87-91), adicionalmente pesquisas mostram que a metformina pode reduzir a concentração de TNF- $\alpha$ , agindo diretamente nos níveis inflamatórios provenientes do DM2 (92, 93). Em contrapartida, a combinação de dois ou mais medicamentos hipoglicemiantes aumenta o risco da hipoglicemia (94).

### 2.1.3 – METFORMINA E INFLAMAÇÃO

Dentre os fármacos hipoglicemiantes adotados para o controle e progressão do DM2, a metformina costuma figurar como primeira escolha para tal finalidade (95). Ficou evidenciado segundo a literatura que o controle glicêmico proveniente da metformina se dá por causa da ativação da AMPK (95), que inibe o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) via PI3K-Akt na célula muscular, surtindo assim efeito anti-inflamatório (96). Além disso, pesquisas mostram que essa inibição de NF- $\kappa$ B em macrófagos é responsável pela diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (96). Outra via de supressão da inflamação por metformina se dá por meio das vias SIRT1/LKB1/AMPK, que suprime produção das espécies reativas de oxigênio (97). Adicionalmente, a metformina demonstrou ter efeitos anti-inflamatórios por também produzir efeitos sobre o excesso de peso e obesidade, dislipidemias e pressão arterial, enquanto fatores de risco para DM2 (95). Assim, o controle glicêmico proveniente da metformina atua tanto direta quanto indiretamente sobre o estado inflamatório, resultando na diminuição da inflamação crônica do DM2.

#### 2.1.4 – CITOCINAS E DIABETES MELLITUS TIPO 2

Citocinas são proteínas solúveis, produzidas por células específicas que agem sobre outras células, podendo assim alterar as funções da célula alvo (98). Tais proteínas podem ser divididas por classes, dependendo da sua funcionalidade, podem ser consideradas pro-inflamatórias, anti-inflamatórias, algumas são classificadas como fatores de crescimento dos linfócitos e por fim podem estar diretamente associadas a resposta imune ao antígeno (98).

Um breve histórico sobre essas proteínas data da década de 1970, com a sua primeira descrição como “Fator de ativação de linfócitos” (99), e posteriormente como fator de crescimento das células T (100). Assim surgiu a ideia de que o processo de doença induz a produção dessas proteínas solúveis (citocinas), em resposta as propriedades das doenças. Entretanto os efeitos das citocinas no organismo estão diretamente associados aos campos da inflamação, imunologia, aterosclerose e as doenças crônicas degenerativas, inclusive o DM2 (98).

Evidências mostram a IL-6, IL-8 e o TNF encontra-se em níveis elevados em indivíduos com DM2, e seus fatores de risco como a obesidade e resistência à insulina (101, 102). Adicionalmente, evidências mostram que um terço da IL-6 circulante pode ser derivada especificamente do tecido adiposo na região visceral, além disso, a secreção da IL-6 pode impedir a sinalização da insulina, reduzindo assim a captação de glicose dependente de insulina, para o meio intracelular, devido a inibição do GLUT4 nos adipócitos. IL-6 decorrente do tecido adiposo está diretamente associada com a resistência à insulina, hiperglicemia e com o DM2 (103).

Como descrito acima, outra importante citocina inflamatória é o TNF- $\alpha$ , que tem como principal fonte de produção a gordura visceral infiltrada por macrófagos (103). O TNF- $\alpha$  estimula a fosforilação da tirosina, que tem como principal objetivo aumentar a sensibilização dos receptores de insulina, no tecido muscular e adiposo, assim aumentando o quadro de resistência à insulina (103-105). Evidências mostram, que pacientes com o DM2 apresentam níveis mais elevados do TNF- $\alpha$  no

plasma e na musculatura esquelética, resultando no aumento da absorção de ácidos graxos para o fígado, aumentando o acúmulo de gordura e de ROS, fatores associados com a resistência à insulina (103-105).

Adicionalmente ao DM2, vale ressaltar que o processo de envelhecimento está associado ao aumento da inflamação, contribuindo assim para o aumento da resistência à insulina (106). Pesquisas mostram que esse marcador inflamatório (TNF- $\alpha$ ) na musculatura esquelética, encontra-se em maior concentração em idosos quando comparados com indivíduos mais jovens (107), entretanto, evidências mostram uma relação direta da concentração muscular de TNF- $\alpha$  com a diminuição da sinalização da insulina e a diminuição da captação de glicose, assim fica evidenciado que essa proteína inflamatória pode de fato contribuir para o aumento da resistência à insulina, agravando o quadro do DM2 (107-109).

## 2.2 – METILAÇÃO DO DNA

### 2.2.1 – CONCEITOS E CONSEQUÊNCIAS DA METILAÇÃO DO DNA

A epigenética é conceituada como processos que alteram a atividade de genes específicos e que não modificam a sequência da cadeia nucleotídica, e tem como principal consequência a mudança direta da estrutura da cromatina (110). Diversos são os mecanismos epigenéticos que exercem regulação na atividade de genes específicos, podendo destacar: (1) metilação de DNA; (2) modificações de histonas e (3) RNA's não codificantes, destes mecanismos o que ganha mais atenção é a metilação de DNA (111).

A metilação de DNA é caracterizada como um mecanismo epigenético que envolve a adição de um metil (-CH<sub>3</sub>), na posição 5' da citosina, resultando em uma 5-metilcitosina (112). Embora a metilação de DNA em mamíferos seja única e exclusivamente ligada a citosina por um fosfato guanina (CpG), ainda pode ocorrer a metilação em locais não CpGs (CHG e CHH, onde o H possa ser uma adenina, citosina ou timina) (111-113).

Em mamíferos, o genoma humano pode apresentar 28 milhões de sítios CpGs, dos quais cerca de 60-80% destes possam sofrer a metilação, e estas regiões genômicas são conhecidas como ilhas de CpGs (CGIs) (114). Vale ressaltar que a maioria das CGIs podem estar localizadas em zonas promotoras de genes e algumas podem também estar em genes específicos e diferencialmente dos sítios de CpG, as ilhas geralmente não são metiladas para que possa acontecer a transcrição (115).

Adicionalmente aos sítios de metilação, existem a chamada região diferencialmente metilada (DMRs), estas regiões são áreas do genoma humano onde os CpGs mostram vários fenótipos em diferentes estados de metilação, e são consideradas importantes regiões funcionais na transcrição dos genes (116). Com isso as DMRs podem ser considerados poderosos biomarcadores terapêuticos em processos patogênicos e por conseguinte como possíveis formas de intervenção (117).

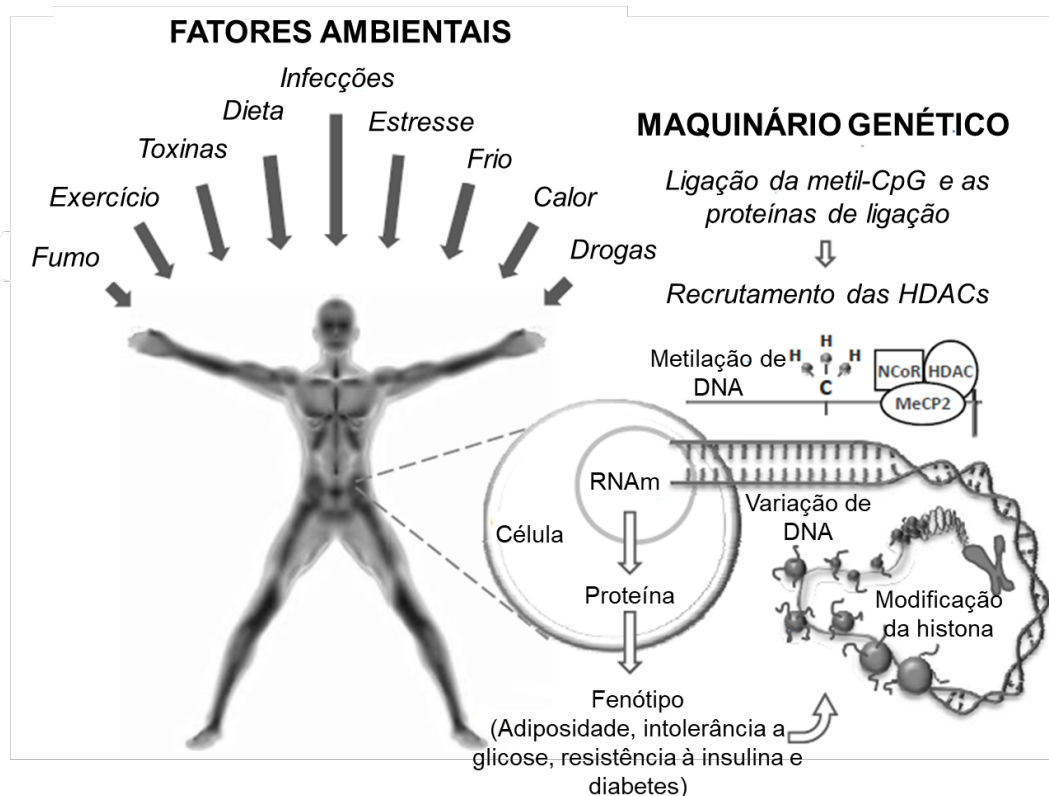
### 2.2.2 – METILAÇÃO DE DNA E DIABETES MELLITUS

As modificações epigenéticas são associadas a subprodutos a estímulos ambientais, podendo influenciar a suscetibilidade genética a diversas doenças, inclusive o DM2 (118). Essas modificações são descritas como a metilação do DNA, metilação ou fosforilação de histonas, mudanças na acetilação, como também na expressão de RNA não codificante, podendo ser alterações mitoticamente hereditárias e assim influenciando a expressão genica (118). Adicionalmente, estudos mostram que fatores ambientais como, dieta, estresse, níveis de atividade física no ambiente uterino podem alterar os estados epigenéticos e consequentemente alterar a expressão genica, ocasionando as doenças (25, 119, 120).

Do período gestacional ao nascimento, é aonde ocorre a maior replicação, diferenciação e maturação funcional de todos os órgãos e sistemas corpóreos. Essa fase é bem suscetível a influências externas podendo gerar efeitos duradouros na prole (118). Fatores como hipertensão, diabetes e obesidade materna, pré eclampsia, alterações no meio metabólico intrauterino, tabagismo e ambientes externos, podem aumentar o risco da prole de desenvolver as doenças crônicas degenerativas como o DM2 (118, 121, 122).

Além dos fatores ambientais descritos previamente (Figura 1), alguns mecanismos do DM2 estão diretamente associados a metilação de DNA. A secreção deficitária de insulina pelas ilhotas pancreáticas está diretamente associada com a patogênese dessa doença, sendo assim diversos estudos se propuseram a analisar a relação da metilação de DNA com a secreção de insulina pelo pâncreas. Deste modo ficou evidenciado, um aumento expressivo da metilação de DNA nos sítios CpGs no fator de transcrição pancreático, no regulador da insulina e do gene mitocondrial, em portadores do DM2 (22, 25, 123).





**Figura 1:** Mecanismos da metilação de DNA com os fatores ambientais. HDAC: histona deacetiltransferase; NCoR: nuclear receptor correspondente; MeCP2: proteína de ligação metil CpG-2. Adaptado de Franks et al., BMC Medicine. 2010; 8(8).

Na pesquisa realizada por Dayeh e seus colaboradores, ficou evidenciado um aumento da metilação de DNA dos genes *Cdkn1a* e *Pde7b* com a diminuição das células  $\beta$ -pancreáticas, ocasionando na menor absorção de glicose dependente de insulina (25). Adicionalmente, achados de Volkmar e seus colaboradores, com base nos resultados de um *microArray*, os autores identificaram 278 DMRs dos quais 96% estavam hipometilados nas ilhotas pancreáticas de portadores de DM2 em relação a indivíduos saudáveis (124). Com isso, tais achados podem indicar que alterações na metilação de DNA tanto das ilhotas como das células  $\beta$ -pancreáticas, podem ser considerados um potencial fator na patogênese do DM2 (125).

Em contrapartida, diversos estudos vem associando metilação com componentes periféricos corpóreos, como o IMC e o sangue, e suas possíveis implicações para o DM2 (126). Pesquisas recentes mostram que a metilação de DNA provenientes do sangue está diretamente associada ao estilo de vida, como a prática de exercício físico e adoção de uma alimentação saudável, e estas podem refletir em diversos tecidos corporais como o pâncreas e o fígado (126). Adicionalmente diversas pesquisas vem associado alterações na metilação de DNA com IMC, obesidade e o DM2 (127).

Como foi discutido previamente a redução da musculatura esquelética proveniente do processo de envelhecimento, altera a sensibilidade à insulina e conseqüentemente aumenta o risco do DM2. Com isso pesquisas mostram que a metilação de DNA de genes específicos da musculatura esquelética parece aumentar com a idade (128, 129). Outros estudos (130, 131) complementam essa ideia, após concluírem que outros genes específicos do tecido muscular (OXPHOS, NDUF6 e COX7A1), apresentam elevações da metilação de DNA no processo de envelhecimento. Além disso, a expressão do receptor ativador-proliferador de peroxissoma, coativador gama 1 (PPARGC1A), que está diretamente associado ao metabolismo energético, tem sua expressão diminuída com a idade (132), com isso as alterações da metilação de DNA relacionadas a idade podem influenciar metabolismo muscular e a sensibilidade à insulina, agravando o quadro do DM2.

O principal tratamento farmacológico para o DM2 é a metformina, ela tem sua principal ação no fígado, onde ela é transportada e age sobre a gliconeogênese hepática. Para que a metformina surta efeito, é importante que se tenha esse transporte. Pesquisas mostram que a metilação de DNA possa influenciar a expressão hepática dos transportadores de metformina, prejudicando assim o seu transporte (133-135). Entretanto, uma pesquisa recente mostrou que o tratamento com metformina diminuiu a metilação de DNA relacionado as células hepáticas dos genes transportadores de metformina, bem como a sua expressão gênica (136).

Para o DM2, pesquisas tem apresentado forte associação da metilação de DNA nas regiões promotoras de regulação metabólica em PPARGC1A com as complicações da doença, associando-as com regulações mitocondriais (132). Com isso, a metilação de PPARGC1A está associado com sítios de CpG de tecidos secretores e responsivos à insulina de pacientes com DM2 (24, 137), e também em

indivíduos com predisposição ao DM2 (138-140). Adicionalmente, pesquisas (141, 142) vem associado a metilação por PPARGC1A na musculatura esquelética e no fígado em relação a absorção de glicose, decorrente da sensibilidade à insulina (126). Com isso vale ressaltar que os principais mecanismos responsáveis pela hiperglicemia (disfunção das células  $\beta$ -Pancreáticas e resistência à insulina), está diretamente associada com a metilação de DNA.

### 2.2.3 – METILAÇÃO E METFORMINA

Os efeitos da metformina sobre a metilação de DNA ainda não estão bem elucidados na literatura científica. Achados evidenciaram tanto hipo- quanto hiper-metilação de DNA total e/ou de segmentos gênicos específicos decorrentes do uso da metformina (136, 143, 144). Como já foi descrito previamente, o tratamento com a metformina ativa a via AMPK, e esta inibe diretamente a ação da DNA metil transferase, acarretando redução da metilação de DNA (144). Assim, o tratamento com a metformina pode produzir efeitos sobre o perfil de metilação em pacientes diabéticos. Achados recentes evidenciaram uma redução da metilação de DNA, decorrentes do uso de metformina em genes específicos de células  $\beta$ -pancreáticas e em células leucocitárias de diabéticos (136).

## 2.3 – EXERCÍCIO FÍSICO

### 2.3.1 – EXERCÍCIO, DIABETES MELLITUS E CITOCINAS

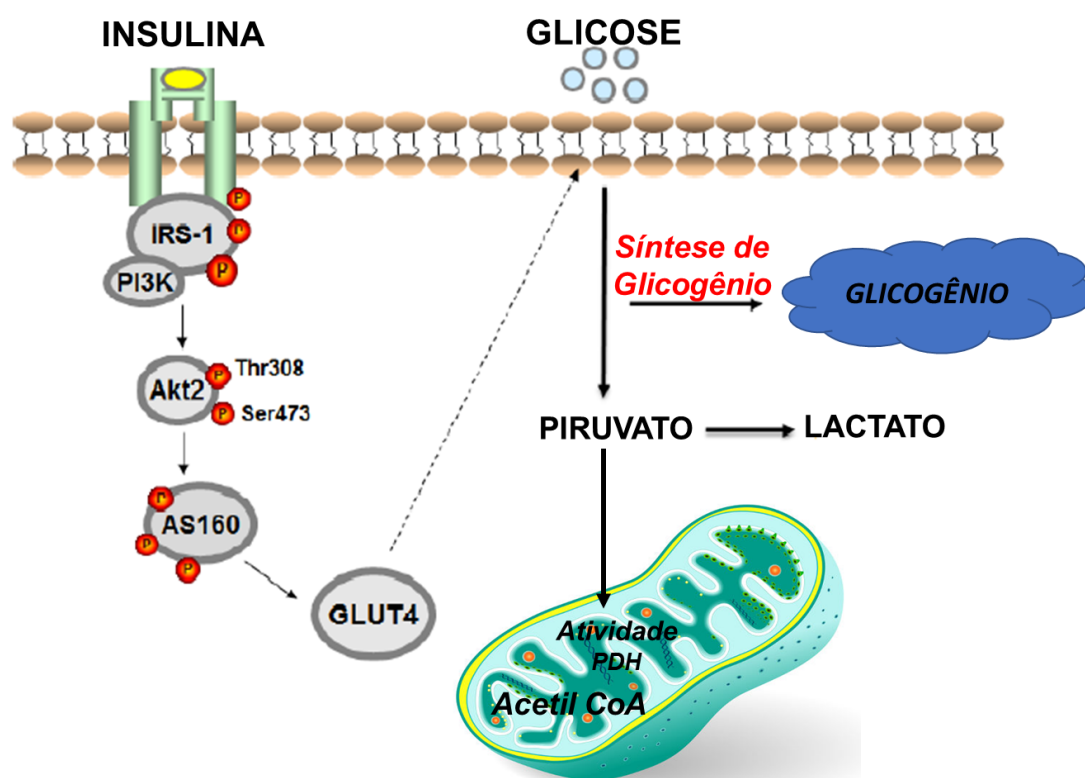
Se tratando do processo de envelhecimento, grande parte da literatura atual foca na discussão da redução da musculatura esquelética proveniente do avanço da idade (sarcopenia), somente nos fatores relacionados a diminuição da força e da potência muscular e suas implicações na autonomia funcional do idoso (145). Além desses efeitos críticos do envelhecimento, é importante destacar que a redução da musculatura esquelética também exerce efeitos deletérios na captação de glicose dependente de insulina (109).

A sarcopenia é resultado de uma rápida redução das fibras musculares do tipo I (oxidativas) e do tipo II (glicolítica), como também da maior redução da área de secção transversa do músculo (hipertrofia), afetando principalmente as fibras glicolíticas (146). Mais tarde, esses achados foram apoiados por Coggan e seus colaboradores (147), onde evidenciaram uma maior redução da área de secção transversa das fibras IIa e IIb, em idosas quando comparadas com mulheres mais jovens, além disso a redução das fibras do tipo II exerce forte influência negativamente no metabolismo da glicose.

Na pesquisa realizada por Murgia e seus colaboradores (148), onde revelaram que após uma análise proteômica da fibra do tipo II, ficou evidenciado que as proteínas envolvidas no metabolismo do glicogênio e da glicólise, foram regulados negativamente nesse tipo de fibra em idosas fisicamente ativas quando comparadas com os mais jovens. Adicionalmente, evidências mostram que a proteína transportadora de glicose GLUT4, foi regulada negativamente nas fibras do tipo II em idosos quando comparado com os mais jovens, o mesmo não foi observado para as fibras do tipo I (149).

Com a redução da musculatura esquelética proveniente do envelhecimento, vale ressaltar também uma maior diminuição na sinalização da insulina na musculatura (150, 151). Em condições saudáveis, a insulina liga-se ao receptor de insulina ativando a cascata de sinalização envolvendo a fosforilação do receptor,

resultando no substrato do receptor de insulina IRS-1. Assim há ativação da fosforilação da fosfoinositido 3-quinase PI3K, do Akt2 e nos locais AS160, ativando a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), a glicose entra no miócito (celular muscular), ativa a síntese de glicogênio por fim acontece a oxidação mitocondrial (109, 152), como descrito na Figura 2.



**Figura 2:** Esquemática do metabolismo da glicose dependente de insulina na musculatura esquelética. IRS-1: substrato do receptor de insulina; PI3K: fosfoinositido 3-quinase; PDH: piruvato desidrogenase. Adaptado de Consitt et al., J Frailty Aging. 2018; 7(1):21-27.

Pesquisas recentes relataram através de biopsias musculares no vasto lateral em indivíduos de ambos os sexos e sedentários com a faixa etária entre 18-84 anos, que 60 min após a ingestão hiperinsulinêmica-euglicêmica, houve um maior déficit na fosforilação da AS160 consequentemente a menor ativação de GLUT4 com o avançar da idade (150). Adicionalmente, evidências mostram que o envelhecimento tem um efeito negativo do Akt2, visto que a combinação desses sítios tem um maior

impacto na translocação do GLUT4, potencializando a redução da absorção da glicose para a musculatura (153-155).

Outro possível fator do processo de envelhecimento com a diminuição da captação de glicose para a musculatura esquelética, embora controverso, é a diminuição do GLUT4. Pesquisas mostram um decréscimo do GLUT4 (149, 150) com o avançar da idade, e que essa redução é maior nas fibras do tipo II em comparação com as fibras do tipo I. Tais achados somados com a já discutida redução da sensibilidade à insulina sugerem que o processo de envelhecimento e a inatividade física, afetam diretamente os agravos do DM2.

Nos últimos anos, a prática regular de atividade física, tem sido associada a melhora na autonomia funcional e conseqüentemente na melhoria da qualidade de vida da pessoa idosa (156, 157). Entretanto, o aumento da inatividade física no decorrer do avanço da idade, pode ser considerado um dos principais fatores para o aumento da resistência à insulina no processo de envelhecimento (158). Adicionalmente, evidências mostram que somente a inatividade física é responsável por um aumento de 7% dos casos de DM2 em idosos (159), em contrapartida a adoção da prática regular de exercícios físicos pode aumentar a sobrevivência de portadores ou não do DM2 (160).

Muito já se é discutido sobre os efeitos da prática regular de atividade física sobre a resistência à insulina. Assim, vale ressaltar que mais importante que a intensidade ou tipo de exercício físico, é o tempo total de atividade física acumulada que é a variável mais importante na melhoria da sensibilidade à insulina em indivíduos sedentários (161). É sabido, que a musculatura esquelética é um dos principais órgãos responsáveis pela captação de glicose e que as adaptações provenientes do exercício podem melhorar a sensibilidade à insulina (109), assim diversas pesquisas reforçam que programas controlados de exercícios resistidos demonstraram uma melhora da sensibilidade à insulina em idosos, bem como uma melhora no metabolismo do glicogênio muscular, podendo assim afirmar que a prática regular de exercício resistido pode ajudar a controlar as complicações advindas do DM2 (150, 162, 163).

O exercício físico é responsável por respostas crônicas e agudas no metabolismo humano. Muito já se é discutido dos efeitos crônicos (a longo prazo) do exercício

resistido no metabolismo da glicose e da resistência à insulina (109, 150), em contrapartida as respostas agudas do exercício resistido sobre esses fatores ainda não estão bem elucidadas na literatura científica. Os efeitos agudos do exercício resistido podem ser debatidos em duas fases, durante e imediatamente após o exercício (164).

Durante a prática do exercício resistido, por a glicose ser a principal fonte de energia para a realização da contração muscular, a captação da mesma aumenta de forma aguda ao longo da realização do exercício (164). Adicionalmente, na pesquisa realizada por Chacko (165), ficou evidenciado que durante o exercício a absorção da glicose não dependente da insulina também aumenta, potencializando ainda mais o controle glicêmico de indivíduos portadores do DM2. Imediatamente, ou duas horas após ao exercício, há um aumento significativo da resistência à insulina, aumento da fosforilação do GLUT4 e do Akt2, da síntese de glicogênio e o aumento da oxidação dos ácidos graxos, em pacientes com DM2 (164, 166). Além disso o exercício resistido pode alterar proteínas inflamatórias como as citocinas (103).

Como foi descrito acima a IL-6 tem um efeito pro-inflamatório, em contrapartida a mesma pode ter também um efeito anti-inflamatório, assim pode ser descrita como mioquina, quando ela é produzida durante a contração muscular (103), sendo que a musculatura esquelética é considerada a fonte predominante de IL-6 (167-169). Evidências mostram, que durante a contração muscular a concentração de IL-6 pode aumentar em até 100 vezes em comparação as concentrações iniciais, assim vale ressaltar que o exercício físico é um importante fator regulador das concentrações plasmáticas de IL-6 (167). Em contrapartida, a IL-6 muscular tem sua maior liberação nas respostas agudas do exercício resistido quando comparados com o efeito do exercício prolongado, e também nos exercícios excêntricos em relação aos concêntricos (170).

A IL-6, dentro da musculatura esquelética promove a diferenciação miogênica muscular, aumentando os níveis de captação de glicose basal e também estimulados pela insulina, induzido também a translocação de GLUT4 (169, 171). Adicionalmente, IL-6 liberada pelo exercício, promove a oxidação de ácidos graxos intramuscular, pela ativação AMPK tanto na musculatura esquelética quanto no tecido adiposo, resultando na otimização do tratamento da obesidade e do DM2 (172-174).

Além disso, a IL-6 derivada do exercício físico, pode ser considerada como um potencial fator anti-inflamatório, podendo inibir também a produção do fator de necrose tumoral (TNF), induzido por lipopolissacarídeo (LPS) (175, 176). Assim esses achados fortalece a ideia de que a IL-6 proveniente da contração muscular, exerce um papel importante na regulação dos distúrbios metabólicos provenientes do DM2 (103). Importantes achados sugerem ainda que a IL-6 na musculatura esquelética está associada a produção hepática de glicose durante o pratica do exercício físico resistido (177, 178). Adicionalmente, a IL-6 pós-exercício pode atenuar a regulação hepática na gliconeogênese, atuando mediada por outra citocina quimocina, que também pode ser aumentada após o exercício resistido (179).

Além do efeito do exercício resistido sobre os níveis IL-6 muscular, e seus potenciais efeitos benéficos desta, outra importante citocina inflamatória pode também sofrer alteração em suas concentrações pós-exercício, como o TNF- $\alpha$ . Evidencias mostram que efeitos agudos do exercício resistido são capazes de reduzir os níveis do TNF- $\alpha$  em indivíduos obesos e possivelmente em portadores do DM2 (180-182).

Na pesquisa realizada por Santiago e seus colaboradores (183), demonstraram que após um programa de treinamento resistido, os autores relataram um decréscimo na expressão do gene do TNF $\alpha$ , como também um decréscimo das concentrações séricas do mesmo. Assim fica evidenciado um possível papel do exercício resistido na modulação imunológica e anti-inflamatória nos portadores do DM2. Adicionalmente, o treinamento resistido de moderada a alta intensidade, ou ainda em combinação com o treinamento de flexibilidade demonstrou diminuir os níveis de TNF- $\alpha$  na musculatura esquelética (107, 108, 184). Assim, podemos afirmar que o exercício resistido de fato pode melhorar a resistência à insulina em idosos, ajudando no tratamento do DM2.

### 2.3.2 – EXERCÍCIO E METILAÇÃO DO DNA



Muito já se é discutido na literatura científica que a adoção de um estilo de vida saudável, como a adoção da prática regular de exercício físico e uma alimentação saudável reduzem os riscos e os agravos do DM2 (185, 186). Em contrapartida, os efeitos do exercício resistido sobre o perfil de metilação de DNA ainda estão em constante evolução na literatura científica. Achados, mostram que após uma intervenção de seis meses de treinamento resistido alterou o padrão de metilação de DNA nos sítios de CpGs de 7,663 genes relacionados ao tecido adiposo em indivíduos idosos e sedentários, ressaltando que os genes HDAC4, NCOR2, FTO, KCNQ1 e TCF7L2, fortes candidatos para o DM2 e obesidade, apresentaram expressão diferenciada de metilação após o programa de exercício resistido (187).

As respostas agudas ao treinamento resistido está diretamente associado com o aumento da captação de glicose, em quanto que as respostas crônicas estão relacionadas com a melhora da função mitocondrial (188). Após uma sessão aguda de treinamento resistido, biópsias musculares mostraram uma redução da metilação global de DNA dos sítios CpGs (189). Adicionalmente, a metilação de genes relacionados ao metabolismo da glicose e da musculatura esquelética (PPARGC1A, TFAM, PDK4, MEF2A, CS e PPARD), mostrou-se diminuir após a mesma sessão de treinamento resistido (189).

Alterações de metilação de DNA nos componentes periféricos no corpo, como o sangue, demonstram-se passíveis de modificações principalmente por intervenções de treinamento resistido (190). Na pesquisa realizada por Ronn e seus colaboradores, ficou evidenciado que após seis meses de um programa de treinamento resistido, houve alteração do perfil de metilação de DNA em todo o genoma, especialmente no tecido adiposo em pacientes portadores do DM2 e obesos (190). Outros achados, embora encontrados em indivíduos não diabéticos, vale ressaltar, que após um programa de três meses de exercício resistido, os indivíduos de ambos os sexos apresentaram alterações na metilação de DNA de genes específicos da musculatura esquelética, em relação a absorção de glicose dependente de insulina (191). Com isso fica a ressalva que o exercício físico possa de fator alterar a metilação de DNA.

### 3 – JUSTIFICATIVA

O notório e rápido aumento da população de idosos fica mais evidente com o passar dos anos. No processo de envelhecimento o corpo humano sofre algumas alterações fisiológicas e metabólicas que afetam diretamente a autonomia funcional dessa população (1-3). Tais modificações somadas ao alto índice de inatividade física, aumentam consideravelmente o risco das doenças crônicas degenerativas, como o DM2 (4-6).

O DM2 é caracterizado como um conjunto de distúrbios (metabólicos, crônicos e endócrinos) resultantes da não produção de insulina e do defeito na ação da insulina produzida (7). Esse distúrbio metabólico, gera uma série de complicações fisiológicas no organismo, dentre eles, um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias como: IL-6, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Adicionalmente, pesquisas indicam que fatores epigenéticos, como a metilação do DNA podem exercer influência direta no desenvolvimento e no agravamento da doença (17-20). Entretanto, as formas de tratamento do DM2 se resumem na combinação de dois fatores, o uso de fármacos hipoglicemiantes, como a metformina, que por sua vez reduz os níveis glicêmicos provenientes do DM2 (192), bem como a inflamação (92, 93) e tem um possível efeito na modulação da metilação de DNA (193). E a prática adequada de exercícios físicos, visto que tais fatores podem de fato controlar e prevenir os agravos do DM2 (162, 163, 187, 189, 191).

## 4 – OBJETIVO

O objetivo central deste estudo consiste em analisar o efeito agudo do treinamento resistido sobre o perfil inflamatório e sobre a metilação do DNA em pacientes idosos com DM2 usuários de metformina.

### 4.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência do treinamento resistido sobre as citocinas pro e anti-inflamatórias entre os grupos diabéticos e controle.
- Analisar a influência do treinamento resistido sobre a metilação do DNA entre os grupos diabéticos e controle.

## 5 – MATERIAL E MÉTODOS

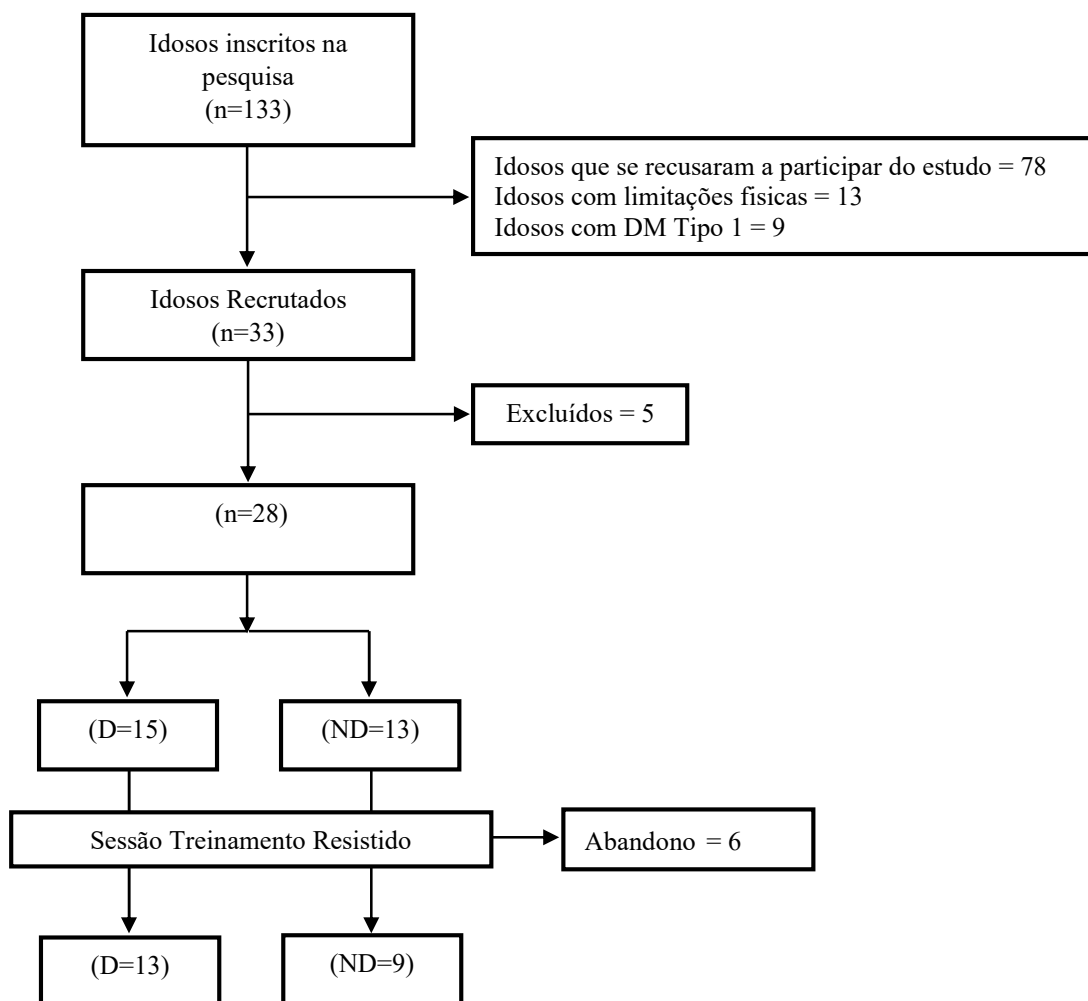
### 5.1 – DESENHO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi um ensaio clínico com delineamento *quasi-experimental*, no qual a amostra foi submetida a uma intervenção física experimental (treinamento resistido) implantada em pacientes com DM2 em uso de metformina e com um grupo controle.

### 5.2 – AMOSTRA

O presente estudo foi composto por 23 idosos de ambos os sexos, divididos em: 13 pacientes com DM2 (D), controlados por drogas hipoglicemiantes (sempre com metformina) e 10 pacientes não diabéticos (ND). Todos os participantes foram acompanhados regularmente no nível de atenção básica pela unidade de saúde da rede pública da cidade de Cedro de São João (Sergipe, Brasil), onde recebiam todos os medicamentos para uso regular. Todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participação do estudo.

Os critérios de inclusão consistiram em: a) ter idade igual ou superior a 60 anos e b) não apresentar incapacidades físicas que dificultassem a locomoção. Foram excluídos os seguintes: a) voluntários com DM2 descompensada na avaliação inicial, ou b) tratados com insulina exógena (Figura 1). O estudo seguiu as recomendações da Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal em que o estudo foi realizado.



**Figura 3.** Desenho esquemático da distribuição amostral.

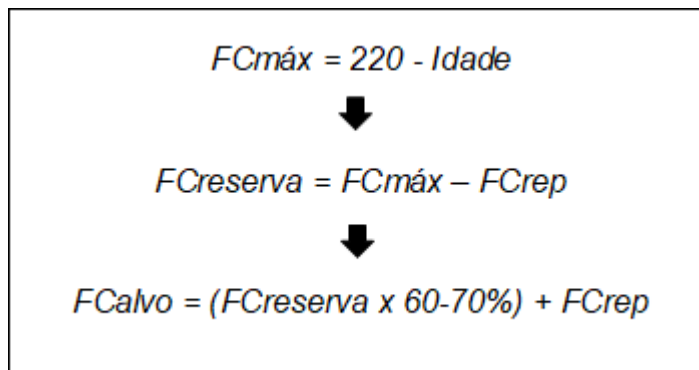
### 5.3 – MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Foi adotado o mesmo protocolo realizado por Moraes Junior et al. (194) composto por: índice de massa corporal (IMC) em kg/m<sup>2</sup>, circunferência da cintura (CC) em cm, circunferência do quadril (CQ) em cm e a relação cintura-quadril (RCQ). Todas as medidas seguiram as recomendações para medidas antropométricas da Organização mundial da saúde (195).

### 5.4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O experimento teve a duração de uma semana. No primeiro dia, foi realizado uma aula experimental com o objetivo de explicar os objetivos do presente estudo bem como os procedimentos que foram adotados. Após a explanação, foi estimada a zona de intensidade do esforço para cada sujeito, com base na frequência cardíaca de repouso (FCrep), seguida de uma familiarização da intervenção. Com um intervalo de 72 horas do primeiro encontro, foi realizada a intervenção física (treinamento resistido em circuito) e duas coletas sanguíneas pré- e pós-intervenção.

A intensidade do esforço foi controlada com o equipamento Polar Team® com software do mesmo fabricante. A zona de intensidade adotada na intervenção foi entre 60% a 70% (196) da frequência cardíaca de reserva, onde a FC máxima (FCmáx) foi estimada pela equação de Karvonen, enquanto para a FC de repouso (FCrep), foi adotado o mesmo protocolo proposto por Morais Junior et al. (194), onde a FC foi aferida após cinco minutos em total repouso, por fim a FCtreino foi estimada pela FCreserva multiplicada pela zona-alvo (60-70%) mais a frequência cardíaca de repouso (Figura 2).



**Figura 4:** Cálculo da zona-alvo do treinamento.

## 5.5 – TREINAMENTO RESISTIDO EM CIRCUITO

Antes da realização do circuito foi realizado uma atividade de aquecimento com duração de cinco minutos, e foi composto por exercícios de mobilidade articular, englobando as articulações dos ombros, quadril e joelhos necessárias para a realização do circuito, com 15 repetições por articulação (194).

O circuito englobou exercícios de base fixa que alternavam por seguimentos corporais, consistindo de oito exercícios com duração de 40 minutos: cinco minutos de aquecimento, 30 minutos do circuito e cinco de volta a calma (recuperação). O circuito teve três sessões (40 segundos de exercício com 20 segundos de intervalo) e com um minuto de descanso entre as sessões (197). Ao longo da intervenção, pelo menos um profissional treinado estava presente em cada estação para garantir a integridade física dos voluntários e a execução adequada dos exercícios. A frequência cardíaca foi monitorada durante todo o experimento para garantir a conformidade com a zona de intensidade estipulada. A hidratação foi realizada ao final de cada sessão.

Os exercícios adotados para cada estação foram: “remada”, realizada com *Theraband*, (*Carci*, São Paulo, Brasil), tensão extraforte, presas a uma estrutura fixa, “sentar e levantar de uma cadeira” adaptado por Rikli e Jones et al (198). “supino vertical”, realizada com *Theraband*, (mesmas especificações adotadas na estação remada), “agachamento terra” (exercício em que há predominância de movimentos de quadril), “rosca bíceps”, realizada com halteres (*Polimet*, Curitiba, Brasil) 3kg para homens e 2kg para mulheres (198), “agachamento com *Gym Ball*, (*Mercur*, Santa Cruz do Sul, Brasil)”, “tríceps com halteres” (adotados a mesma carga e especificações que na estação da “rosca bíceps”), “agachamento livre” (exercício em que há predominância de movimentos de joelho realizados apoiados em um bastão). A ordem do circuito é a mesma que os exercícios foram apresentados respeitando a configuração de alternado por segmento e priorizando os grandes grupos musculares, após a realização do circuito foi realizada uma atividade de volta a calma com duração de cinco minutos consistindo em exercícios respiratórios e de alongamento (194).

## 5.6 – PROCEDIMENTO DE COLETA SANGUÍNEA

Primeiramente, 5 ml de sangue total foram coletados em tubos contendo EDTA e distribuídos imediatamente em alíquotas de menos de 1 ml por tubo para os ensaios de metilação do DNA. Outros 5 ml de sangue total foram retirados e imediatamente centrifugados a 2500 rpm durante 15 minutos a 25°C para obter

plasma para avaliações glicêmicas e inflamatórias. Todas as amostras foram colhidas por profissionais de enfermagem treinados por punção venosa antes do circuito, bem como após o período de volta a calma, usando o sistema de vácuo, todas as amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até as análises futuras.

## 5.7 - CONTROLE GLICÊMICO E PERFIL INFLAMATÓRIO

A glicemia de cada participante foi determinada por espectrometria usando uma reação enzimática (glicose oxidase), através do equipamento LabMax 240 e reagentes Labtest. Antes da análise foi realizado um procedimento de controle regular.

O perfil inflamatório dos pacientes foi determinado com amostras de plasma previamente armazenadas, descongeladas em banho de gelo. As avaliações de citocinas foram realizadas por citometria de fluxo (modelo FACS Verse; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), utilizando o kit de citocinas Human Th1 / Th2 (BD Biosciences), e produzindo leituras para seis mediadores: interleucinas (IL) 2, 4, 6 e 10, interferon gama (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF). As reações seguiram o protocolo do fabricante, com curvas padrão geradas usando o mediador fornecido no kit. As pontuações foram estimadas por interpolação a partir da curva padrão. Todos os dados foram analisados utilizando o software FCAP, versão 3.0 (BD Biosciences).

## 5.8 – EXTRAÇÃO E METILAÇÃO DE DNA

Das alíquotas de sangue previamente coletadas, foi realizada a extração de DNA usando o kit da Qiagen (kit QIAamp® DNA Blood Mini, QIAGEN, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. A quantificação das amostras de DNA foi realizada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific®, São Francisco, EUA), as amostras de DNA foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análise posterior. A partir do DNA previamente extraído, a proporção de DNA metilado nas



amostras foi estimada por meio do imunoenensaio enzimático kit comercial MethylFlash® Kit de quantificação de DNA metilado colorimétrico (Epigentek, Nova York, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados expressam a porcentagem de DNA metilado (5-mC) na amostra de DNA total extrapolada a partir de uma curva padrão de valores de OD, traçados a partir de diluições de um DNA sintético positivo fornecido pelo kit.

## 5.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para observar a distribuição dos dados. Para a antropometria, medidas glicêmicas e metilação, foi aplicado o teste t de Student para amostras independentes. Para o perfil inflamatório, foi realizado um ajuste logarítmico e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, e o teste de Wilcoxon foi realizado para as comparações entre momentos (pré e pós intervenção). Os dados com distribuição normalizada foram expressos como média, desvio padrão e intervalo de confiança, e dados não normalizados, por mediana e quartis. Todas as análises foram realizadas pelo software SPSS® versão 22, e as figuras foram construídas pelo software GraphPad® Prism, versão 5, com  $p \leq 0,05$  para todas as análises.

## 6 – RESULTADOS

Houve uma perda de amostra de um sujeito do grupo ND. Assim, a amostra final foi composta por D=13 e ND=9. As características antropométricas separadas por sexo estão descritas na Tabela 1, com uma diferença significativa para a estatura entre os sexos. Na Tabela 2 estão apresentadas as características antropométricas e bioquímicas separadas por grupos. Houve uma diferença significativa entre os valores basais de glicemia. Escores de metilação do DNA e outras características não diferiram entre os grupos. Além disso, a presença de hipertensão foi estatisticamente semelhante entre D (92,3%, n=2) e ND (77,8%, n=7). Com relação ao uso de hipoglicemiante oral, 69,2% (n=9) utilizaram apenas metformina enquanto os demais (30,8%; n=4) utilizaram simultaneamente a metformina e a glibenclamida.

**Tabela 1:** Caracterização antropométrica da amostra por sexo.

	<i>Feminino (n=13)</i>		<i>Masculino (n=9)</i>		<i>P*</i>
	<i>Média ± DP</i>	<i>IC</i>	<i>Média ± DP</i>	<i>IC</i>	
<b><i>Idade (anos)</i></b>	66,8±3,8	64,5-69,1	70,2±6,1	65,5-74,9	0,116
<b><i>MC (kg)</i></b>	68,2±16,4	58,3-78,1	68,6±6,3	63,7-73,4	0,945
<b><i>Estatura (m)</i></b>	1,5±0,1	1,4-1,6	1,6±0,1	1,5-1,6	0,009
<b><i>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</i></b>	29,5±6,3	25,7-33,3	26,7±3,4	24,9-28,6	0,173
<b><i>CC (cm)</i></b>	97,5±11,2	90,7-104,3	97±6,1	92,3-101,7	0,898
<b><i>CQ (cm)</i></b>	102,7±10,5	96,4-109,1	98,7±3,5	96-101,3	0,210
<b><i>RCQ</i></b>	0,9±0,1	0,9-1,0	0,9±0,1	0,9-1,1	0,226

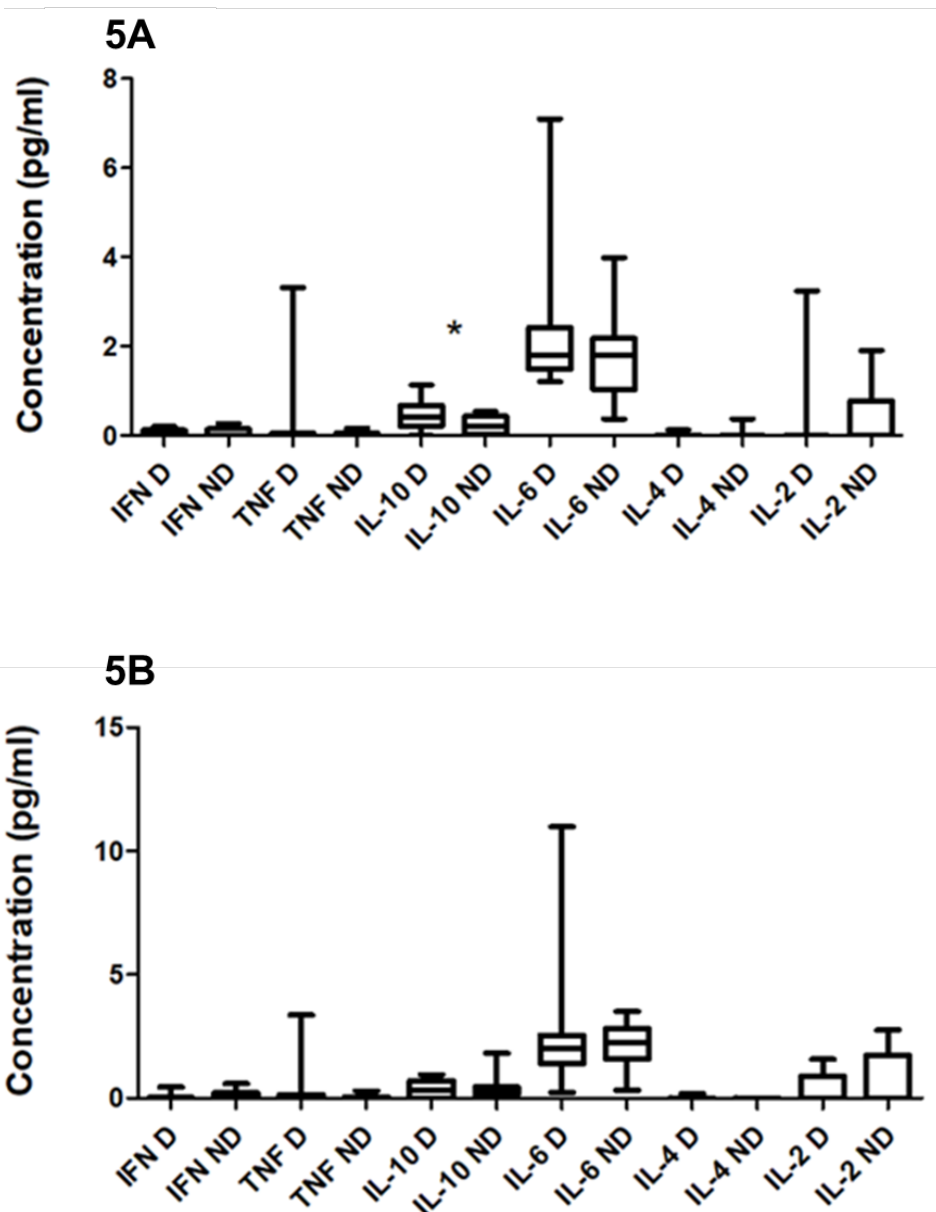
**Legenda:** IMC=Índice de Massa Corporal; CC=Circunferência da Cintura; CQ=Circunferência do Quadril; RCQ=Relação Cintura-Quadril QRMDNA=Quantidade relativa de DNA metilado. \*p valor do Teste t de Student; IC=intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 2:** Caracterização clínica e bioquímica basal dos grupos diabéticos e não diabéticos.

	<i>Não-Diabéticos (ND)</i>		<i>Diabéticos (D)</i>		<i>p*</i>
	<i>Média ± DP</i>	<i>IC</i>	<i>Média ± DP</i>	<i>IC</i>	
<i>Idade (anos)</i>	68,1±4,9	64,3-71,9	68,2±5,3	65,0-71,4	0,957
<i>MC (kg)</i>	67,2±10,3	59,3-75,1	69,2±14,9	60,2-78,2	0,713
<i>Estatura (m)</i>	1,5±0,1	1,5-1,6	1,6±0,1	1,5-1,6	0,761
<i>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</i>	28,2±4,3	24,9-31,5	28,5±5,9	25,0-32,1	0,888
<i>CC (cm)</i>	93,8±6,5	88,8-98,7	99,8±10,4	93,5-106,1	0,141
<i>CQ (cm)</i>	99,9±6,4	95,0-104,8	101,0±9,9	96,0-107,9	0,593
<i>RCQ</i>	0,9±0,5	0,9-1,0	0,9±0,5	0,9-1,1	0,698
<i>Glicemia (mg/dL)</i>	100,1±25,1	80,8-119,4	200,2±104,0	137,4-263,1	0,011
<i>QRMDNA</i>	1,73±1,10	0,88-2,58	1,72±0,78	1,25-2,20	0,990

**Legenda:** IMC=Índice de Massa Corporal; CC=Circunferência da Cintura; CQ=Circunferência do Quadril; RCQ=Relação Cintura-Quadril QRMDNA=Quantidade relativa de DNA metilado. \**p* valor do Teste t de Student; IC=intervalo de confiança de 95%.

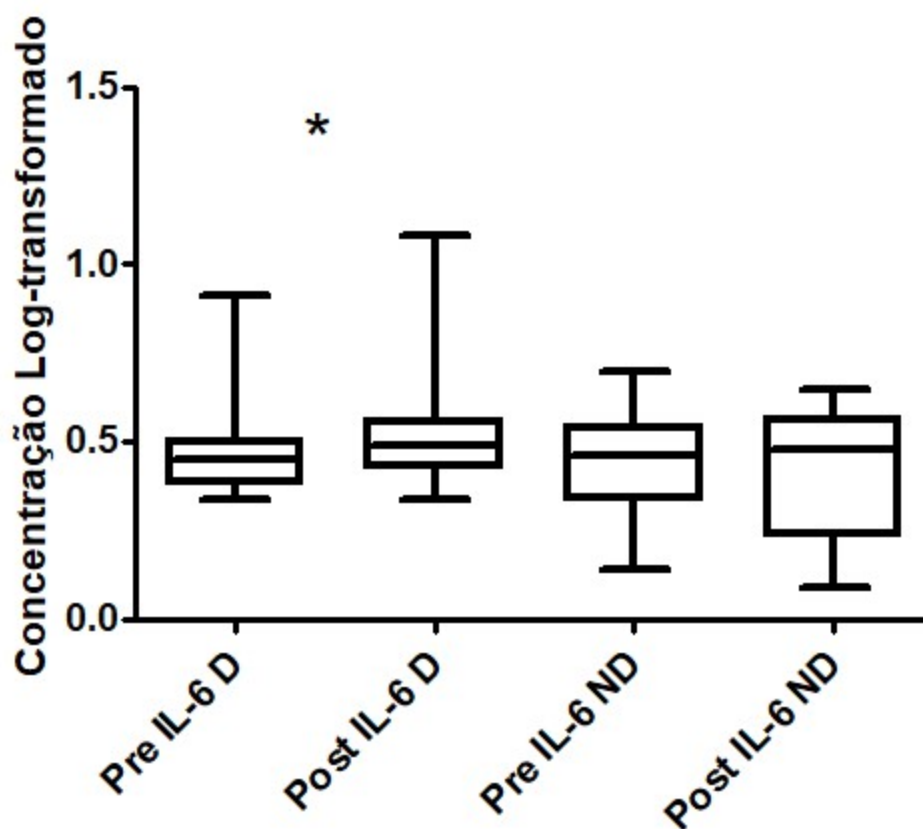
A Figura 5 (A e B) apresenta as comparações entre os níveis medianos das seis citocinas inflamatórias, nos momentos pré e pós-intervenção. Apenas a IL-10 apresentou diferença significativa na linha de base, com aumento da concentração no grupo D em relação ao ND. Comparações pós-intervenção mostraram que a diferença da linha de base não foi mantida, nem outras diferenças apareceram.



**Figura 5:** Comparação entre grupos das leituras absolutas das citocinas, em diferentes momentos de mensuração. **5A** pré-intervenção e **5B** pós-intervenção. \*  $p=0,019$ . D=diabético; ND=não diabético. Medida central expressa em mediana e barras representando percentis da distribuição dos dados.

No que diz respeito às comparações das concentrações absolutas das citocinas entre os momentos pré e pós-intervenção, as análises não revelaram diferenças ( $p>0,05$ ). No entanto, a normalização dos dados (transformação logarítmica) revelou que o grupo D apresentou um aumento pós-intervenção na IL-6

circulante ( $p=0,035$ ). Para o ND, não houve diferença entre os momentos para nenhuma das citocinas inflamatórias.



**Figura 6:** Comparação de log-transformado para IL-6. \* $p=0,035$  entre os momentos (pré e pós) intervenção para o mesmo grupo. D=diabético; ND=Não diabético. Medida central expressa em mediana, com barras representando os percentis da distribuição dos dados.

## 7 – DISCUSSÃO

Estudos mostram que os diabéticos tendem a apresentar maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias (199, 200) e um padrão diferenciado de metilação de DNA (22, 23) quando comparados com indivíduos saudáveis. No entanto, poucos estudos investigaram o efeito agudo do exercício sobre o estado inflamatório de indivíduos diabéticos submetidos ao uso de metformina. Assim, o presente estudo analisou o efeito agudo do treinamento resistido sobre o perfil inflamatório e sobre a metilação do DNA em pacientes idosos com DM2 usando esse medicamento. Os principais resultados consistiram em uma diferença significativa entre os grupos para os valores basais IL-10, com uma maior concentração no grupo D em relação ao ND. Observou-se também um aumento significativo na concentração de IL-6 com a intervenção para o grupo D e nenhum efeito foi observado na metilação total do DNA.

Sabe-se que a IL-6 em condições metabólicas propensas, aumenta e tende a resultar em um ambiente pró-inflamatório, devido à obesidade e o DM2 (14), entretanto a ação da IL-6 parece depender de uma liberação tecidual (201-203). Em nossas condições, o aumento observado da IL-6 parece estar de acordo com as evidências científicas em favor de um efeito anti-inflamatório quando a IL-6 é produzida pelo músculo (como miocina) (201, 204). Nestas condições, a liberação de IL-6 pós-exercício seria resultante de um mecanismo fisiológico específico para auxiliar na regeneração muscular, regulação do gasto energético e hipertrofia muscular (205, 206), além de ter um efeito anti-inflamatório geral quando não acompanhado pelo TNF e outros mediadores. Portanto, é possível que o aumento significativo da IL-6 após o exercício possa ter sido devido à produção do músculo esquelético, como uma adaptação fisiológica. Em favor da nossa suposição, evidências mostram que a IL-6 expressada isoladamente (como no exercício físico) pode apresentar propriedade anti-inflamatória (205). Juntos, esses achados permitem sugerir que o treinamento resistido produz marcadores inflamatórios agudos adaptativos entre idosos com DM2 (usando metformina), sendo que o mesmo não foi observado entre os pacientes não diabéticos.

As citocinas são importantes mediadores inflamatórios no DM2 (14). A IL-10 é um mediador com importantes propriedades anti-inflamatórias, diretamente

associadas ao diabetes e à obesidade (14, 16). Borowska et al (207) demonstraram que o tratamento com metformina está associado ao aumento das concentrações plasmáticas de IL-10, atenuando o perfil pró-inflamatório. Na presente pesquisa, uma diferença significativa foi encontrada entre os grupos no início do experimento, o que pode ser justificado como um possível efeito da metformina. Entretanto, o efeito agudo do treinamento resistido não parece aumentar o efeito já produzido pela metformina nessa amostra. Possivelmente, essa ausência de efeito está associada à intensidade e duração do exercício, já que evidências mostraram um aumento significativo da IL-6 e IL-10 após o exercício agudo em corredores após completar uma maratona (tempo médio: 3 h 26 min) (208, 209).

Existem evidências de que a metilação do DNA pode exercer um efeito sobre o desenvolvimento e complicações do DM2 (210, 211). Nossos achados sugerem que o protocolo de treinamento resistido aqui proposto não foi capaz de produzir respostas agudas na metilação do DNA. Entretanto Nitert et al (212) constataram que exercícios moderados e crônicos (6 meses) podem alterar o nível de metilação de genes como o receptor de adiponectina-1, receptor de bradicinina B2 e homólogos de tribble-1. Alterações epigenéticas podem ser moduladas por numerosos aspectos, como variações fenotípicas e do exercício físico (187). Portanto, é necessário realizar mais pesquisas envolvendo essa temática, a fim de compreender os possíveis efeitos (se houver) do exercício sobre o estado geral da metilação do DNA, de modo a otimizar o tratamento do DM2 (213). Além de compreender o efeito inibitório ou estimulatório do exercício sobre a metilação no DM2 Nitert et al (212), observaram que 134 genes foram alterados após 6 meses de exercício moderado, dese total 115 diminuíram e 19 mostraram um aumento significativo da metilação do DNA.

Existem poucas evidências de que o treinamento resistido possa causar mudanças epigenéticas (213). Portanto, se faz necessário aprofundar as pesquisas sobre o tema para permitir um entendimento sobre a extensão dos efeitos do exercício sobre o estado de metilação do DNA (global e / ou específico de sequência) (213), principalmente em um contexto de envelhecimento onde a polifarmácia é uma prática comum (214) e a influência de drogas (como a metformina, para citar uma) nos fenótipos induzidos pelo exercício não pode ser descartada.

## **8 – CONCLUSÃO**

Nosso protocolo de treinamento resistido agudo mostrou-se eficaz em moderar os níveis séricos da IL-10 e aumentar em paralelo os níveis da IL-6 em pacientes idosos com DM2 usando metformina, sem tais efeitos observados em pacientes não diabéticos. Não foram observados efeitos da intervenção nos escores de metilação do DNA, independentemente do grupo.



## 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Novak Sarotar B, Lainscak M. Psychocardiology in the elderly. *Wien Klin Wochenschr.* 2016;128(Suppl 7):474-9.
2. Chang MY, Chen HY. Body Composition Outcomes of a Qigong Intervention Among Community-Dwelling Aging Adults. *West J Nurs Res.* 2016;38(12):1574-94.
3. Tchkonja T, Morbeck DE, von Zglinicki T, van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell.* 2010;9(5):667–84.
4. Brostow DP, Hirsch AT, Pereira MA, Bliss RL, Kurzer MS. Nutritional status and body composition in patients with peripheral arterial disease: A cross-sectional examination of disease severity and quality of life. *Ecol Food Nutr.* 2016;55(1):87-109.
5. Cadore EL, Rodriguez-Manas L, Sinclair A, Izquierdo M. Effects of different exercise interventions on risk of falls, gait ability, and balance in physically frail older adults: a systematic review. *Rejuvenation Res.* 2013;16(2):105-14.
6. Garg PK, Koh WJH, Delaney JA, Halm EA, Hirsch CH, Longstreth WT, Jr., et al. Risk Factors for Incident Carotid Artery Revascularization among Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *Cerebrovasc Dis Extra.* 2016;6(3):129-39.
7. Lenasi H, Klonizakis M. Assessing the evidence: Exploring the effects of exercise on diabetic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;64(4):663-78.
8. Budoff MJ, Raggi P, Beller GA, Berman DS, Druz RS, Malik S, et al. Noninvasive Cardiovascular Risk Assessment of the Asymptomatic Diabetic Patient: The Imaging Council of the American College of Cardiology. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2016;9(2):176-92.
9. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27(5):1047-53.
10. Iser BPM, Stopa SR, Chueiri PS, Szwarcwald CL, Malta DC, Monteiro HOdC, et al. Prevalência de diabetes autorreferido no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 2015;24(2):305-14.
11. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2010;33 Suppl 1:S62-9.
12. Rohling M, Herder C, Stemper T, Mussig K. Influence of Acute and Chronic Exercise on Glucose Uptake. *J Diabetes Res.* 2016;2016:2868652.

13. Aumueller E, Remely M, Baeck H, Hippe B, Brath H, Haslberger AG. Interleukin-6 CpG Methylation and Body Weight Correlate Differently in Type 2 Diabetes Patients Compared to Obese and Lean Controls. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2015;8(1):26-35.
14. Rodrigues KF, Pietrani NT, Bosco AA, Campos FMF, Sandrim VC, Gomes KB. IL-6, TNF-alpha, and IL-10 levels/polymorphisms and their association with type 2 diabetes mellitus and obesity in Brazilian individuals. *Arch Endocrinol Metab*. 2017;61(5):438-46.
15. Boraska V, Rayner NW, Groves CJ, Frayling TM, Diakite M, Rockett KA, et al. Large-scale association analysis of TNF/LTA gene region polymorphisms in type 2 diabetes. *BMC Med Genet*. 2010;11:69.
16. Erdogan M, Cetinkalp S, Ozgen AG, Saygili F, Berdeli A, Yilmaz C. Interleukin-10 (-1082G/A) gene polymorphism in patients with type 2 diabetes with and without nephropathy. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16(2):91-4.
17. Curti MLR, Pires MM, Barros CR, Siqueira-Catania A, Rogero MM, Ferreira SRG. Associations of the TNF-alpha -308 G/A, IL6 -174 G/C and AdipoQ 45 T/G polymorphisms with inflammatory and metabolic responses to lifestyle intervention in Brazilians at high cardiometabolic risk. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4(49):1.
18. Tang L, Ye H, Hong Q, Wang L, Wang Q, Wang H, et al. Elevated CpG island methylation of GCK gene predicts the risk of type 2 diabetes in Chinese males. *Gene*. 2014;547(2):329-33.
19. Jeon JP, Koh IU, Choi NH, Kim BJ, Han BG, Lee S. Differential DNA methylation of MSI2 and its correlation with diabetic traits. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177406.
20. McKay JA, Mathers JC. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;202(2):103-18.
21. Petersen AK, Zeilinger S, Kastenmuller G, Romisch-Margl W, Brugger M, Peters A, et al. Epigenetics meets metabolomics: an epigenome-wide association study with blood serum metabolic traits. *Hum Mol Genet*. 2014;23(2):534-45.
22. Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, et al. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol*. 2012;26(7):1203-12.
23. Nilsson E, Jansson PA, Perfilyev A, Volkov P, Pedersen M, Svensson MK, et al. Altered DNA Methylation and Differential Expression of Genes Influencing Metabolism and Inflammation in Adipose Tissue From Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2014;63(9):2962-76.

24. Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, Bork-Jensen J, Lara E, Calvanese V, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation differences in muscle and fat from monozygotic twins discordant for type 2 diabetes. *PLoS One*. 2012;7(12):e51302.
25. Dayeh T, Volkov P, Salo S, Hall E, Nilsson E, Olsson AH, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS Genet*. 2014;10(3):e1004160.
26. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, CV, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000;49(12):2063-9.
27. Balducci S, Sacchetti M, Haxhi J, Orlando G, D'Errico V, Fallucca S, et al. Physical exercise as therapy for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014;30 Suppl 1:13-23.
28. Lee JH, Lee R, Hwang MH, Hamilton MT, Park Y. The effects of exercise on vascular endothelial function in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2018;10:15.
29. Veras R. Population aging today: demands, challenges and innovations. *Rev Saúde Pública*. 2009;43(3):548-54.
30. Lu W, Pikhart H, Sacker A. Domains and Measurements of Healthy Aging in Epidemiological Studies: A Review. *Gerontologist*. 2019;59(4):e294-e310.
31. Estatística IBdGe. Síntese de Indicadores Sociais Uma Análise das Condições de Vida da População Brasileira IBGE. 2020.
32. (NCD-RisC) NRFC. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *The Lancet*. 2016;April 7.
33. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;138:271-81.
34. Toniolo A, Cassani G, Puggioni A, Rossi A, Colombo A, Onodera T, et al. The diabetes pandemic and associated infections: suggestions for clinical microbiology. *Rev Med Microbiol*. 2019;30(1):1-17.
35. Bertoldi AD, Kanavos P, França GVA, Carraro A, Tejada CAO, Hallal PC, et al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. *Globalization and Health*. 2013;3(9):62.

36. Malerbi DA, Franco LJ, prevalence TBCGotsod. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes Care*. 1992;15:1509–16.
37. Flor LS, Campos MR. The prevalence of diabetes mellitus and its associated factors in the Brazilian adult population: evidence from a population-based survey. *Rev Bras Epidemiol*. 2017;20(1):16-29.
38. Ahmed AM. History of Diabetes Mellitus. *Saudi medical journal*. 2002;23(4):373-8.
39. Ebbell B. *The papyrus Ebers*. Copenhagen and Oxford: Oxford University Press. 1937:115.
40. Algaonker SS. Diabetes mellitus as seen in Ancient Ayurvedic Medicine. In: Bajaj AS, editor. *Insulin and Metabolism*. Bombay (India). Indian Press. 1972:1-19.
41. Araetus C. *On causes and symptoms of chronic diseases*. Translated by Adam CF. London Sydenham Society. 1856:138.
42. Iskeandar AZ. Arabic-Islamic medicine and its influence on the Latin West. *Medical Journal of Islamic World*. 1986;1:64-7.
43. Bernard C. *Piqure diabetes*. *Memorna Societa de Biological*. 1849;1:80-92.
44. Langerhans P. *Contributions to the microscopic anatomy of the pancreas*. The John Hopkin's Press. 1937:85-105.
45. Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJD. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2002;46(1):16-26.
46. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 1994;331:1428-36.
47. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J-I, Matsuzawa Y, Group tOIS. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. *N Engl J Med*. 2000;342:301-7.
48. Organization WH. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation*. Geneva, World Health Organization. 1999:59p.
49. Eriksson J, Forsén B, Häggblom M, Teppo A-M, Groop L. Clinical and metabolic characteristics of type 1 and type 2 diabetes: an epidemiological study from the Närpes community in Western Finland. *Diabet Med*. 1999;9:654-60.

50. Firdous P, Nissar K, Ali S, Ganai BA, Shabir U, Hassan T, et al. Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:253.
51. Jang KM. Maturity-onset diabetes of the young: update and perspectives on diagnosis and treatment. *Yeungnam Univ J Med*. 2020;37(1):13-21.
52. Nkonge KM, Nkonge DK, Nkonge TN. The epidemiology, molecular pathogenesis, diagnosis, and treatment of maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Clin Diabetes Endocrinol*. 2020;6(1):20.
53. Belosludtsev KN, Belosludtseva NV, Dubinin MV. Diabetes Mellitus, Mitochondrial Dysfunction and Ca(2+)-Dependent Permeability Transition Pore. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18).
54. Sanyoura M, Philipson LH, Naylor R. Monogenic Diabetes in Children and Adolescents: Recognition and Treatment Options. *Curr Diab Rep*. 2018;18(8):58.
55. Mirghani Dirar A, Doupis J. Gestational diabetes from A to Z. *World J Diabetes*. 2017;8(12):489-511.
56. Dias S, Pheiffer C, Abrahams Y, Rheeder P, Adam S. Molecular Biomarkers for Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).
57. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11).
58. Verhulst MJL, Loos BG, Gerdes VEA, Teeuw WJ. Evaluating All Potential Oral Complications of Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:56.
59. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Diabetes*. 2008;26:77-82.
60. Diabetes C, Complications Trial/Epidemiology of Diabetes I, Complications Research G, Nathan DM, Zinman B, Cleary PA, et al. Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2005). *Arch Intern Med*. 2009;169(14):1307-16.
61. Group AC. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;358(24):2560-72.
62. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25.
63. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058-70.

64. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-20.
65. Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:3818196.
66. Cohen-Or I, Katz C, Ron EZ. AGEs Secreted by Bacteria Are Involved in the Inflammatory Response. *PLoS One*. 2011;6(3):e17974.
67. Ramana KV, Friedrich B, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK. Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B by Hyperglycemia in Vascular Smooth Muscle Cells Is Regulated by Aldose Reductase. *Diabetes*. 2004;53(11):2910-20.
68. Yaribeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, Sahebkar A. Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:8609213.
69. Jezek P, Jaburek M, Plecita-Hlavata L. Contribution of Oxidative Stress and Impaired Biogenesis of Pancreatic beta-Cells to Type 2 Diabetes. *Antioxid Redox Signal*. 2019;31(10):722-51.
70. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab*. 2013;17(1):20-33.
71. Khan SA, Ali A, Khan SA, Zahran SA, Damanhour G, Azhar E, et al. Unraveling the complex relationship triad between lipids, obesity, and inflammation. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:502749.
72. Alsafar H, Hassoun A, Almazrouei S, Kamal W, Almaini M, Odama U, et al. Association of Angiotensin Converting Enzyme Insertion-Deletion Polymorphism with Hypertension in Emiratis with Type 2 Diabetes Mellitus and Its Interaction with Obesity Status. *Dis Markers*. 2015;2015:536041.
73. Boulbou MS, Koukoulis GN, Makri ED, Petinaki EA, Gourgoulisanis KI, Germenis AE. Circulating adhesion molecules levels in type 2 diabetes mellitus and hypertension. *Int J Cardiol*. 2005;98(1):39-44.
74. Daryabor G, Atashzar MR, Kabelitz D, Meri S, Kalantar K. The Effects of Type 2 Diabetes Mellitus on Organ Metabolism and the Immune System. *Front Immunol*. 2020;11:1582.
75. Moxey PW, Gogalniceanu P, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Jones KJ, Thompson MM, et al. Lower extremity amputations--a review of global variability in incidence. *Diabet Med*. 2011;28(10):1144-53.
76. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, et al. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):42.

77. Rubsam A, Parikh S, Fort PE. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4).
78. Lindblom R, Higgins G, Coughlan M, de Haan JB. Targeting Mitochondria and Reactive Oxygen Species-Driven Pathogenesis in Diabetic Nephropathy. *Rev Diabet Stud.* 2015;12(1-2):134-56.
79. Marin-Penalver JJ, Martin-Timon I, Sevillano-Collantes C, Del Canizo-Gomez FJ. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2016;7(17):354-95.
80. Song R. Mechanism of Metformin: A Tale of Two Sites. *Diabetes Care.* 2016;39(2):187-9.
81. Garber AJ, Abrahamson MJ, Barzilay JI, Blonde L, Bloomgarden ZT, Bush MA, et al. Consensus Statement by the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the Comprehensive Type 2 Diabetes Management Algorithm--2016 Executive Summary. *Endocr Pract.* 2016;22(1):84-113.
82. An H, He L. Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J Endocrinol.* 2016;228(3):R97-106.
83. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care.* 1989;12(8):553-64.
84. Santomauro Jún AC, Ugolini MR, Santomauro AT, Souto RPd. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2008;52:120-5.
85. Huang ES, Liu JY, H. MH, John PM, Karter AJ. Glycemic control, complications, and death in older diabetic patients the diabetes and aging study. *Diabetes Care.* 2011;34(6):1329-36.
86. Schlender L, Martinez YV, Adeniji C, Reeves D, Faller B, Sommerauer C, et al. Efficacy and safety of metformin in the management of type 2 diabetes mellitus in older adults: a systematic review for the development of recommendations to reduce potentially inappropriate prescribing. *BMC Geriatr.* 2017;17(Suppl 1):227.
87. Roumie CL, Hung AM, Greevy RA, Grijalva CG, Liu X, Murff HJ, et al. Comparative effectiveness of sulfonylurea and metformin monotherapy on risk of cardiovascular events in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 2012;157(9):601-9.
88. Tzoulaki I, Molokhia M, Curcin V, Little MP, Millett CJ, Ng A, et al. Risk of cardiovascular disease and all cause mortality among patients with type 2 diabetes prescribed oral antidiabetes drugs: retrospective cohort study using UK general practice research database. *BMJ.* 2009;339:b4731.

89. Lapane KL, Jesdale BM, Dube CE, Pimentel CB, Rajpathak SN. Sulfonylureas and risk of falls and fractures among nursing home residents with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015;109(2):411-9.
90. Hung YC, Lin CC, Wang TY, Chang MP, Sung FC, Chen CC. Oral hypoglycaemic agents and the development of non-fatal cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013;29(8):673-9.
91. Evans JM, Doney AS, AlZadjali MA, Ogston SA, Petrie JR, Morris AD, et al. Effect of Metformin on mortality in patients with heart failure and type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2010;106(7):1006-10.
92. Evia-Viscarra ML, Rodea-Montero ER, Apolinar-Jimenez E, Munoz-Noriega N, Garcia-Morales LM, Leanos-Perez C, et al. The effects of metformin on inflammatory mediators in obese adolescents with insulin resistance: controlled randomized clinical trial. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2012;25(1-2):41-9.
93. Goldberg RB, Temprosa MG, Mather KJ, Orchard TJ, Kitabchi AE, Watson KE, et al. Lifestyle and metformin interventions have a durable effect to lower CRP and tPA levels in the diabetes prevention program except in those who develop diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37(8):2253-60.
94. Janka HU, Plewe G, Busch K. Combination of oral antidiabetic agents with basal insulin versus premixed insulin alone in randomized elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc.* 2007;55(2):182-8.
95. Saisho Y. Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2015;15(3):196-205.
96. Isoda K, Young JL, Zirlik A, MacFarlane LA, Tsuboi N, Gerdes N, et al. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(3):611-7.
97. Zheng Z, Chen H, Li J, Li T, Zheng B, Zheng Y, et al. Sirtuin 1-Mediated Cellular Metabolic Memory of High Glucose Via the LKB1/AMPK/ROS Pathway and Therapeutic Effects of Metformin. *Diabetes.* 2011;61(1):217-28.
98. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S34-45.
99. Gery I, Waksman BH. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J Exp Med.* 1972;136(1):143-55.
100. Mier JW, Gallo RC. Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980;77(10):6134-8.



101. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45777-84.
102. Moschen AR, Molnar C, Geiger S, Graziadei I, Ebenbichler CF, Weiss H, et al. Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor  $\alpha$  expression. *Gut.* 2010;59(9):1259-64.
103. Oh KJ, Lee DS, Kim WK, Han BS, Lee SC, Bae KH. Metabolic Adaptation in Obesity and Type II Diabetes: Myokines, Adipokines and Hepatokines. *Int J Mol Sci.* 2016;18(1).
104. Mishima Y, Kuyama A, Tada A, Takahashi K, Ishioka T, Kibata M. Relationship between serum tumor necrosis factor- $\alpha$  and insulin resistance in obese men with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001;52(2):119-23.
105. Gastaldelli A, Basta G. Ectopic fat and cardiovascular disease: what is the link? *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20(7):481-90.
106. Abbatecola AM, Ferrucci L, Grella R, S. B, Bonafè M, Barbieri M, et al. Diverse effect of inflammatory markers on insulin resistance and insulin-resistance syndrome in the elderly. *J Am Geriatr Soc.* 2004;52(3):399-404.
107. Greiwe JS, Cheng B, Rubin DC, Yarasheski KE, Semenkovich CF. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor  $\alpha$  in frail elderly humans. *FASEB J.* 2001;15(2):475-82.
108. Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Skeletal Muscle Insulin Resistance in Healthy Human Subjects via Inhibition of Akt Substrate 160 Phosphorylation. *Diabetes.* 2005;54(10):2939-45.
109. Consitt LA, Clark BC. The Vicious Cycle of Myostatin Signaling in Sarcopenic Obesity: Myostatin Role in Skeletal Muscle Growth, Insulin Signaling and Implications for Clinical Trials. *J Frailty Aging.* 2018;7(1):21-7.
110. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med.* 2009;27(5):351-7.
111. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6(8):597-610.
112. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013;14(3):204-20.

113. Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009;462(7271):315-22.
114. Samblas M, Milagro FI, Martinez A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. *Epigenetics*. 2019;14(5):421-44.
115. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(5):1412-7.
116. Shen L, Zhu J, Li SYR, Fan X. Detect differentially methylated regions using non-homogeneous hidden Markov model for methylation array data. *Bioinformatics*. 2017;33(23):3701–8.
117. Zhang Y, Liu H, Lv J, Xiao X, Zhu J, Liu X, et al. QDMR: a quantitative method for identification of differentially methylated regions by entropy. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(9):e58.
118. Bansal A, Pinney SE. DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2017;18(3):167-77.
119. Zhang D, Cheng L, Badner JA, Chen C, Chen Q, Luo W, et al. Genetic control of individual differences in gene-specific methylation in human brain. *Am J Hum Genet*. 2010;86(3):411-9.
120. Olsson AH, Volkov P, Bacos K, Dayeh T, Hall E, Nilsson EA, et al. Genome-wide associations between genetic and epigenetic variation influence mRNA expression and insulin secretion in human pancreatic islets. *PLoS Genet*. 2014;10(11):e1004735.
121. Sandovici I, Smith NH, Nitert MD, Ackers-Johnson M, Uribe-Lewis S, Ito Y, et al. Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the *Hnf4a* gene in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(13):5449-54.
122. Knop MR, Geng TT, Gorny AW, Ding R, Li C, Ley SH, et al. Birth Weight and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus, Cardiovascular Disease, and Hypertension in Adults: A Meta-Analysis of 7 646 267 Participants From 135 Studies. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(23):e008870.
123. Yang BT, Dayeh TA, Kirkpatrick CL, Taneera J, Kumar R, Groop L, et al. Insulin promoter DNA methylation correlates negatively with insulin gene expression and positively with HbA1c levels in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2011;54(2):360-7.
124. Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Deplus R, et al. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J*. 2012;31(6):1405-26.

125. Hall E, Dayeh T, Kirkpatrick CL, Wollheim CB, Nitert MD, Ling C. DNA methylation of the glucagon-like peptide 1 receptor (GLP1R) in human pancreatic islets. *BMC Med Genet*. 2013;23(14):76.
126. Gillberg L, Ling C. The potential use of DNA methylation biomarkers to identify risk and progression of type 2 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:43.
127. Franks PW, Ling C. Epigenetics and obesity: the devil is in the details. *BMC Medicine*. 2010;8(8).
128. Zykovich A, Hubbard A, Flynn JM, Tarnopolsky M, Fraga MF, Kerksick C, et al. Genome-wide DNA methylation changes with age in disease-free human skeletal muscle. *Aging Cell*. 2014;13(2):360-6.
129. Sakuma K, Aoi W, Yamaguchi A. The intriguing regulators of muscle mass in sarcopenia and muscular dystrophy. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:230.
130. Rönn T, Poulsen P, Hansson O, Holmkvist J, Almgren P, Nilsson P, et al. Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle. *Diabetologia*. 2008;51(7):1159-68.
131. Ling C, Poulsen P, Simonsson S, Ronn T, Holmkvist J, Almgren P, et al. Genetic and epigenetic factors are associated with expression of respiratory chain component NDUF6 in human skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3427-35.
132. Ling C, Poulsen P, Carlsson E, Ridderstråle M, Almgren P, Wojtaszewski J, et al. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  gene expression in twins. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(10):1518-26.
133. Schaeffeler E, Hellerbrand C, Nies AT, Winter S, Kruck S, Hofmann U, et al. DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma. *Genome Med*. 2011;3(12):82.
134. Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, Kerb R, et al. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology*. 2009;50(4):1227-40.
135. Chen L, Hong C, Chen EC, Yee SW, Xu L, Almof EU, et al. Genetic and epigenetic regulation of the organic cation transporter 3, SLC22A3. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(2):110-20.
136. Garcia-Calzon S, Perfilyev A, Mannisto V, de Mello VD, Nilsson E, Pihlajamaki J, et al. Diabetes medication associates with DNA methylation of metformin transporter genes in the human liver. *Clin Epigenetics*. 2017;9:102.

137. Barres R, Osler ME, Yan J, Rune A, Fritz T, Caidahl K, et al. Non-CpG methylation of the PGC-1 $\alpha$  promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab.* 2009;10(3):189-98.
138. Jørgensen SW, Brøns C, Bluck L, Hjort L, Færch K, Thankamony A, et al. Metabolic response to 36 hours of fasting in young men born small vs appropriate for gestational age. *Diabetologia.* 2014;58:178-87.
139. Gillberg L, Jacobsen SC, Ronn T, Brons C, Vaag A. PPARGC1A DNA methylation in subcutaneous adipose tissue in low birth weight subjects--impact of 5 days of high-fat overfeeding. *Metabolism.* 2014;63(2):263-71.
140. Brons C, Jacobsen S, Nilsson E, Ronn T, Jensen CB, Storgaard H, et al. Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of PPARGC1A in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(6):3048-56.
141. Sookoian S, Rosselli MS, Gemma C, Burgueno AL, Fernandez Gianotti T, Castano GO, et al. Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$  promoter. *Hepatology.* 2010;52(6):1992-2000.
142. Gillberg L, Jacobsen SC, Ribel-Madsen R, Gjesing AP, Boesgaard TW, Ling C, et al. Does DNA methylation of PPARGC1A influence insulin action in first degree relatives of patients with type 2 diabetes? *PLoS One.* 2013;8(3):e58384.
143. Ishikawa K, Tsunekawa S, Ikeniwa M, Izumoto T, Iida A, Ogata H, et al. Long-term pancreatic beta cell exposure to high levels of glucose but not palmitate induces DNA methylation within the insulin gene promoter and represses transcriptional activity. *PLoS One.* 2015;10(2):e0115350.
144. Zhong T, Men Y, Lu L, Geng T, Zhou J, Mitsuhashi A, et al. Metformin alters DNA methylation genome-wide via the H19/SAHH axis. *Oncogene.* 2017;36(17):2345-54.
145. Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50(5):889-96.
146. Lexell J, Taylor CC, Sjöström M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci.* 1988;84(2-3):275-94.
147. Coggan AR, Spina RJ, King DS, Rogers MA, Brown M, Nemeth PM, et al. Histochemical and enzymatic comparison of the gastrocnemius muscle of young and elderly men and women. *J Gerontol.* 1992;47(3):B71-6.

148. Murgia M, Toniolo L, Nagaraj N, Ciciliot S, Vindigni V, Schiaffino S, et al. Single Muscle Fiber Proteomics Reveals Fiber-Type-Specific Features of Human Muscle Aging. *Cell Rep.* 2017;19(11):2396-409.
149. Gaster M, Poulsen P, Handberg A, Schroder HD, Beck-Nielsen H. Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278(5):E910-6.
150. Consitt LA, Meter JV, Newton CA, Collier DN, Dar MS, Wojtaszewski JFP, et al. Impairments in site-specific AS160 phosphorylation and effects of exercise training. *Diabetes.* 2013;62(10):3437-47.
151. Petersen KF, Morino K, Alves TC, Kibbey RG, Dufour S, Sono S, et al. Effect of aging on muscle mitochondrial substrate utilization in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(36):11330-4.
152. Kramer HF, Witczak CA, Fujii N, Jessen N, Taylor EB, Arnolds DE, et al. Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes.* 2006;55(7):2067-76.
153. Sharma P, Arias EB, Cartee GD. Protein Phosphatase 1-alpha Regulates AS160 Ser588 and Thr642 Dephosphorylation in Skeletal Muscle. *Diabetes.* 2016;65(9):2606-17.
154. Ng Y, Ramm G, Burchfield JG, Coster AC, Stockli J, James DE. Cluster analysis of insulin action in adipocytes reveals a key role for Akt at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2010;285(4):2245-57.
155. Geraghty KM, Chen S, Harthill JE, Ibrahim AF, Toth R, Morrice NA, et al. Regulation of multisite phosphorylation and 14-3-3 binding of AS160 in response to IGF-1, EGF, PMA and AICAR. *Biochem J.* 2007;407(2):231-41.
156. Healy GN, Wijndaele K, Dunstan DW, Shaw JE, Salmon J, Zimmet PZ, et al. Objectively measured sedentary time, physical activity, and metabolic risk: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study (AusDiab). *Diabetes Care.* 2008;31(2):369-71.
157. Bangsbo J, Blackwell J, Boraxbekk CJ, Caserotti P, Dela F, Evans AB, et al. Copenhagen Consensus statement 2019: physical activity and ageing. *Br J Sports Med.* 2019;53(14):856-8.
158. Amati F, Dube JJ, Coen PM, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Goodpaster BH. Physical inactivity and obesity underlie the insulin resistance of aging. *Diabetes Care.* 2009;32(8):1547-9.
159. Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *The Lancet.* 2012;380(9838):219-29.

160. Jonker JT, De Laet C, Franco OH, Peeters A, Mackenbach J, Nusselder WJ. Physical activity and life expectancy with and without diabetes: life table analysis of the Framingham Heart Study. *Diabetes Care*. 2006;29(1):38-43.
161. Balkau B, Mhamdi L, Oppert JM, Nolan J, Golay A, Porcellati F, et al. Physical activity and insulin sensitivity: the RISC study. *Diabetes*. 2008;57(10):2613-8.
162. de Guia RM, Agerholm M, Nielsen TS, Consitt LA, Sogaard D, Helge JW, et al. Aerobic and resistance exercise training reverses age-dependent decline in NAD(+) salvage capacity in human skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2019;7(12):e14139.
163. Coker RH, Hays NP, Williams RH, Brown AD, Freeling SA, Kortebein PM, et al. Exercise-induced changes in insulin action and glycogen metabolism in elderly adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38(3):433-8.
164. Sylow L, Richter EA. Current advances in our understanding of exercise as medicine in metabolic disease. *Current Opinion in Physiology*. 2019;12:12-9.
165. Chacko E. A time for exercise: the exercise window. *J Appl Physiol* (1985). 2017;122(1):206-9.
166. Pedersen AJT, Hingst JR, Friedrichsen M, Kristensen JM, Højlund K, Wojtaszewski JFP. Dysregulation of muscle glycogen synthase in recovery from exercise in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2015;58:1569-78.
167. Rosendal L, Sogaard K, Kjaer M, Sjogaard G, Langberg H, Kristiansen J. Increase in interstitial interleukin-6 of human skeletal muscle with repetitive low-force exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2005;98(2):477-81.
168. Pedersen BK, Fischer CP. Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28(4):152-6.
169. Pedersen BK. IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:1295-7.
170. Pedersen BK. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise and cytokines. *Immunol Cell Biol*. 2000;78(5):532-5.
171. Hoene M, Runge H, Haring HU, Schleicher ED, Weigert C. Interleukin-6 promotes myogenic differentiation of mouse skeletal muscle cells: role of the STAT3 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304(2):C128-36.
172. Ruderman NB, Keller C, Richard AM, Saha AK, Luo Z, Xiang X, et al. Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2006;55 Suppl 2:S48-54.
173. Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ruderman NB. Activation of AMP-activated protein kinase by interleukin-6 in rat skeletal muscle: association with changes

- in cAMP, energy state, and endogenous fuel mobilization. *Diabetes*. 2009;58(9):1953-60.
174. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 2006;55(10):2688-97.
  175. Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol*. 2001;536(Pt. 2):329-37.
  176. Pedersen BK, Fischer CP. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(3):265-71.
  177. Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Pedersen BK. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal. *J Physiol* 2000;529 Pt 1(Pt1):237-42.
  178. Febbraio MA, Hiscock N, M. S, Fischer CP, Pedersen BK. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes*. 2004;53(7):1643-8.
  179. Pedersen L, Pilegaard H, Hansen J, Brandt C, Adser H, Hidalgo J, et al. Exercise-induced liver chemokine CXCL-1 expression is linked to muscle-derived interleukin-6 expression. *J Physiol*. 2011;589(Pt 6):1409-20.
  180. Kondo T, Kobayashi I, Murakami M. Effect of exercise on circulating adipokine levels in obese young women. *Endocr J*. 2006;53(2):189-95.
  181. Phillips MD, Patrizi RM, Cheek DJ, Wooten JS, Barbee JJ, Mitchell JB. Resistance training reduces subclinical inflammation in obese, postmenopausal women. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(11):2099-110.
  182. Christiansen T, Bruun JM, Paulsen SK, Olholm J, Overgaard K, Pedersen SB, et al. Acute exercise increases circulating inflammatory markers in overweight and obese compared with lean subjects. *Eur J Appl Physiol*. 2013;113(6):1635-42.
  183. Macedo Santiago LA, Neto LGL, Borges Pereira G, Leite RD, Mostarda CT, de Oliveira Brito Monzani J, et al. Effects of Resistance Training on Immunoinflammatory Response, TNF-Alpha Gene Expression, and Body Composition in Elderly Women. *J Aging Res*. 2018;2018:1467025.
  184. Olesen J, Gliemann L, Bienso R, Schmidt J, Hellsten Y, Pilegaard H. Exercise training, but not resveratrol, improves metabolic and inflammatory status in skeletal muscle of aged men. *J Physiol*. 2014;592(8):1873-86.
  185. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in

- Lifestyle among Subjects with Impaired Glucose Tolerance. *N Engl J Med.* 2001;334(18):1343-50.
186. Davegardh C, Garcia-Calzon S, Bacos K, Ling C. DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans. *Mol Metab.* 2018;14:12-25.
  187. Ronn T, Ling C. Effect of exercise on DNA methylation and metabolism in human adipose tissue and skeletal muscle. *Epigenomics.* 2013;5(6):603-5.
  188. Meex RC, Schrauwen-Hinderling VB, Moonen-Kornips E, Schaart G, Mensink M, Phielix E, et al. Restoration of muscle mitochondrial function and metabolic flexibility in type 2 diabetes by exercise training is paralleled by increased myocellular fat storage and improved insulin sensitivity. *Diabetes.* 2010;59(3):572-9.
  189. Barres R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, Fritz T, et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab.* 2012;15(3):405-11.
  190. Ronn T, Volkov P, Davegardh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, et al. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet.* 2013;9(6):e1003572.
  191. Lindholm ME, Marabita F, Gomez-Cabrero D, Rundqvist H, Ekstrom TJ, Tegner J, et al. An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training. *Epigenetics.* 2014;9(12):1557-69.
  192. Pawlyk AC, Giacomini KM, McKeon C, Shuldiner AR, Florez JC. Metformin pharmacogenomics: current status and future directions. *Diabetes.* 2014;63(8):2590-9.
  193. Jiang S, Teague AM, Tryggstad JB, Jensen ME, Chernausek SD. Role of metformin in epigenetic regulation of placental mitochondrial biogenesis in maternal diabetes. *Sci Rep.* 2020;10(1):8314.
  194. Morais Junior GS, Souza VC, Machado-Silva W, Henriques AD, Melo Alves A, Barbosa Morais D, et al. Acute strength training promotes responses in whole blood circulating levels of miR-146a among older adults with type 2 diabetes mellitus. *Clin Interv Aging.* 2017;12:1443-50.
  195. Association WH. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization technical report series. 1995;854:1-452.
  196. Association WH. Global recommendations on physical activity for health In: Geneva: World Health Organization. 2010:p. 60.



197. Romero-Arenas S, Martinez-Pascual M, Alcaraz PE. Impact of resistance circuit training on neuromuscular, cardiorespiratory and body composition adaptations in the elderly. *Aging Dis.* 2013;4(5):256-63.
198. Rikli RE, Jones CJ. Development and validation of criterion-referenced clinically relevant fitness standards for maintaining physical independence in later years. *Gerontologist.* 2013;53(2):255-67.
199. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-7.
200. Hu FB, Meigs JB, Y. LT, Rifai N, Manson JAE. Inflammatory Markers and Risk of Developing Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes.* 2004;53(3):693-700.
201. Broholm C, Laye MJ, Brandt C, Vadalasetty R, Pilegaard H, Pedersen BK, et al. LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation. *J Appl Physiol (1985).* 2011;111(1):251-9.
202. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc.* 2004;63(2):263-7.
203. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005;98(4):1154-62.
204. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(8):457-65.
205. Munoz-Canoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J.* 2013;280(17):4131-48.
206. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1379-406.
207. Borowska M, Dworacka M, Wesolowska A, Winiarska H, Krzyzagoska E, Dworacki G. The Impact of Pharmacotherapy of Type 2 Diabetes Mellitus on IL-1beta, IL-6 and IL-10 Secretion. *Pharmacology.* 2016;97(3-4):189-94.
208. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.* 1999;515(Pt1):287-91.
209. Ostrowski K, Schjerling P, Pedersen BK. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2000;83(6):512-5.
210. Intine RV, Sarras MP, Jr. Metabolic memory and chronic diabetes complications: potential role for epigenetic mechanisms. *Curr Diab Rep.* 2012;12(5):551-9.

- 211.** Yu Y, Mingjiao W, Yang X, Sui M, Zhang T, Liang J, et al. Association between DNA methylation of SORL1 5'-flanking region and mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016;77(6):625-32.
- 212.** Nitert MD, Dayeh T, Volkov P, Elgzyri T, Hall E, Nilsson E, et al. Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012;61(12):3322-32.
- 213.** Ronn T, Ling C. DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against Type 2 diabetes. *Epigenomics*. 2015;7(3):451-60.
- 214.** Bortolon PC, de Medeiros EFF, Naves JOS, Karnikowski MG, Nóbrega OdT. Analysis of the self-medication pattern among Brazilian elderly women. *Cien Saude Colet* 2008;13(4):1219-26.

## Research Article

NeuroImmunoModulation

Neuroimmunomodulation  
DOI: 10.1159/000502746Received: February 26, 2019  
Accepted after revision: August 12, 2019  
Published online: September 25, 2019**Resistance Training Modulates the Humoral Inflammatory (but Not the DNA Methylation) Profile of Diabetic Older Adults Using Metformin**Gilberto Santos Morais Junior<sup>a</sup> Vinicius Carolino Souza<sup>a</sup> Wilcelly Machado-Silva<sup>a</sup>  
Adriane Dallanora Henriques<sup>a</sup> Gleiciane Gontijo Avelar<sup>a</sup>  
Diego Ignacio Valenzuela Perez<sup>b</sup> Ricardo Moreno Lima<sup>a</sup>  
Roberto Jerônimo Santos Silva<sup>c</sup> Ciro José Brito<sup>d</sup> Otávio Toledo Nóbrega<sup>a</sup><sup>a</sup> Medical Faculty, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Brazil; <sup>b</sup> Kinesiology School and Physical Activity and Sports Science Master Program, Universidad Santo Tomás, Puerto Mont, Chile; <sup>c</sup> Physical Education Department, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, Brazil; <sup>d</sup> Physical Education Department, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil© **Free Author Copy** - for personal use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses.

**Keywords**

Diabetes · Physical exercise · Interleukin-6 · DNA methylation · Elderly

**Abstract**

**Background and Aim:** Inflammatory and methylation imbalances occur in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). The aim of the present study was to analyze the effect of acute resistance exercise on the inflammatory profile and on DNA methylation of elderly patients with T2DM using metformin. **Methods:** For this purpose, we enrolled 22 male and female older adults (68.2 ± 5.3 years), of whom 13 had controlled T2DM (D) under metformin use and 9 were nondiabetics (ND). All subjects underwent a neuromuscular circuit (8 exercises in 40 min, with each exercise performed in 3 sets of 40 s each and a 20-s interval between repetitions). **Results:** The main results indicated a significant difference between groups for baseline interleukin (IL)-10, with a higher concentration in the D group compared to the ND group ( $p = 0.019$ ). An increase in IL-6 concentration after intervention was observed in group D ( $p = 0.035$ ). No effect was observed in total

DNA methylation within or between groups. **Conclusions:** The resistance training protocol applied in this study modulates the IL-10 and IL-6 concentrations in elderly people with T2DM and under metformin use, possibly as a result of physiological adaptations, with no effect on nondiabetic elderly. No effects on absolute levels of DNA methylation were observed.

© 2019 S. Karger AG, Basel

**Introduction**

Aging is responsible for dysfunctions in the elderly, such as decreased muscle strength and bone mass, and increased risk of frailty and chronic musculoskeletal pain [1, 2], which may result in the inability to perform daily living activities [3]. Dysfunctions resulting from aging also increase the risk for obesity and chronic diseases such as hypertension and type 2 diabetes mellitus (T2DM) [1, 4]. T2DM is presently the main metabolic disorder worldwide, resulting mostly from the deficiency of action of insulin, causing decreased uptake of glucose by the cells

KARGER

E-Mail karger@karger.com www.karger.com/nim

© 2019 S. Karger AG, Basel

5]. This disease affects approximately 415 million people and can reach up to 642 million in 2040, older adults being the most affected segment [6].

Evidence indicates that insulin resistance is associated with a nonspecific, low-grade activation of the immune system, promoting chronic subclinical inflammation, although the associated mechanisms are yet to be fully described [7, 8]. T2DM patients usually have differentiated levels of proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6 and of anti-inflammatory mediators such as IL-4 and IL-10, along with imbalance of other immune markers such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [9, 10]. In addition, other studies indicate that the development of T2DM is directly associated with epigenetic factors [11, 12], in the form of a differential pattern of DNA methylation [13, 14]. DNA methylation usually occurs by a covalent methyl addition on the carbon ring of DNA-incorporated cytosines (yielding 5-methylcytosine, or 5-mC), found almost exclusively in the context of paired symmetrical dinucleotide CpG [14]. Different reports support that methylation plays a key role in human metabolism regulation as well as in the T2DM onset [15, 16]. Studies performed by Nilsson et al. [17] and Ribel-Madsen et al. [18] revealed a differentiated pattern of general methylation when muscle and adipose tissues of T2DM patients and control subjects are compared. Changes in the expression of energy metabolism pivotal genes have been described, mostly associated with the lower pancreatic  $\beta$ -cell proliferation and lessened insulin secretion, promoting T2DM [19, 20].

On top of that, studies suggest that cytokines may be directly associated with changes in epigenetic factors [21, 22]. *In vitro* studies have shown that inflammatory mediators such as IL-6 promote epigenetic changes in cells via the regulation of the methyltransferase gene in human cancer cells (HCT116/K562), resulting in an enhancement of the DNA methylation profile of genes associated with immune statuses [21, 23]. This scenario calls for a close look into the interplay between epigenetics and inflammation to evaluate whether detrimental/vicious circles are likely to take place in such complex setting.

The clinical treatment of T2DM aims to control glycaemia, blood pressure, and lipemic levels as well as to prevent complications (mostly vascular and neurological) of the disease, being basically of two nonexcluding forms: behavioral/lifestyle and pharmacological interventions. The first approach involves the adoption of regular practice of physical exercise and dietary modifications [5, 24] to restore insulin sensitivity and energy balance. The latter involves the use of drugs aiming to reduce glycemic

levels such as the hypoglycemic metformin, which suppresses hepatic gluconeogenesis [25].

Some studies have addressed the possible DNA methylation effects of metformin use in clinical and experimental conditions [26, 27]. A body of evidence has now arisen [28, 29] showing that metformin promotes genome-wide alterations in the pattern of DNA methylation and in a variety of human cells (carcinogenic or not), possibly by mechanisms related to the accumulation of S-adenosylmethionine, the universal methyl donor for epigenetic modifications. Thus, literature shows metformin as an agent with potential to enhance the disruptive profile of methylation on the human DNA that already takes place with the inflammaging.

Although there is an understanding that diabetic patients submitted to different physical exercise protocols (cardiovascular or resistance, for example) and with different intensities (moderate to high) present an increase in insulin sensitivity and an effective reduction in blood pressure and anthropometric characteristics [30, 31], the debate on the physiological adaptations that are carried out in the organism to allow these benefits remains. In view of the above, the aim of the present study was to analyze the inflammatory profile and the pattern of DNA methylation of circulating biological samples from elderly patients with T2DM under metformin use who were submitted to a short-term neuromuscular exercise protocol, having assessed equivalent parameters from normal, euglycemic subjects assayed in parallel.

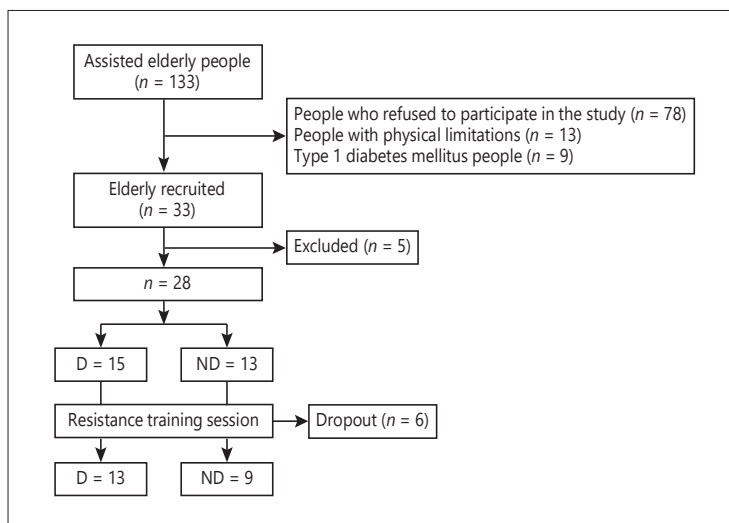
## Materials and Methods

### Study Design

The present study had a quasi-experimental cross-sectional design, in which the sample was submitted to experimental (resistance training) physical intervention implemented with T2DM patients using metformin and with control subjects.

### Sample

The present study was composed of 22 elderly men and women, with 13 patients diagnosed with and treated for T2DM for at least 1 year (D), controlled by hypoglycemic drugs (always including metformin), whereas the remaining 9 participants were nondiabetic, euglycemic patients (ND). All participants were sedentary until recruited to the study, and were followed regularly by the same primary care unit from the public health system of the Cedro de São João city (state of Sergipe, Brazil), where patients received all the medication for regular use. All volunteers signed the consent form for participation. The inclusion criteria consisted of: (a) being  $\geq 60$  years old, and (b) not having physical disabilities that would hinder locomotion. The following were excluded: (a) volunteers with decompensated T2DM at evaluation, or (b) treated with exogenous insulin (Fig. 1).



**Fig. 1.** A schematic drawing of the sample. D, diabetic; ND, nondiabetic.

#### Anthropometric Measures

As in Morais Junior et al. [32], the body mass (kg) and height (m) as well as the waist and hip circumferences (cm) were determined, with the body mass index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) and the waist-to-hip ratio duly determined in accordance with the recommendations of the World Health Organization [33].

#### Experimental Procedures

The protocol adopted by Morais Junior et al. [32] was reproduced herein. Briefly, on the first visit, an experimental session was held to explain the aims and the procedures of the study. Also, the intensity of the effort, the resting heart rate (RHR) and level of familiarization with the intervention were estimated, along with a first, pre-exercise blood draw. The intervention (resistance training circuit) was performed 72 h later together with the pre- and postexercise blood draw. The effort intensity (60–70%) was controlled by the reserve heart rate ( $\text{HR}_{\text{Res}}$ ; Polar Team II<sup>®</sup>, Polar, Kempelle, Switzerland) [34], with the maximum HR ( $\text{HR}_{\text{max}}$ ) estimated by the Karvonen equation ( $\text{HR}_{\text{max}} = 220 - \text{age}$ ) and the RHR as described elsewhere [32].

#### Circuit Training

The resistance training circuit encompassed fixed base exercises that alternated body parts, consisting of eight exercises lasting 40 min: 5 min of warm-up, 30 min from the circuit and 5 min of cooling down (recovery). The circuit had three sets (40 s of exercise with 20 s of interval) with 1 min between exercises [35]. Throughout the intervention, at least one trained professional was present at each station to ensure the volunteers' physical integrity and proper exercise execution. Heart rate was monitored throughout the experiment to assure compliance to the intensity zone stipulated. Hydration was stimulated at the end of each exercise round. The exercises adopted in the circuit as well as the warm-up and cooling down procedures were described by Morais Junior et al. [32].

#### Blood Collection Procedures

First, 5 mL of whole blood was collected in tubes containing EDTA and immediately distributed in aliquots of less than 1 mL per tube for DNA methylation assays. Another 5 mL of whole blood were drawn and immediately centrifuged at 2,500 rpm for 15 min at 25 °C to obtain serum for glycemic and inflammatory assessments. All samples were drawn by trained nursing professionals by venipuncture before the circuit as well as after the cooling down period, using the vacuum system, with all samples stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

#### Blood Glucose Control and Inflammatory Profile

Glycemia of each participant was determined by spectrometry using enzymatic reaction (glucose oxidase), the 240 LabMax equipment, and Labtest reagents. Before analysis, regular control procedure was carried out. The inflammatory profile of patients was determined with the serum samples previously stored, thawed on ice bath. Cytokine assessments were performed by flow cytometry (FACS Verse model; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), using the Human Th1/Th2 cytokine Kit (BD Biosciences), and yielded readings for six mediators: IL-2, 4, 6, and 10, IFN- $\gamma$ , and TNF. Reactions were performed following the manufacturer's protocol, with standard curves generated using the mediator provided in the kit. Scores were estimated by interpolation from the standard curve. All data were analyzed using FCAP software, version 3.0 (BD Biosciences).

#### DNA Extraction and Methylation

From blood aliquots, DNA extraction was performed using the Qiagen kit (QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Germany), following the manufacturer's guidelines. Quantification of the DNA samples was performed using a NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, San Francisco, CA, USA), the DNA samples were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for further analysis. From the previously extracted DNA, the proportion of methylated DNA in the samples was estimated by means of the commercial kit enzyme immunoassay MethylFlash<sup>®</sup> Methylated DNA Quantification Kit

**Table 1.** Baseline clinical and biochemical characteristics of diabetic and nondiabetic groups

	Nondiabetic		Diabetic		<i>p</i> <sup>a</sup>
	mean ± SD	95% CI	mean ± SD	95% CI	
Age, years	68.1±4.9	64.3–71.9	68.2±5.3	65.0–71.4	0.957
Body mass, kg	67.2±10.3	59.3–75.1	69.2±14.9	60.2–78.2	0.713
Height, m	1.5±0.1	1.5–1.6	1.6±0.1	1.5–1.6	0.761
BMI, kg/m <sup>2</sup>	28.2±4.3	24.9–31.5	28.5±5.9	25.0–32.1	0.888
WC, cm	93.8±6.5	88.8–98.7	99.8±10.4	93.5–106.1	0.141
W-H ratio	0.95±0.05	0.91–0.99	0.98±0.05	0.95–1.01	0.698
Glucose, mg/dL	100.1±25.1	80.8–119.4	200.2±104.0	137.4–263.1	0.011
RAMDNA, %	1.73±1.10	0.88–2.58	1.72±0.78	1.25–2.20	0.990

CI, confidence interval; BMI, body mass index; WC, waist circumference; W-H, waist-to-hip; RAMDNA, relative amount of methylated DNA. <sup>a</sup> Student's *t* test.

Colorimetric (Epigentek, New York, NY, USA), following the manufacturer's recommendations. Results express the percentage of methylated DNA (5-mC) in the total DNA sample extrapolated from a standard curve of OD values plotted from dilutions of a synthetic, positive DNA provided.

#### Statistical Analysis

First, the Shapiro-Wilk test was performed to observe data distribution. For the anthropometry, glycemic, and methylation measures, Student's independent *t* test was applied. For the inflammatory profile, logarithmic adjustment and analysis by the Mann-Whitney test were performed for comparisons between groups, and the Wilcoxon test for measurement comparisons. Data with normalized distribution were expressed as mean, standard deviation, and confidence interval, and nonnormalized data by median and quartiles. All analyses were performed by SPSS<sup>®</sup> software version 22. Figures were constructed by GraphPad<sup>®</sup> Prism software, version 5, with *p* ≤ 0.05 for all analyses.

## Results

The baseline clinical and biochemical characteristics of the D and ND samples are described in Table 1. As expected, there was a significant difference between groups in terms of glycaemia values, whereas DNA methylation scores and other characteristics did not differ at study onset. It is worth noticing that presence of hypertension was statistically similar between D (92.3%, *n* = 12) and ND (77.8%, *n* = 7), losartan being the drug used in all cases. Regarding the use of oral hypoglycemic, 69.2% (*n* = 9) used metformin alone, while the others (30.8%; *n* = 4) used metformin and glibenclamide simultaneously.

Figure 2 presents the median levels of six inflammatory cytokines before and after intervention. Only IL-10 showed a significant difference across groups at baseline,

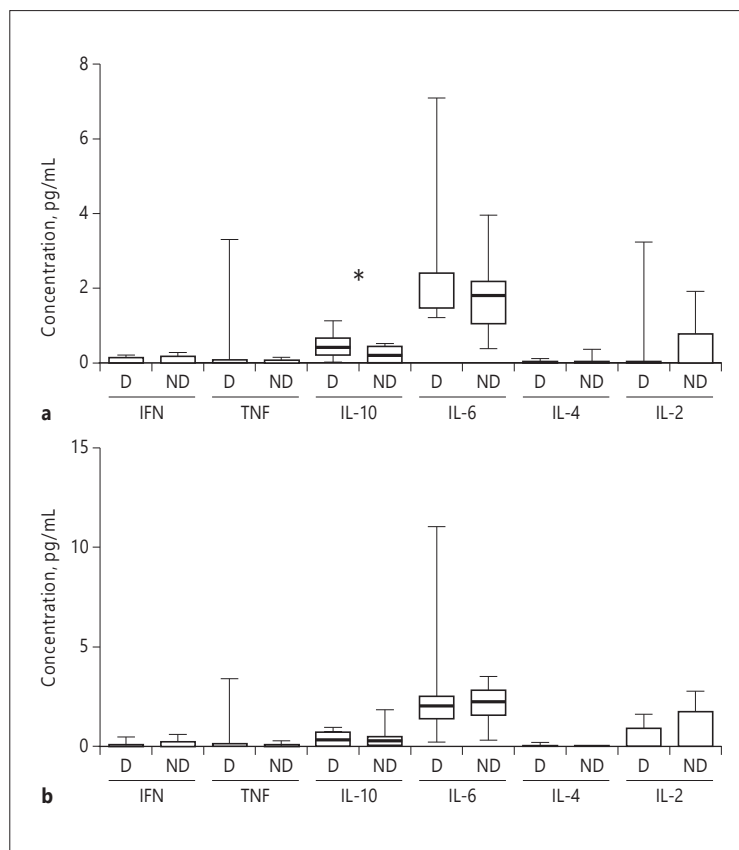
with increased concentration in group D compared to ND. Postintervention comparisons showed that the difference noticed on baseline vanished, and differences in no other cytokine levels appeared.

Regarding comparisons of absolute concentration of cytokines between pre- and postintervention time points (Fig. 3), analyses revealed no differences (*p* > 0.05). However, data normalization (log transformation) revealed that group D exhibited a postintervention increase in circulating IL-6 (*p* = 0.035). In the ND group, no difference between time points was observed for any of the inflammatory cytokines.

## Discussion/Conclusion

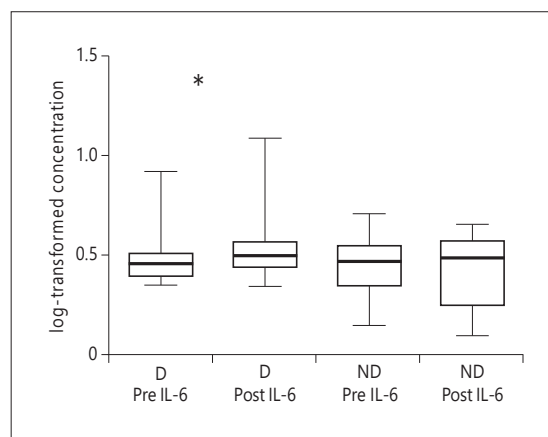
Studies show that diabetics tend to present a pronounced proinflammatory milieu [36, 37] as well as a differentiated pattern of DNA methylation [15, 17] when compared to normal euglycemic subjects. However, few studies have investigated the acute effect of exercise on the inflammatory and epigenetic statuses of diabetic subjects who undergo metformin use. Thus, the present study analyzed the effect of acute resistance training on the inflammatory profile and on DNA methylation in elderly patients with T2DM using this exact principle. The main results consisted of a significant difference between groups for baseline circulating IL-10, with a higher concentration in group D compared to group ND. It was also observed that physical exercise allows concentrations in group D to match the readings among ND individuals. An increase in IL-6 concentration with intervention was also observed in group D. No effect was observed in total DNA methylation.

**Fig. 2.** Between-group comparison of absolute cytokine readings recorded before (a) and after (b) intervention. \*  $p = 0.019$ . D, diabetic; ND, nondiabetic. Central measure is expressed as median and the bars represent minimum and maximum values (amplitude) of the data distribution.



Cytokines are important mediators of the inflammation related to T2DM [8]. IL-10 is a mediator with important anti-inflammatory properties, directly associated with diabetes and obesity [8, 10]. Borowska et al. [38] demonstrated that treatment with metformin is associated with increased plasma concentrations of IL-10, thus attenuating the proinflammatory milieu. In our study, an agreeing inequity in IL-10 was found between groups at baseline, probably related to this metformin-triggered IL-10 production. However, the acute effects of resistance training do not seem to enhance (being actually the suppressant of) the phenomena at stake. Possibly, this absence of effect is associated with exercise intensity and duration, since studies that observed increased IL-10 after the acute exercise were performed in runners after completing a marathon (mean time: 3 h and 26 min) [39, 40].

IL-6 is known to increase in metabolic conditions prone to triggering a proinflammatory milieu such as obesity and T2DM [8]. However, the action of IL-6 ap-



**Fig. 3.** Comparison of log-transformed IL-6 values. \*  $p = 0.035$  vs. preintervention time point for the same group. D, diabetic; ND, nondiabetic. Central measure is expressed as median of values, with bars representing minimum and maximum values (amplitude) of the data distribution.



pears to depend on the tissue of release [41–43]. In our conditions, the observed IL-6 increase seems to be in line with scientific evidence in favor of an anti-inflammatory effect when IL-6 is produced by the muscle (as myocin) [43, 44]. Under these conditions, postexercise IL-6 release would be the result of a specific physiological mechanism to aid muscle regeneration, energy expenditure regulation, and muscle hypertrophy [45, 46], apart from having a general anti-inflammatory effect when unaccompanied by TNF and other mediators. Therefore, it is possible that the significant increase in IL-6 following exercise may have derived from the skeletal muscle as a general physiological (humoral) adaptation. In favor of that assumption, findings show that IL-6 expressed alone (as in physical exercise) may present an anti-inflammatory property [46], overtaking a role primarily assumed by IL-10 when in a context of sedentary behavior. Together, these findings allow us to suggest that resistance training produces an acute adaptation on inflammatory markers of diabetic older adults (using metformin), with the same behavior absent from euglycemic counterparts.

There is evidence that methylation (possibly triggered by inflammation) exerts an effect on the onset and evolution of T2DM [47, 48], and that metformin itself produces extensive, genome-wide modifications on the pattern of DNA methylation. Nonetheless, our findings do not support a correlation between levels of inflammatory mediators and methylation (analyses not shown) or suggest that resistance training was not able to produce acute responses in DNA methylation in either D or ND subjects. However, Nitert et al. [49] found that exercise performed constantly (6 months) under moderate intensity may alter the methylation level of genes as adiponectin receptor-1, bradykinin receptor B2, and tribbles homolog-1, having observed that 134 genes in total were altered (115 with decreased and 19 with increased methylation). There is little controversy that epigenetic changes can be produced by exercise [50]. Therefore, it is necessary to carry out further research to allow an understanding of the extent of the effects from exercise on the methylation status of DNA (global and/or sequence-specific) [51], especially in an aging context where polypharmacy is a common practice [52] and the influence of drugs (as metformin, to name one) on exercise-induced phenotypes cannot be ruled out.

Our study has some limitations. First, we did not perform a power calculation before starting the study, and the small sample size could be considered a shortcoming. Second, a short-term intervention may fail unveiling ef-

fects only observable in the long run. Studies such as ours should indeed be reproduced with larger sample sizes as well as for different periods of intervention to yield support (or not) to the findings described herein. It would also be desirable to monitor groups with no exercise to control analyses for variations in the studied markers resulting from factors unrelated to the intended intervention.

Our study provides preliminary evidence that a resistance training protocol can be effective in moderating IL-10 serum levels while increasing IL-6 titers in parallel among elderly patients with T2DM using metformin, with no such effects observed in nondiabetic older adults. No effects of the intervention on the scores of DNA methylation were observed, independent of the group.

### Acknowledgments

The research was supported by grants # 445692/2014 and 442925/2014 from CNPq as well as grants #193.000.967-2015 and 193.001.240-2016 from FAPDF, with a stipend to G.S. Morais Junior (CAPES) and a fellowship for productivity in research to O.T. Nóbrega (CNPq).

### Statement of Ethics

The study followed the recommendations of the Helsinki Declaration and was approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Sergipe, under accession number 0213.0.107.000-11.

### Disclosure Statement

There are no conflicts of interest.

### Author Contributions

G.S.M.J. and V.C.S. assessed the DNA methylation profile; W.M-S., A.D.H., and G.G.A. assessed the immune mediators; R.J.S.S and C.J.B. designed and supervised the execution of the physical interventions; R.M.L. and D.I.V.P. advised on the interventions performed; C.J.B. and O.T.N. designed and coordinated the study as well as analyzed results; G.S.M.J. and C.J.B. assessed anthropometry in subjects; G.S.M.J. and O.T.N. prepared the original manuscript.



## References

- 1 Scott D, Seibel M, Cumming R, Naganathan V, Blyth F, Le Couteur DG, et al. Sarcopenic Obesity and Its Temporal Associations With Changes in Bone Mineral Density, Incident Falls, and Fractures in Older Men: The Concord Health and Ageing in Men Project. *J Bone Miner Res*. 2017 Mar;32(3):575–83.
- 2 Megale RZ, Ferreira ML, Ferreira PH, Naganathan V, Cumming R, Hirani V, et al. Association between pain and the frailty phenotype in older men: longitudinal results from the Concord Health and Ageing in Men Project (CHAMP). *Age Ageing*. 2018 May;47(3):381–7.
- 3 Ryan DJ, Stebbings GK, Onambele GL. The emergence of sedentary behaviour physiology and its effects on the cardiometabolic profile in young and older adults. *Age (Dordr)*. 2015 Oct;37(5):89.
- 4 Nascimento CM, Mambrini JV, de Oliveira CM, Giacomini KC, Peixoto SV. Diabetes, hypertension and mobility among Brazilian older adults: findings from the Brazilian National Household Sample Survey (1998, 2003 and 2008). *BMC Public Health*. 2015 Jun;15(1):591.
- 5 American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33 Suppl 1:S62–9.
- 6 Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Feb;14(2):88–98.
- 7 Aumueller E, Remely M, Baeck H, Hippe B, Brath H, Haslberger AG. Interleukin-6 CpG Methylation and Body Weight Correlate Differently in Type 2 Diabetes Patients Compared to Obese and Lean Controls. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2015;8(1):26–35.
- 8 Rodrigues KF, Pietrani NT, Bosco AA, Campos FM, Sandrim VC, Gomes KB. IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels/polymorphisms and their association with type 2 diabetes mellitus and obesity in Brazilian individuals. *Arch Endocrinol Metab*. 2017 Sep-Oct;61(5):438–46.
- 9 Boraska V, Rayner NW, Groves CJ, Frayling TM, Diakite M, Rockett KA, et al. Large-scale association analysis of TNF/LTA gene region polymorphisms in type 2 diabetes. *BMC Med Genet*. 2010 May;11(1):69.
- 10 Erdogan M, Cetinkalp S, Ozgen AG, Saygili F, Berdeli A, Yilmaz C. Interleukin-10 (-1082G/A) gene polymorphism in patients with type 2 diabetes with and without nephropathy. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012 Feb;16(2):91–4.
- 11 Curti ML, Pires MM, Barros CR, Siqueira-Catania A, Rogero MM, Ferreira SR. Associations of the TNF-alpha -308G/A, IL6 -174 G/C and AdipoQ 45 T/G polymorphisms with inflammatory and metabolic responses to lifestyle intervention in Brazilians at high cardiometabolic risk. *Diabetol Metab Syndr*. 2012 Nov;4(1):49.
- 12 Tang L, Ye H, Hong Q, Wang L, Wang Q, Wang H, et al. Elevated CpG island methylation of GCK gene predicts the risk of type 2 diabetes in Chinese males. *Gene*. 2014 Sep;547(2):329–33.
- 13 McKay JA, Mathers JC. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011 Jun;202(2):103–18.
- 14 Jeon JP, Koh IU, Choi NH, Kim BJ, Han BG, Lee S. Differential DNA methylation of MSI2 and its correlation with diabetic traits. *PLoS One*. 2017 May;12(5):e0177406.
- 15 Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, et al. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol*. 2012 Jul;26(7):1203–12.
- 16 Petersen AK, Zeilinger S, Kastenmüller G, Römisch-Margl W, Brügger M, Peters A, et al. Epigenetics meets metabolomics: an epigenome-wide association study with blood serum metabolic traits. *Hum Mol Genet*. 2014 Jan;23(2):534–45.
- 17 Nilsson E, Jansson PA, Perfiljev A, Volkov P, Pedersen M, Svensson MK, et al. Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2014 Sep;63(9):2962–76.
- 18 Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, Bork-Jensen J, Lara E, Calvanese V, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation differences in muscle and fat from monozygotic twins discordant for type 2 diabetes. *PLoS One*. 2012;7(12):e51302.
- 19 Dayeh T, Volkov P, Saló S, Hall E, Nilsson E, Olsson AH, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS Genet*. 2014 Mar;10(3):e1004160.
- 20 Shinozaki G, Braun PR, Hing BW, Ratanatharathorn A, Klisares MJ, Duncan GN, et al. Epigenetics of Delirium and Aging: Potential Role of DNA Methylation Change on Cytokine Genes in Glia and Blood Along With Aging. *Front Aging Neurosci*. 2018 Oct;10:311.
- 21 Foran E, Garrity-Park MM, Mureau C, Newell J, Smyrk TC, Limburg PJ, et al. Upregulation of DNA methyltransferase-mediated gene silencing, anchorage-independent growth, and migration of colon cancer cells by interleukin-6. *Mol Cancer Res*. 2010 Apr;8(4):471–81.
- 22 Horsburgh S, Robson-Ansley P, Adams R, Smith C. Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation. *Exerc Immunol Rev*. 2015;21:26–41.
- 23 Hodge DR, Xiao W, Clausen PA, Heidecker G, Szyf M, Farrar WL. Interleukin-6 regulation of the human DNA methyltransferase (HDNMT) gene in human erythroleukemia cells. *J Biol Chem*. 2001 Oct;276(43):39508–11.
- 24 Balducci S, Sacchetti M, Haxhi J, Orlando G, D'Errico V, Fallucca S, et al. Physical exercise as therapy for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014 Mar;30(S1 Suppl 1):13–23.
- 25 Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000 Dec;49(12):2063–9.
- 26 Bridgeman SC, Ellison GC, Melton PE, News-holme P, Mamotte CD. Epigenetic effects of metformin: from molecular mechanisms to clinical implications. *Diabetes Obes Metab*. 2018 Jul;20(7):1553–62.
- 27 Elbere I, Silamikelis I, Ustinova M, Kalnina I, Zaharenko L, Peculis R, et al. Significantly altered peripheral blood cell DNA methylation profile as a result of immediate effect of metformin use in healthy individuals. *Clin Epigenetics*. 2018 Dec;10(1):156.
- 28 Cuyàs E, Fernández-Arroyo S, Verdura S, García RA, Stursa J, Werner L, et al. Metformin regulates global DNA methylation via mitochondrial one-carbon metabolism. *Oncogene*. 2018 Feb;37(7):963–70.
- 29 Zhong T, Men Y, Lu L, Geng T, Zhou J, Mitsuhashi A, et al. Metformin alters DNA methylation genome-wide via the H19/SAHH axis. *Oncogene*. 2017 Apr;36(17):2345–54.
- 30 Lee JH, Lee R, Hwang MH, Hamilton MT, Park Y. The effects of exercise on vascular endothelial function in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2018 Mar;10(1):15.
- 31 Tan S, Du P, Zhao W, Pang J, Wang J. Exercise Training at Maximal Fat Oxidation Intensity for Older Women with Type 2 Diabetes. *Int J Sports Med*. 2018 May;39(5):374–81.
- 32 Morais Junior GS, Souza VC, Machado-Silva W, Henriques AD, Melo Alves A, Barbosa Morais D, et al. Acute strength training promotes responses in whole blood circulating levels of miR-146a among older adults with type 2 diabetes mellitus. *Clin Interv Aging*. 2017 Sep;12:1443–50.
- 33 World Health Organization. [Physical status: the use and interpretation of anthropometry](#). Geneva: World Health Organization; 1995. p. 1–452.
- 34 World Health Organization. [Global recommendations on physical activity for health](#). Geneva: World Health Organization; 2010. p. 60.
- 35 Romero-Arenas S, Martínez-Pascual M, Alcaraz PE. Impact of resistance circuit training on neuromuscular, cardiorespiratory and body composition adaptations in the elderly. *Aging Dis*. 2013 Oct;4(5):256–63.

- 1 Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE. Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes*. 2004 Mar;53(3):693–700.
- 2 Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec;444(7121):860–7.
- 3 Borowska M, Dworacka M, Wesolowska A, Winiarska H, Krzyżagórska E, Dworacki G. The Impact of Pharmacotherapy of Type 2 Diabetes Mellitus on IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 Secretion. *Pharmacology*. 2016;97(3-4):189–94.
- 4 Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol*. 1999 Feb;515(Pt 1):287–91.
- 5 Ostrowski K, Schjerling P, Pedersen BK. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans – effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2000 Dec;83(6):512–5.
- 6 Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2005 Apr;98(4):1154–62.
- 7 Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc*. 2004 May; 63(2):263–7.
- 8 Broholm C, Laye MJ, Brandt C, Vadalasetty R, Pilegaard H, Pedersen BK, et al. LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation. *J Appl Physiol* (1985). 2011 Jul;111(1):251–9.
- 9 Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Apr;8(8):457–65.
- 10 Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*. 2008 Oct;88(4):1379–406.
- 11 Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J*. 2013 Sep;280(17):4131–48.
- 12 Intine RV, Sarras MP Jr. Metabolic memory and chronic diabetes complications: potential role for epigenetic mechanisms. *Curr Diab Rep*. 2012 Oct;12(5):551–9.
- 13 Yu Y, Mingjiao W, Yang X, Sui M, Zhang T, Liang J, et al. Association between DNA methylation of SORL1 5'-flanking region and mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016 Dec; 77(6):625–32.
- 14 Nitert MD, Dayeh T, Volkov P, Elgzyri T, Hall E, Nilsson E, et al. Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012 Dec;61(12): 3322–32.
- 15 Rönn T, Ling C. Effect of exercise on DNA methylation and metabolism in human adipose tissue and skeletal muscle. *Epigenomics*. 2013 Dec;5(6):603–5.
- 16 Rönn T, Ling C. DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against Type 2 diabetes. *Epigenomics*. 2015; 7(3):451–60.
- 17 Bortolon PC, de Medeiros EF, Naves JO, Karnikowski MG, Nóbrega OT. [Analysis of the self-medication pattern among Brazilian elderly women]. *Cien Saude Colet*. 2008 Jul-Aug;13(4):1219–26.

© **Free Author Copy - for personal use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required.

Please contact [permission@karger.com](mailto:permission@karger.com)