

EFEITOS DO ESTRESSE E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A METILAÇÃO GLOBAL DO DNA E A EXPRESSÃO DOS GENE *Dnmt3a* e *Dnmt3b* EM CÉLULAS DO PULMÃO DE RATOS

Wyllian Rafael Beasi da Silva (Bolsista FUNADESP/UNOPAR), e-mail: wrbeasi@hotmail.com. Leandro Vaz Toffoli (Colaborador), e-mail: lvtoffoli.biomed@gmail.com. Marcus Vinicius de Matos Gomes (Orientador), mvmgomes@gmail.com.

Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) | Centro de Pesquisa em Ciências da Saúde | Mestrado em Ciências da Reabilitação

Área: Ciências Biológicas – Subárea: Genética

Introdução

Um número crescente de evidências tem indicado a participação de alterações epigenéticas entre as respostas celulares adaptativas tornando os mecanismos epigenéticos importantes candidatos na relação entre o estresse e a origem de doenças, como o câncer de pulmão. No mesmo sentido, enquanto inúmeros benefícios têm sido atribuídos à prática de exercício físico pouco ainda se sabe a respeito dos mecanismos moleculares associados.

Estudos epidemiológicos prévios indicaram uma relação significativa entre o estresse crônico e a origem, progressão e mortalidade de câncer (STOMMEL *et al.*, 2002; CHIDA *et al.*, 2008). Dados obtidos por meta análise envolvendo 165 estudos longitudinais correlacionaram a influência de fatores psicossociais com a incidência e diminuição na sobrevivência de pacientes com câncer (CHIDA *et al.*, 2008). Além disso, a análise destes dados permite a observação de que o câncer de pulmão é o tipo de câncer no qual a associação com o estresse está estabelecida de forma mais significativa (CHIDA *et al.*, 2008), o que torna este o principal modelo para análises subsequentes.

No tocante à prática de exercício físico, é indiscutível que esta proporcione benefícios à saúde de uma forma geral (KALIMAN *et al.*, 2011). No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares que associam essa prática à melhora nas condições biológicas.

Muito tem sido discutido nas últimas décadas sobre a influência ambiental sobre o controle da manifestação da informação genética. Em virtude da quantidade ainda limitada de informações nessa área emerge a necessidade de estudos em modelos experimentais em ambientes controlados focados na compreensão, a nível molecular, do quanto e como o estresse e o exercício físico podem influenciar as atividades biológicas normais de controle da expressão gênica em células do pulmão.

Neste contexto o presente estudo objetivou avaliar o efeito do estresse e da prática de exercício físico sobre a metilação do DNA em células do pulmão de ratos, bem como correlacionar com a expressão do gene *Dnmt3a* e *Dnmt3b*.

Material e Métodos

Animais

Ratos machos *Wistar* foram classificados em quatro grupos, contendo 5 animais cada: 1) grupo de estresse (ST): animais que foram submetidos ao protocolo de estresse crônico por restrição do 67 DNP ao 80 DNP; 2) o grupo de exercício físico (EX): animais que foram submetidos ao exercício físico (natação por 60 minutos/dia) do 53 dia pós-natal (DPN) ao 79 DPN; 3) grupo controle (CTL): animais que não foram submetidos a nenhuma intervenção.

Para as análises dos efeitos do estresse comportamental sobre os padrões epigenéticos foi utilizado o ensaio validado de estresse crônico por restrição conforme descrito anteriormente (BABENKO *et al.*, 2012). Os animais do grupo EX foram submetidos ao treinamento físico (natação), de acordo com Martins-Pinge *et al.* (2005). Os animais foram mortos por decapitação e o lóbulo inferior direito do pulmão foi retirado. Todas as amostras foram lavadas em solução salina imediatamente após a sua obtenção e congeladas a -80 °C para posteriores análise moleculares.

Análise da Metilação do DNA e da expressão gênica

O DNA genômico de células do pulmão foi obtido por protocolo de salting out e o perfil de metilação global de DNA foi avaliado pela dosagem de 5-metil-citosina pelo kit *Imprint® Methylated DNA Quantification kit* (Sigma-Aldrich®), de acordo com as recomendações do fabricante e já previamente descritas (TOFFOLI *et al.*, 2014).

As amostras de RNA foram obtidas utilizando Trizol (Invitrogen®) e a transcrição reversa foi realizada utilizando *High Capacity Kit* (Applied Biosystems®). Os níveis de expressão do gene, *Dnmt3a* e *Dnmt3b* foram avaliados a partir de equipamento de PCR em Tempo Real, *Step One Plus* (Applied Biosystems) e o sistema de detecção Taqman (Applied Biosystems).

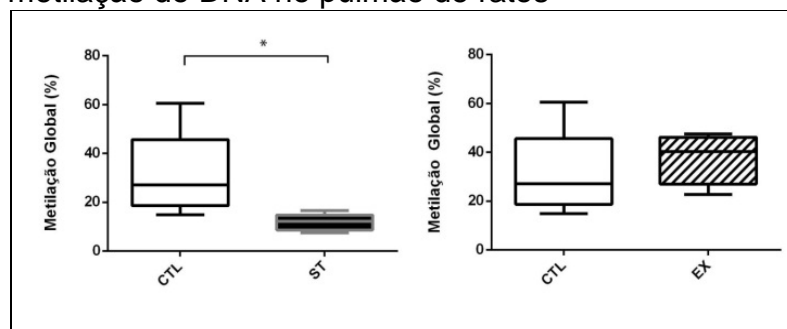
Análise estatística

Foi utilizado o software *GraphPrim* 5.0 para a análise estatística dos dados. Foram utilizado os testes não paramétricos de *Mann-Whitney* para comparar o perfil de metilação global de DNA e análise quantitativa da expressão dos genes, *Dnmt3a* e *Dnmt3b*. Foi adotado o intervalo de confiança de 95% e o nível de significância de 5% ($p < 0.05$) em todos os testes utilizados.

Resultados e Discussão

As análises comparativas das porcentagens do perfil de metilação global do DNA revelaram uma diminuição estatisticamente significativo no pulmão ($p=0.0159$) nos animais submetidos ao estresse crônico (ST) quando comparado com os animais controle. Não foi observada diferença estatisticamente significativa no perfil de metilação global do DNA nos animais praticantes de exercício físico (EX) quando comparado com os animais do grupo controle ($p=0.3095$) (Figura 1)

Figura 1 – Efeito do estresse e exercício físico sobre a metilação do DNA no pulmão de ratos

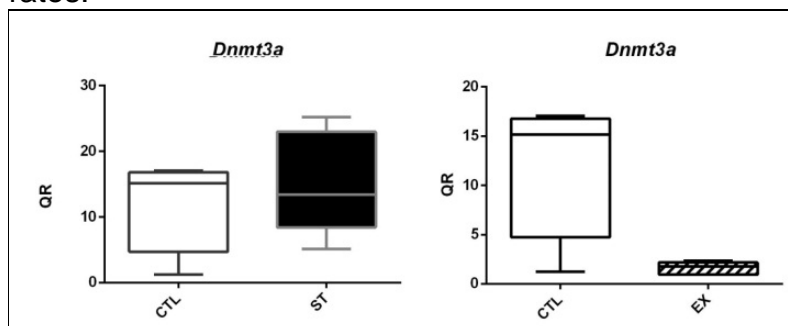


CTL= grupo controle; ST=grupo estresse; EX=grupo exercício físic.
* $p < 0.05$. Teste de Mann-Whitney. A barra de erro representa o Erro Padrão da Média.

Fonte: Os autores.

No que diz respeito aos efeitos do estresse e da prática de exercício físico sobre a expressão do gene *Dnmt3a*, não foi evidenciada diferença estatisticamente significativo quando comparada quantitativamente a expressão do gene *Dnmt3a* dos animais submetidos ao protocolo de estresse (ST) ($p = 0.6667$) ou exercício físico (EX) ($p = 0.0556$) com os animais do grupo controle (Figura 2).

Figura 2 – Efeito do Estresse e Exercício Físico sobre a expressão do gene *Dnmt3a* em células do pulmão de ratos.



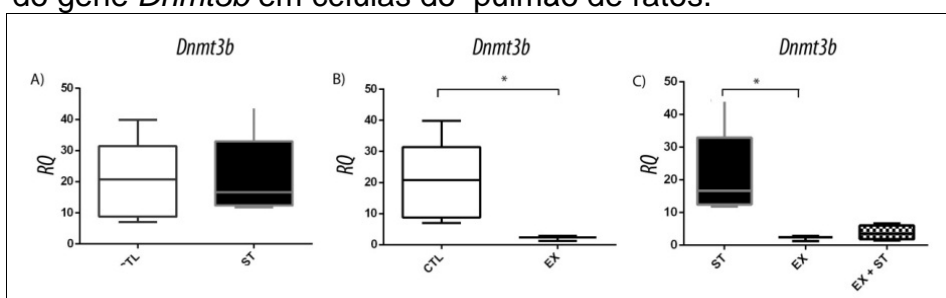
CTL: grupo controle; ST: grupo estresse; EX: grupo exercício físico
* $p < 0.05$. Teste de Mann-Whitney. A barra de erro representa o Erro Padrão da Média.

Fonte: Os autores.

Quando interrogados os efeitos do estresse e da prática de exercício físico sobre a expressão do gene *Dnmt3b* não foi observada diferença estatística entre os grupos ST e CTL ($p = 0.8016$).

No entanto, uma diminuição estatisticamente significativa foi observada quando comparada a expressão do gene *Dnmt3b* entre os grupos EX e CTL ($p = 0.0357$). Além disso, diminuição estatisticamente significativa na expressão do gene *Dnmt3b* foi observada quando comparados EX e ST ($p = 0.0018$). (Figura 3).

Figura 3 – Efeito do Estresse e Exercício Físico sobre a expressão do gene *Dnmt3b* em células do pulmão de ratos.



CTL: grupo controle; ST: grupo estresse; EX: grupo exercício físico. * $p < 0.05$.
Teste de Mann-Whitney. A barra de erro representa o Erro Padrão da Média.

Fonte: Os autores.

O presente estudo consiste no primeiro relato da literatura a demonstrar o efeito do estresse sobre as células pulmonares, em termos epigenéticos. Assim como ocorre em células encefálicas (Rodrigues et al 2015; Kashimoto et al 2015), nossos resultados corroboram quanto ao efeito do estresse ser uma hipometilação global do DNA também em células pulmonares, alteração característica encontrada em células tumorais (SHEN *et al.*, 2007; ESTELLER *et al.*, 2008).

Embora a prática de exercício físico seja reconhecidamente benéfica ao sistema cardiopulmonar, pouco esclarecedores são as evidências do mecanismo molecular por trás destes benefícios. Nossos resultados demonstraram que não há diferença estatisticamente significativa na metilação global do DNA ou na expressão gênica do gene *Dnmt3a* quando comparados os animais que praticaram exercício físico e os animais do grupo controle ($p > 0.05$).

No que diz respeito aos efeitos do estresse e exercício físico sobre a expressão de genes de DNA metiltransferase (*Dnmt3a* e *Dnmt3b*) em células de pulmão de rato nossos dados mostram que: 1) o estresse induz um aumento da expressão do gene *Dnmt1* ($p = 0,0159$), que é abolida quando combinado com exercício físico ao estresse; 2) o exercício físico induz efeito antagonista sobre a expressão do gene *Dnmt3a* em comparação com o efeito causado pelo estresse e; 3) a atividade física, por si só, induz uma diminuição da expressão do gene *Dnmt3b*, que é antagonista para o efeito induzido pelo estresse na expressão deste gene.

Em relação à expressão de genes DNMTs, nossos resultados demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa na metilação global do DNA e na expressão do gene *Dnmt3a* nos animais que praticavam exercício físico em comparação ao grupo controle ($p > 0,05$). No entanto, os nossos dados mostram uma diminuição significativa na expressão do gene *Dnmt3b* ($p = 0,0357$) em comparação exercício físico e grupo controle. Ainda considerando a evidência deste estudo, notamos que, na prática, os efeitos do exercício físico em animais submetidos ao protocolo de estresse na expressão de genes *Dnmt3a* e *Dnmt3b* são ligeiramente modificadas. Este efeito modulador pode ser bem observado quando se comparam animais submetidos ao estresse (ST) e animais submetidos ao estresse e exercício (EX-ST).

Conclusão

Com base em nossos dados concluímos que o estresse comportamental crônico induz uma diminuição no perfil de metilação global do DNA em células do pulmão de

ratos. Além disso, nossas evidências sugerem que a prática de exercício físico pode potencialmente modular as respostas induzidas pelo estresse em células do pulmão de ratos no que diz respeito a variações na metilação global do DNA e na expressão dos genes Dnmt3a e Dnmt3b.

Referências

CHIDA, Y. *et al.* Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, v.5, p.466-475, 2008.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, v.358, p. 1148-1159, 2008.

KASHIMOTO, R.K. *et al.* Physical exercise affects the epigenetic programming of rat brain and modulates the adaptive response evoked by repeated restraint stress. *Behav. Brain. Res.*, v 1, p.296-289, 2016.

MARTINS-PINGE, M.C. *et al.* Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. *Auton. Neurosc.*, v.122, p.21-28, 2005

RODRIGUES G.M. *et al.* Acute stress affects the global DNA methylation profile in rat brain: modulation by physical exercise. *Behav. Brain. Res.*, v.15, n.279, p.123-128, 2015.

SHEN, L. *et al.* Genome-Wide Profiling of DNA Methylation Reveals a Class of Normally Methylated CpG Island Promoters. *Plos Genetics*, v.3, p.2023-2036, 2007.

STOMMEL, M. *et al.* Depression and functional status as predictors of death among cancer patients. *Cancer*, v.94, p.2719-2727, 2002.

TOFFOLI, L.V. *et al.* Maternal exposure to fluoxetine during gestation and lactation affects the DNA methylation programming of rat's offspring: modulation by folic acid supplementation. *Behav. Brain. Res.*, v.265, p.142-147, 2014.