



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Louisiana Carolina Ferreira de Meireles

TESE DE DOUTORADO:

**MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS HIPOCAMPAIS EM HISTONAS INDUZIDAS PELO
ENVELHECIMENTO E POR DIFERENTES MODALIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO:
IMPACTO SOBRE A MEMÓRIA AVERSIVA**

Porto Alegre, 2018

Louisiana Carolina Ferreira de Meireles

**MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS HIPOCAMPAIS EM HISTONAS INDUZIDAS PELO
ENVELHECIMENTO E POR DIFERENTES MODALIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO:
IMPACTO SOBRE A MEMÓRIA AVERSIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de doutora em Fisiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Ionara Rodrigues de Siqueira

Porto Alegre, 2018

Agradecimentos

Dedico essa tese à minha mãe **Maria do Carmo**, que além de ter sido minha primeira professora, sempre foi meu maior amor, modelo profissional e humano. Agradeço aos meus pais **Aluizio e Jairo Policarpo** (*in memorian*) pela vida e pelo exemplo de trabalho, e aos meus irmãos **Poliana, Pedro, Ivanna, Fábio e André** e minha quase irmã **Aline** pela fortaleza e alegria que são em minha vida.

No mestrado conheci a **Prof. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira**, uma grande cientista que me instigou sempre a ser o meu melhor. Ela fez isso como uma incansável mãe científica me puxando as orelhas, delegando missões impossíveis, dando prazos apertados e me lançando questões difíceis. Hoje olho para trás certa que errei muitas vezes, não era impossível, o prazo estava ótimo e aquela dúvida era de fato simplíssima. Muito obrigada por acreditar em mim, por me ensinar tanto, me estender a mão nos momentos difíceis e estar do meu lado sempre.

Gratidão infinita aos meus colegas do laboratório de Neuropsicofarmacologia: **Carla, Roberta, Fernando, Karine, Gisele Lovatel, Wagner, Arthiese, Gisele Andrade, Cristiano, Felipe, Laura, Sílvia, Natália, Viviane, Bruna, Júlia, Bruno, Agnis, Pietro e Zingara**. Obrigada pela prestatividade, discussões, parceria nos experimentos e essa bonita amizade que levarei para vida.

Durante o doutorado tive a grande honra de fazer parte dos meus experimentos em Nova Iorque, no laboratório do **Prof. Dr. Eric J. Nestler**, um homem brilhante de grande generosidade. Este, me apresentou a **Dra. Deena Walker** com quem aprendi muito sobre neurociência, empoderamento e humildade. Agradeço aqui a CAPES pela bolsa PDSE que permitiu meu período no Hospital Mount Sinai (EUA).

Nesses anos longe de casa tive grandes companheiros de jornada que me ajudaram a concluir meu doutorado com sucesso: **Zé Augusto, Rafael, Priscila, Diego, Ialê** (*in memorian*), **Fernanda,**

Melina, Mariana e Luísa. Vocês me são fonte infinita de orgulho e admiração e tenho certeza que as próximas gerações de historiadores estão muito bem servidas de professores.

Obrigada aqueles que sempre cuidaram de mim e torceram pelo meu sucesso, meus grandes amigos: **Paulo, Ale, Marcel, André, Vicente, Robson** (*in memoriam*), **Niala, Doug, Iorrane, Edmário, Meirylane, Carla, Jesus, Natália, Dani, Wiviane, Nerenda, Ana, Beno, Isabela, Sandrinha, Michele, Denise e Osman.**

Agradeço muito ao **Dr. Marcel Moura**, um excepcional cientista e meu melhor amigo há mais de 20 anos, que durante esse período sempre esteve a postos para me socorrer com um artigo indisponível no portal CAPES, um ouvido atento e uma piada em boa hora.

Obrigada ao meu companheiro **Érico Moraes** pelo colo acolhedor onde descanso, pelo amor que me alimenta e pelas palavras de ânimo que me mantém forte e focada no que realmente importa.

Agradeço a diretora **Irmã Maria José** do Colégio Sagrado Coração de Caruaru pela bolsa de estudos concedida durante o ensino fundamental e médio, bem como a todos os professores dessa instituição que tenho tanto carinho. Agradeço também as minhas queridas professoras do curso de fisioterapia da Faculdade ASCES **Lícia, Belisa, Adriana e Daniela** que sempre me incentivaram e plantaram em mim há 10 anos atrás o desejo pela excelência acadêmica e amor pela minha profissão.

Finalmente agradeço ao **Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da UFRGS** pela oportunidade de realizar meu doutorado e ao contribuinte brasileiro que via **CNPq** pagou meus estudos nos últimos anos, espero contribuir com esse trabalho para o desenvolvimento científico e educacional do meu país.

*"O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, é a
ilusão do conhecimento."*

Steven Hawking (1942-2018)

Resumo

O objetivo dessa tese foi estudar o impacto de diferentes modalidades de exercício físico sobre a memória aversiva e marcas epigenéticas em histonas globais e em região promotora de genes de interesse no hipocampo de ratos *Wistar* durante o processo de envelhecimento. Para isso, foram realizados dois experimentos.

No primeiro, investigamos o efeito de um protocolo de exercício aeróbico 20 minutos, diariamente durante 2 semanas, sobre a memória aversiva e níveis de acetilação da H3K9, H4K12 e H4K5 em hipocampo de ratos *Wistar* adultos jovens e envelhecidos. Este protocolo de exercício, melhorou a memória aversiva e aumentou os níveis de acetilação da H4K12 em ambas as idades testadas. O exercício também foi capaz de aumentar os níveis de acetilação da H3K9 em ratos envelhecidos. Além disso, foi observado um declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento sem qualquer efeito no estado de acetilação de histonas.

No segundo experimento, ratos adultos jovens e envelhecidos foram submetidos a 12 semanas de treinamento físico nas modalidades aeróbica, força, acrobática ou combinada. Nesses animais foi investigado o efeito do envelhecimento e do exercício na memória e em marcadores epigenéticos na região promotora dos genes *cFos*, *Bdnf* e *Dnmt3a* em hipocampo. O envelhecimento foi associado a modificações epigenéticas em histonas nos promotores de *Bdnf*, *cFos* e *Dnmt3a*. As modalidades aeróbica, acrobática e combinada melhoraram o desempenho na memória aversiva em ambas as idades testadas. Além disso, essas modalidades alteraram a acetilação da H3K9 e trimetilação da H3K4 no promotor do *cFos* de animais envelhecidos. As modalidades aeróbica e força reverteram parcialmente os aumentos induzidos pela idade na trimetilação da H3K4 no promotor do *Bdnf*. O treino de força e a combinação de modalidades alteraram a acetilação da H4K8 no promotor do *Dnmt3a* em ratos adultos jovens. Em suma, nossos resultados demonstraram que o exercício físico melhora a memória aversiva de ratos *Wistar*, de maneira protocolo-dependente, sendo efetivas as modalidades aeróbica, acrobática e combinada. Além

disso, um importante achado desse trabalho foram as mudanças relacionadas ao envelhecimento e ao exercício físico em marcas epigenéticas, tanto em histonas específicas quanto em região promotora de genes de interesse no hipocampo de ratos *Wistar*. Nossos resultados contribuem para a literatura, fornecendo possíveis mecanismos biológicos que sustentem a prescrição clínica de diferentes modalidades de exercício para atenuar os déficits de memória durante o envelhecimento.

Palavras chave: Epigenética; Exercício; Ratos; Memória; histonas; envelhecimento.

Abstract

In this thesis, we aimed to investigate the impact of different exercise modalities on aversive memory and hippocampal epigenetic regulation globally and at the promoter regions of genes of interest in *Wistar* rats during aging process. Two experiments were carried out in this investigation.

First, we considered the effect of a daily aerobic protocol (20-min for 2 weeks) on the aversive memory and acetylation levels of H3K9, H4K12 and H4K5 specific sites in the hippocampus of young adult and aged *Wistar* rats. Exercise improved aversive memory and increased acetylation levels of H4K12 in both groups. Exercise was also able to increase H3K9 acetylation levels in the group of aged animals. In addition, an age-related cognitive decline was observed without any effect on the histone acetylation status.

In the second experiment, young adult and aged rats were submitted to 12 weeks of physical training in aerobic, resistance, acrobatic or combined modalities. In this experiment we investigated the effect of aging and exercise in memory and epigenetic marks in the promoter region of the *cFos*, *Bdnf* and *Dnmt3a* genes in the hippocampus. Aging was associated with altered histone modifications at *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a* promoters. Aerobic, acrobatic and combined modalities improved aversive memory performance in young adult and aged rats. Moreover, these modalities altered hippocampal epigenetic marks, particularly H3K9ac or H3K4me3, at the *cFos* promoter of aged animals. Aerobic and resistance modalities partially reversed age-induced increases in H3K4me3 at the *Bdnf* promoter. Resistance and combined modalities changed H4K8ac at the *Dnmt3a* promoter in young adult rats. In summary, our results demonstrated that physical exercise improves aversive memory of *Wistar* rats in a protocol-dependent manner, being the aerobic, acrobatic and combined modalities more effective. In addition, an important finding of this work were the changes related to aging and physical exercise in epigenetic marks, both in specific histones globally and at promoter region of genes of interest in the hippocampus of *Wistar*

rats. Our results contribute to the literature, providing biological mechanisms that support the clinical prescription of different exercise modalities in order to attenuate memory deficits induced by the aging process.

Keywords: Epigenetics, Exercise, rats, memory; aging.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura da cromatina (A) e histonas (B)

Figura 2 - Modificações epigenéticas em histonas

Figura 3 - Enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC)

Figura 4 - Metilação das Histonas

Figura 5 - Desenho Experimental 1

Figura 6 - Esteira adaptada para roedores

Figura 7 - Aparato da Esquiva Inibitória

Figura 8 – Desenho Experimental 2

Figura 9 - Aparato para o treino de força

Capítulo 1:

Figure 1 – Experimental Design.

Figure 2 – Effect of aging and exercise on step down latency in inhibitory avoidance. Columns represent mean \pm S.D. (n=10-12). Two way ANOVA, *values significantly different from those respective to sedentary control group ($p < 0.0001$); # significantly different from the 3-month-old groups ($p = 0.05$).

Figure 3 - Effect of exercise on the hippocampal levels of H4K12 acetylation. The results are expressed in percentage of control of the young SED not exposed to inhibitory avoidance rats and the columns represent the mean \pm S.D (n=5). Three-way ANOVA; * indicates a significant effect of exercise ($p = 0.006$).

Figure 4 - Effect of exercise and age on the hippocampal levels of H3K9 acetylation. The results are expressed in percentage of control of the young SED not exposed to inhibitory avoidance rats and the columns represent the mean \pm S.D (n=5). Three-way ANOVA; * indicates a significant effect of exercise ($p = 0.006$) and a significant interaction between exercise and age ($p = 0.039$).

Capítulo 2:

Figure 1. Experimental Design (I.A.: Inhibitory Avoidance)

Figure 2. Effect of aging and exercise modalities on step-down latency in inhibitory avoidance paradigm. Columns represent mean \pm S.D. (n = 7-10). 2A. Effect of aging on step-down latency. Student's t-test *values significantly different from the 5 months-old groups. 2B and 2C. Effect of exercise on step-down latency in young adult and aged rats respectively. One-Way ANOVA; #values significantly different from the respective sedentary group.

Figure 3. Effect of aging at the *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a* promoters in hippocampus of *Wistar* rats. 3A. Effect of aging on acetylated (H4K8 and H3K9) and methylated (H3K9me2 and H3K4me3) chromatin. 3B. Effect of aging on acetylated (H4K8 and H3K9) and methylated (H3K4me3 and H3K9me2) chromatin. 3C. Effect of aging on acetylated (H3K9) and methylated (H3K4me3 and H3K9me2) chromatin. Columns represent mean \pm S.D. (n = 4-5) and data are presented as percent input. Student's t-test *values significantly different from the 5 months-old groups.

Figure 4. Effect of exercise at the *Bdnf* promoter in hippocampus of *Wistar* rats. 4A. Effect of exercise on H4K8ac chromatin. 4B. Effect of exercise on H3K4me3 chromatin. Columns represent mean \pm S.D. (n = 4-5) and data are presented as percent input. One-Way ANOVA #values significantly different from the respective sedentary group.

Figure 5. Effect of exercise at the *cFos* promoter in hippocampus of *Wistar* rats. 5A. Effect of exercise on H3K9ac chromatin. 5B. Effect of exercise on H3K4me3 chromatin. Columns represent mean \pm S.D. (n = 4-5) and data are presented as percent input. One-Way ANOVA #values significantly different from the respective sedentary group.

Figure 6. Effect of exercise on H4K8ac chromatin at the *Dnmt3a* promoter in hippocampus of *Wistar* rats. Columns represent mean \pm S.D. (n = 4-5) and data are presented as percent input. One-Way ANOVA #values significantly different from the respective sedentary group.

Lista de Tabelas

Capítulo 1 –

Table 1 - Velocities progression in time during adaptation period (1-2 days) and training protocol (3-14 days) in 3 and 20- to 21-month-old *Wistar* rats.

Capítulo 2 –

Table 1: Gene name, accession number, forward primer sequence, and reverse primer sequence of primer pairs used in quantitative PCR amplification.

Lista de abreviações e siglas

Acetil-CoA – Acetilcoenzima A

ANOVA – Análise de Variância

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo

CEUA – Comissão de ética para o uso de animais

CREAL – Centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNMT – Dna metiltransferases

HAT – Histona Acetiltransferase

HDAC – Histona desacetilase

HMT – Histona Metiltransferase

H3K4me3 – Trimetilação da histona 3 lisina 4

H3K9ac – Acetilação da histona 3 lisina 9

H3K9me2 – Dimetilação da histona 3 lisina 9

H4K8ac – Acetilação da histona 4 lisina oito

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

mA – Miliampère

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VO_{2max} – Consumo máximo de oxigênio

μL – Microlitros

Sumário

Resumo	6
Abstract	9
Lista de Figuras	12
Lista de Tabelas	15
Lista de abreviações e siglas	17
1. Introdução	21
1.1. Envelhecimento, Memória e Exercício Físico	22
1.2 Epigenética e Envelhecimento.....	24
1.3 Epigenética e Exercício Físico	28
2. Justificativa e Hipótese de Trabalho	31
3. Objetivos	33
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4. Abordagem Metodológica.....	35
4.1 Materiais e Métodos.....	36
4.1.1 Materiais e métodos referentes ao Capítulo 1.....	36
4.1.1.1 Animais	36
4.1.1.2 Protocolo de exercício Físico	36
4.1.1.3 Preparação das amostras	38
4.1.1.5 Cálculo Amostral	39
4.1.1.6 Análise Estatística.....	40
4.1.2 Materiais e métodos referentes ao Capítulo 2.....	40
4.1.2.1 Animais	40

4.1.2.2 Protocolos de Exercício	41
4.1.2.3 Paradigma de memória: Teste de esquila inibitória.....	43
4.1.2.4. Preparação das amostras	43
4.1.2.5 Imunoprecipitação da cromatina.....	43
4.1.2.6 Análise Estatística.....	45
5. Capítulo 1:	46
6. Capítulo 2	53
.....	54
7. Discussão	83
8. Conclusões.....	92
10. Referências Bibliográficas.....	95

1. Introdução

1.1. Envelhecimento, Memória e Exercício Físico

O envelhecimento é caracterizado por um declínio fisiológico associado a modificações morfológicas, moleculares e comportamentais [1]. Estima-se que no Brasil, em 2020, cerca de 14% da população estará acima dos 65 anos de idade [2]. Este dado é relevante já que possui repercussão direta sobre a saúde pública, uma vez que o envelhecimento tem sido relacionado à redução da capacidade cognitiva – em especial de memória e aprendizado – em idosos, levando à limitações na capacidade funcional e de realização pessoal, social e econômica [3-5]. Pesquisas clínicas mostram que o envelhecimento fisiológico, sem doenças neurodegenerativas associadas, afeta habilidades cognitivas como a memória espacial, memória de trabalho, tempo de resposta e formação de memórias de longo prazo [6, 7]. Esses efeitos também são observados em estudos pré-clínicos com roedores e primatas, onde estes animais apresentaram um pior desempenho em paradigmas de memória [8-11]. Nesse contexto, torna-se premente estudar alternativas preventivas e terapêuticas a fim de minimizar os déficits cognitivos relacionados ao envelhecimento.

Diversos estudos apontam o exercício físico como uma estratégia não farmacológica de baixo custo, eficaz tanto na prevenção quanto no tratamento destes déficits [12, 13]. O *American Heart Association and American College of Sports Medicine* recomenda a combinação do exercício aeróbico, de força e equilíbrio para pacientes idosos com o objetivo de promover melhora na capacidade funcional, independência física e também na melhora desempenho cognitivo [14, 15]. Este tipo de protocolo é conhecido como treinamento combinado e já tem evidências na melhora de força, potência muscular e função cardiorrespiratórias em jovens [16-19] e idosos [20-22]. É interessante que tanto o treinamento aeróbico, quanto o treino de força, são procurados por indivíduos idosos para aprimorar a aptidão física e já existem trabalhos que observaram que a

combinação dessas modalidades por 12 meses teve um efeito funcional, reduzindo a incidência de quedas nessa população [23].

Os benefícios da atividade física na memória em idosos têm sido descritos na literatura [24-26], mas trabalhos que investigaram o impacto de protocolos combinados no manejo dos déficits cognitivos do envelhecimento, ainda são escassos. Nesse contexto, o uso de modelos animais tem sido bastante empregado para o estudo dos mecanismos de ação pelos quais o exercício protege e reestabelece as funções cerebrais no envelhecimento, inclusive melhorando a memória. A maioria dos trabalhos pré-clínicos avaliando a combinação de modalidades têm focado em aspectos musculoesqueléticos e metabólicos em animais jovens [27, 28].

Dentre as modalidades de exercício, o treinamento aeróbico é um dos mais estudados. Evidências em humanos demonstraram que à prática regular de atividade física aeróbica, durante a vida, melhorou aspectos da função executiva, diminuiu a perda neuronal, melhorou o controle motor e a memória de trabalho em idosos [29]. Roig et al (2013), em uma metanálise com humanos saudáveis, sugere que o exercício aeróbico fornece estímulos necessários para otimizar as respostas da maquinaria molecular responsável pelo processamento da memória [13]. Ensaios pré-clínicos realizados em nosso grupo de pesquisa também demonstraram efeitos benéficos do exercício sobre a memória, onde o treino aeróbico moderado por 2 semanas melhorou a memória aversiva em ratos *Wistar* [10, 30]. Este achado está de acordo com outros trabalhos que também evidenciaram os efeitos benéficos do exercício aeróbico em diferentes paradigmas de memória [31-33].

O treino de força é outra modalidade de exercício muito empregada na população idosa, com bons resultados funcionais: melhora do equilíbrio [34], diminuição de quedas [35], atenuação da hipotrofia muscular [36] e já existem evidências quanto a melhora cognitiva [37, 38]. Em modelos

animais, a sessão única do treino de força foi capaz de melhorar a memória contextual com aumento dos níveis de sinapsina e sinaptofisina em hipocampo de ratos *Wistar* adultos [39]. Já o treinamento crônico também foi capaz de melhorar a memória com aumento concomitante do IGF-1 hipocampal, um importante mediador da angiogênese cerebral [40]. Apesar das evidências que o treino de força impacta na expressão de neurotrofinas hipocampais, ainda são escassos os estudos que fizeram essas análises em animais envelhecidos.

Outra modalidade de exercício que induz o aprendizado motor em modelos animais é o chamado exercício acrobático. Este, exige que os animais desenvolvam equilíbrio [41], habilidades no uso dos membros posteriores e coordenação dos membros anteriores [42] além de requerer ajustes na coordenação motora global dos animais [43]. O exercício acrobático tem sido relacionado com o aumento na expressão de proteínas relacionadas à neuroplasticidade [44, 45] e memória [46], no entanto, são raros os trabalhos que relataram o efeito dessa modalidade de exercício em animais envelhecidos. Em humanos, o treino de equilíbrio especificamente na população idosa tem sido investigado utilizando circuitos proprioceptivos [47, 48] e do Tai Chi [49, 50] com melhora tanto do equilíbrio e coordenação quanto em aspectos cognitivos. Evidências têm sugerido que, tanto o exercício físico quanto o envelhecimento, podem modular o processo de transcrição de genes envolvidos na plasticidade sináptica e memória, por meio de modificações epigenéticas [51].

1.2 Epigenética e Envelhecimento

Fenômenos epigenéticos referem-se ao processo no qual a informação genética de um organismo interage com o ambiente. Esses alteram o estado dinâmico da cromatina, podendo influenciar o fenótipo do indivíduo, sem mudanças na sequência dos nucleotídeos [52-55]. A estrutura da

cromatina consiste em quatro pares de proteínas denominadas histonas (H2B, H4, H3 e H2A), as quais estão envolvidas pelo DNA (Figura 1).

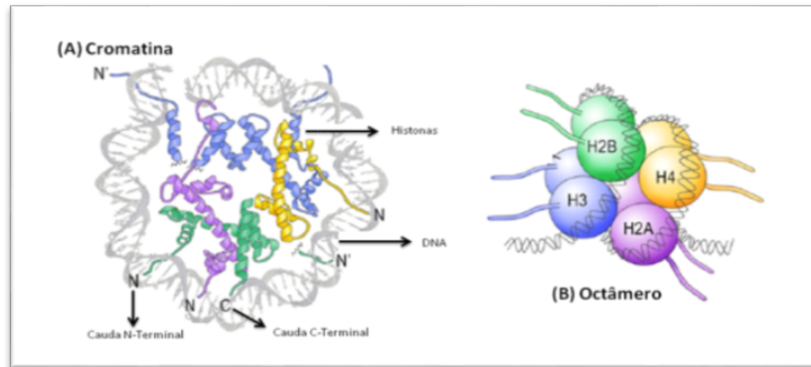


Figura 1 - Estrutura da cromatina (A) e histonas (B) (adaptada de Gräff e Mansuy, 2008).

As principais alterações epigenéticas são a metilação do DNA e a acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação das histonas, sendo a acetilação e metilação de histonas o foco desta tese. A acetilação e metilação de histonas ocorrem em sítios específicos denominados lisinas (K) (Figura 2) [56-58]. É interessante comentar que mudanças no estado das histonas podem alterar a conformação da cromatina e com isto regular a transcrição gênica [59].

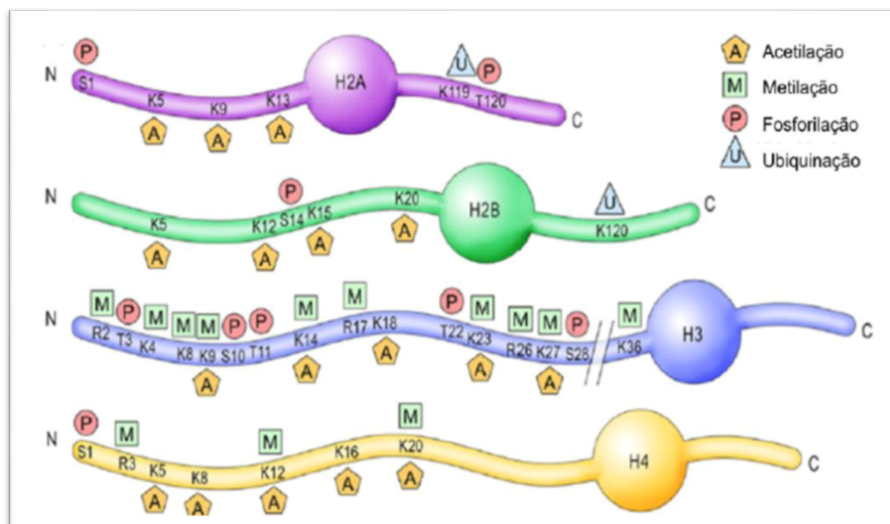


Figura 2 - Modificações epigenéticas em histonas (Adaptada de Gräff e Mansuy, 2008).

A acetilação das histonas é catalisada por dois grupos enzimáticos denominados histona acetiltransferases (HATs) e histona desacetilases (HDACs) [52, 60]. As HATs usam o acetil-CoA como doador de grupamento acetil para as histonas [56, 61]. A acetilação neutraliza a carga positiva, enfraquecendo as interações eletrostáticas da histona com o DNA, o que torna a cromatina menos compacta, facilitando a transcrição gênica [52, 60]. Por outro lado, as HDACs desacetilam as lisinas retirando o grupamento acetil, deixando a estrutura da cromatina mais compacta e assim reprimindo a transcrição gênica (Figura 3) [56, 59].

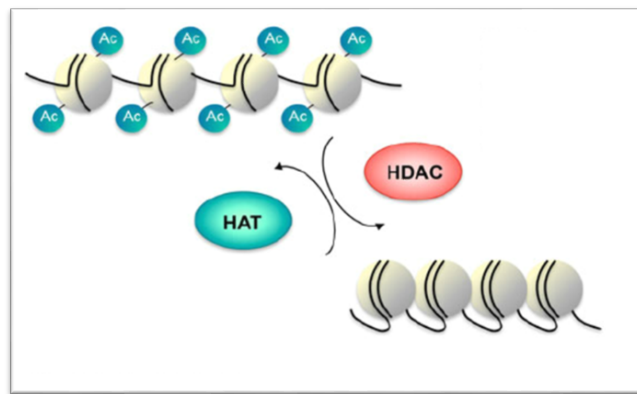


Figura 3 - Enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC)

(Adaptada de Anthony et al 2013)

Diferentemente da acetilação, a metilação de histonas (Figura 4), catalisada pelas histonas metiltransferases (HMT), está relacionada tanto com ativação quanto com repressão gênica. Estas respostas dependem do grau de metilação (mono, di e tri metilação), da histona e lisina na qual o grupamento metil é adicionado [62]. Por exemplo, já está consolidado na literatura que a lisina 9 (K9) da histona 3 (H3), quando monometilada, está associada a ativação transcricional enquanto a di e tri-metilação resultam em silênciamento gênico. Por outro lado, no caso da histona 4 (H4) lisina 4 (K4) a di- e trimetilação induzem ao relaxamento da cromatina favorecendo a transcrição gênica [63, 64].

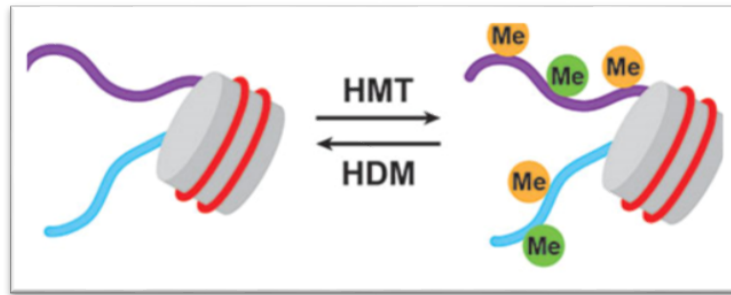


Figura 4 - Metilação das Histonas (Adaptada de <https://pharmacy.wisc.edu/jiang-lab/research/>)

Recentemente, alterações epigenéticas têm sido relacionadas com o processo do envelhecimento, especialmente envolvendo alterações no padrão de acetilação. Já foi observado uma diminuição da acetilação global da H3 e nas lisinas específicas H3K9 e H4K12 em hipocampo de roedores envelhecidos, sendo essa diminuição relacionada a menor expressão do Fator neurotrófico derivado do encéfalo (*Bdnf*) [65].

Resultados prévios do nosso grupo apontam um padrão de desacetilação relacionado com o envelhecimento, uma vez que já foi observado tanto aumento na atividade da HDAC em hipocampo de ratos envelhecidos [66] quanto a diminuição na acetilação da histona H4 global, associado a déficit de memória aversiva em ratos *Wistar* de 20 meses de idade [10]. Ricobaraza e colegas (2009), utilizando os camundongos transgênicos Tg2576 como modelo de doença de Alzheimer, evidenciaram um declínio na acetilação global das histonas H3 e H4, em hipocampo de camundongos de 15 meses, este achado foi associado a um déficit da memória espacial [67].

É importante destacar que estudos sugerem que a própria exposição a um contexto de aprendizado pode levar ao aumento da acetilação de histonas [68-70]. Bousiges e colaboradores (2010) observaram que a exposição ao teste do labirinto aquático (memória espacial) aumentou a acetilação global das histonas H2B e H4 no hipocampo de ratos de 3 meses de idade [69]. Em outro estudo, o contexto de medo condicionado (memória aversiva) aumentou a acetilação global

da histona H3 e não da H4 [70]. Peleg e colaboradores (2011) demonstraram um aumento transitório da acetilação das lisinas H3K9, H3K12, H4K5, H4K8 e H4K16 após a exposição ao contexto de medo condicionado, em hipocampus de camundongos 3 e 16 meses de idade. No entanto, a lisina H4K12 aumentou apenas em camundongos de 3 meses, assim, os autores sugerem um papel desta lisina no déficit de memória relacionado ao envelhecimento [68]. Nesse sentido, outros paradigmas de memória aversiva podem ser explorados para uma melhor contextualização do efeito da acetilação específica sobre déficit de memória relacionado à idade.

A metilação de histonas também tem sido relacionada com o processo de formação de memória e envelhecimento. Gupta et al (2010) observou que o condicionamento de medo levou ao aumento na H3K9me2 e H3K4me3 no hipocampo, sugerindo que a metilação da H3 regula a expressão de genes específicos durante a formação da memória em ratos jovens [63]. Morse et al (2015) observaram durante o envelhecimento em roedores, modulação das mesmas marcas em hipocampo, relacionando esses achados com pior desempenho em testes de memória declarativa, sugerindo assim, o papel crucial dessas na formação da memória durante a senescência [71]. Estudos prévios apontam que a di e trimetilação da histona H3 (marcas de metilação repressivas) são características do envelhecimento [72].

1.3 Epigenética e Exercício Físico

É importante destacar que agentes que promovam aumento no nível de acetilação de histonas parecem ser recursos terapêuticos promissores no tratamento dos déficits cognitivos relacionados ao envelhecimento, contribuindo para a melhora da qualidade de vida de idosos [73]. Dados de nosso grupo demonstram que o efeito neuroprotetor do exercício pode estar relacionado, pelo menos em parte, com a modulação da atividade das enzimas HAT e HDAC, uma vez que o exercício físico aeróbico aumentou a atividade da HAT e diminuiu a atividade da HDAC, um indicativo de

aumento da acetilação de histonas [74]. Gomez-Pinilla e colegas (2013) observou em ratos de 3 meses submetidos a um protocolo de exercício voluntário, a diminuição atividade da HDAC após a atividade, com aumento concomitante da acetilação da histona H3 e dos níveis de BDNF [75].

Durante o processo de envelhecimento foi observada uma redução na acetilação global da histona H4 em hipocampo de ratos *Wistar*, enquanto que o exercício aeróbico moderado (20min/dia durante 14 dias) reverteu esse padrão, sendo este achado relacionado com melhor desempenho no teste da esQUIVA inibitória [10]. Resultados semelhantes foram encontrados com o mesmo protocolo em córtex pré-frontal [76]. É importante mencionar que diversos trabalhos relacionam a acetilação de histonas com formação de memória [61, 77].

Nesse contexto, Peleg e colaboradores (2010) demonstraram um aumento da acetilação das lisinas H3K9, H3K12, H4K5, H4K8, H4K16, uma hora após a exposição ao contexto de medo condicionado, em roedores de 3 e 16 meses de idade. No entanto, a lisina H4K12 aumentou apenas nos jovens, e, com isso, os autores sugerem um papel da desacetilação desta lisina no déficit de memória relacionado ao envelhecimento [68]. Logo, o estudo dos efeitos do exercício nessa lisina específica é essencial dada sua importância na maquinaria transcricional durante a formação da memória no envelhecimento.

Nosso grupo de pesquisa relatou também, o efeito de protocolos de exercício aeróbico na metilação de histonas e níveis de DNMTs em hipocampo de ratos durante o envelhecimento. Em um estudo publicado por Elsner et al (2013) a sessão única de exercício diminuiu os níveis de DNMT3b e DNMT1 em ratos jovens. Por outro lado, tanto a sessão única quanto o protocolo crônico moderado (20 minutos/dia durante 14 dias) reduziu a metilação da H3K9 em ratos adultos jovens e no envelhecimento a sessão única reverteu o efeito induzido pelo envelhecimento nesta lisina [78].

Trabalhos na literatura também tem avaliado o efeito de diferentes modalidades de exercício em marcadores epigenéticos na região promotora de genes, relacionando essa modulação com achados de expressão. O exercício aeróbico voluntário reduziu os níveis da enzima HDAC, aumentou a acetilação da histona H3 em hipocampo, impactando nos níveis BDNF em ratos Sprague-Dawley de 3 meses [75]. O déficit de memória do envelhecimento está relacionado com redução nos níveis de BDNF tanto em estudos com humanos [79, 80] quanto em modelos animais [81, 82], e protocolos de exercício físico são capazes de modular os níveis dessa neurotrofina em animais jovens, desta forma, se faz essencial estudar o efeito de protocolos combinados nesse gene durante o envelhecimento e sua regulação por vias epigenéticas.

O treino de força em humanos já foi capaz de alterar a metilação do DNA em marcadores periféricos, adipócitos e tecido muscular, além de modificar a expressão proteica de fatores de crescimento [83-86], no entanto, não existem estudos que avaliaram em modelos animais os efeitos no sistema nervoso central de treinos de força ou sua associação com protocolos aeróbicos. Embora alguns trabalhos já tenham observado aumento na expressão do gene *Bdnf* em hipocampo induzido pelas modalidades acrobática e força [44, 87], ainda não existem trabalhos que relacionam a regulação epigenética desse gene, especialmente no hipocampo de animais envelhecidos.

Os genes do *cFos* e do *Dnmt3a*, são importantes para plasticidade sináptica, atividade e desenvolvimento neuronal e formação da memória [88, 89]. E apesar de existir alguns dados na literatura que demonstram a expressão desses genes regulado por algumas modalidades de exercício [43, 90, 91], não há estudos prévios que tenham investigado a regulação epigenética de diferentes modalidades de exercício na região promotora desses genes durante o processo de envelhecimento.

2. Justificativa e Hipótese de Trabalho

Com o aumento da expectativa de vida e do número de idosos no Brasil, torna-se premente estudar alternativas preventivas e terapêuticas para minimizar os déficits cognitivos e motores relacionados ao envelhecimento. Diversos estudos evidenciam exercício físico como uma estratégia não farmacológica, de baixo custo, eficaz na prevenção e tratamento destes déficits. No entanto, os mecanismos de ação dos efeitos protetores no processo de envelhecimento do treinamento aeróbico, o de força, acrobático e a associação destes ainda não foram elucidados.

Considerando que os mecanismos epigenéticos podem estar relacionados ao processo de envelhecimento e ao efeito protetor do exercício físico, é imprescindível investigar a ação de diferentes modalidades de exercício sobre parâmetros epigenéticos e sua relação com o desempenho cognitivo e motor durante o envelhecimento.

Primeiramente, nossa hipótese de trabalho foi que o envelhecimento reduz a acetilação global de lisinas específicas em hipocampus, e que o exercício reverte, pelo menos parcialmente, o efeito do envelhecimento nesses parâmetros epigenéticos com concomitante impacto na memória aversiva. Considerando que houve alteração global, hipotetizamos que há alterações nos resíduos específicos em regiões promotoras de genes relacionados à memória. Ainda, que protocolos de exercício de força, aeróbico, acrobático e combinado modulam de maneira protocolo e idade-dependente tanto o desempenho em teste de memória quanto nos marcadores epigenéticos testados.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Esta tese de doutorado teve como objetivo geral investigar a ação de diferentes modalidades de exercício sobre parâmetros epigenéticos e sua relação com o desempenho cognitivo durante o envelhecimento em ratos *Wistar*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do exercício aeróbico em ratos *Wistar* no processo de envelhecimento sobre a memória aversiva e o padrão de acetilação das histonas H4K5, H3K9 e H4K12 em hipocampo.

- Estudar o impacto da exposição a um contexto de aprendizado (esquiva inibitória) sobre o e acetilação de histonas específicas em hipocampo de ratos *Wistar* durante o envelhecimento;

- Investigar os efeitos de diferentes modalidades de exercício físico sobre a memória aversiva em ratos *Wistar* durante o processo de envelhecimento;

- Avaliar mudanças induzidas pelas diferentes modalidades de exercício em marcas epigenéticas em histonas, especificamente H3K9ac, H4K8ac, H3K9me2 e H3K4me3, na região promotora dos genes *Bdnf*, *Fos* e *Dnmt3a* hipocampo de ratos *Wistar* durante o envelhecimento.

4. Abordagem Metodológica

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Materiais e métodos referentes ao Capítulo 1

4.1.1.1 Animais

Foram utilizados 72 ratos *Wistar* de 3 e 20 meses fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, após aprovação pela Comissão de Éticas no Uso de Animais (CEUA 23997) da respectiva instituição. Os animais permaneceram em grupos de no máximo 4, em caixas de Plexiglass (40 x 33,3 x 17 cm), com troca de maravalha a cada dois dias e condições padrão de biotério (ciclo de 12h claro/escuro), com temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade ($60\% \pm 10$) controladas e água e comida fornecidas à vontade, e posteriormente foram divididos em oito grupos experimentais conforme o desenho experimental:

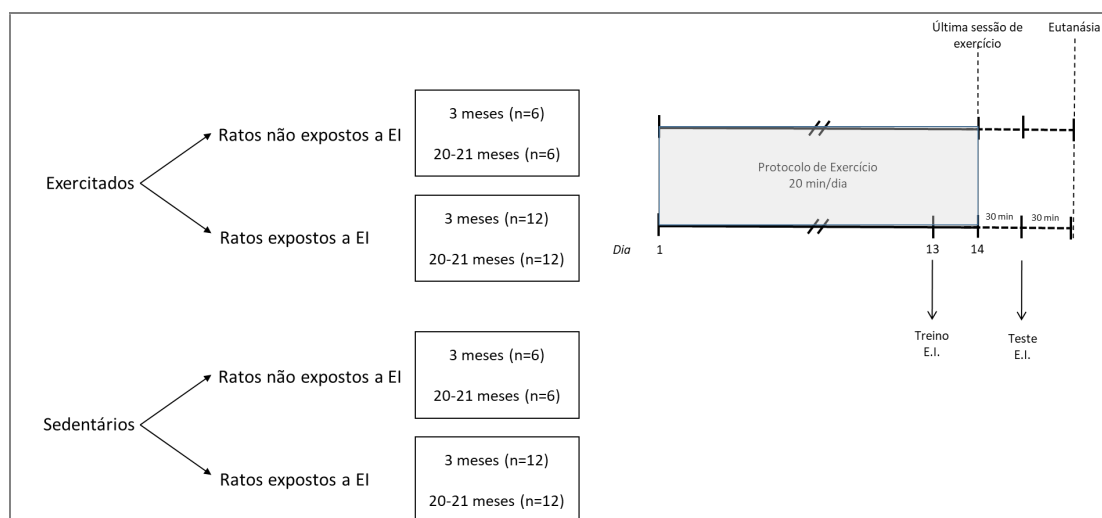


Figura 5 - Desenho Experimental

4.1.1.2 Protocolo de exercício Físico

O protocolo de exercício físico consiste em corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos (Inbramed TK 01, Porto Alegre, Brasil), (Figura 6). Para determinar a velocidade de corrida foi utilizada a medida de consumo máximo de oxigênio indireto ($\text{VO}_2 \text{ máx}$) recomendada por Brooks e

White[92]. Nesta medida os animais são submetidos à corrida em esteira com velocidade progressiva (5 m/min a cada 3 min) até atingirem a exaustão. O tempo de fadiga (em minutos) e a velocidade máxima (em m/min) são tomados como índice da capacidade de exercício e usados para a mensuração de VO_2 máx indireto.

Os animais foram divididos em grupos exercitados (EXE) ou sedentários (SED). Os animais do grupo EXE são submetidos à corrida na esteira durante 20 minutos, por duas semanas a uma intensidade de 60% do VO_2 máx entre as 14 e 17h, diariamente, segundo protocolo neuroprotetor proposto por Elsner (2011) [74]. Os animais SED são colocados na esteira desligada por 5 minutos, sendo desta forma, manipulados exatamente como os animais do grupo EXE.



Figura 6- Esteira adaptada para roedores

4.1.1.2 Paradigma da Esquiva Inibitória

Para avaliar a memória aversiva de longa duração, foi utilizado o paradigma da esquiva inibitória, que consiste de duas sessões, sendo elas treino e teste. O aparato da esquiva inibitória consiste de

uma caixa de acrílico de 50x25x25cm com uma grade de barras de aço paralelas de 1 mm de diâmetro contendo uma plataforma (com altura de 7 cm) (Figura 7).



Figura 7 - Aparato da Esquiva Inibitória

Na sessão treino, 30 minutos após o exercício físico, os animais foram colocados na plataforma e sua latência de decida medida (em segundos). Ao descer, o animal recebeu um choque com intensidade de 0,6 mA por 3 segundos. Na sessão teste, 30 minutos após a última sessão de exercício físico, os animais foram recolocados na plataforma e a latência de decida da plataforma é registrada e usada como medida de retenção (memória) da tarefa e nenhum choque é aplicado ao animal. Para avaliação da memória de longa duração, a sessão teste acontece 24 horas após o treino no aparato.

4.1.1.3 Preparação das amostras

Os animais foram decapitados uma hora após a última sessão de exercício e posteriormente o hipocampo foi rapidamente dissecado, congelado em N₂ líquido e armazenadas a -80°C até a realização dos ensaios bioquímicos.

O hipocampo foi homogeneizado (n=5) em solução EDTA-free (Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil) 1X contendo um coquetel de inibidor de protease e estocado a -80°C para as análises subsequentes.

As histonas foram extraídas com protocolo previamente utilizado[93]. Em suma, um tampão PBS (Phosphate-Buffered-Saline) contendo 250µL de Triton e 10mg NaN₃ foi adicionado ao homogeneizado, resultando em um volume final de 50 mL. Depois de 10 minutos no gelo, as amostras foram centrifugadas a 6500 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet coletado. HCl (0,2M) foi adicionado em volume igual e a extração ácida de histonas ocorreu overnight à 4°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 6500 g por 10min a 4°C, e o extrato de histonas estocado a -80°C. A concentração de proteína para cada amostra foi determinada pelo método descrito por Bradford em 1976 [94], usando albumina bovina como padrão.

4.1.1.4 Western blot

25µg do total de proteína foi separado em um gel poliacrilamida- SDS 12% e transferida por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em uma solução 5% de leite desnatado em TBS contendo 0.05% Tween-20 e incubados com os seguintes anticorpos: anti-β-actin (ab8227, Abcam) numa concentração 1:1500, anti-acetyl histone H3 (Lys-9, ab10812, Abcam) numa concentração 1:500, anti-acetyl histone H4 (Lys-5, K5, ab51997, Abcam) numa concentração 1:700, e anti-acetyl histone H4 (Lys-12, K12, ab61238, Abcam) numa concentração 1:700. Os anticorpos secundários conjugados (ab6721, HRP) foram utilizados e detectados utilizando o kit de substratos Western Blot de ECL (ab65628, Abcam, EUA). Foram utilizados marcadores pré-corados (Benchmark marker, Invitrogen) para determinar o peso molecular das bandas detectadas e confirmar a especificidade do alvo de anticorpos. A quantificação foi realizada utilizando um sistema de imagem Kodak Gel Logic 2200. Os níveis de proteína total foram normalizados de acordo com o nível de proteína β-actina de cada amostra.

4.1.1.5 Cálculo Amostral

Tendo por base dados prévios de nosso laboratório, que utilizaram metodologia semelhante, além de dados disponíveis na literatura[70, 74], o tamanho da amostra foi estimado em 12 animais por grupo para os grupos que serão submetidos a teste de comportamento e 6 para as análises bioquímicas, considerando a diferença mínima entre as médias, o desvio padrão, o nível de significância - erro tipo I ou α - de 5% e o poder de confiança de 90%.

4.1.1.6 Análise Estatística

Os resultados das relações entre as marcas epigenéticas e os níveis de β -actina foram expressos em porcentagem de controle e analisados por análise de variância (ANOVA) de três vias com idade, exercício e exposição a esquiva inibitória como fatores. Os resultados da esquiva inibitória foram analisados por ANOVA de duas vias com idade e exercício como fatores. Em todos os testes $p \leq 0.05$ foi considerado significativo estatisticamente.

4.1.2 Materiais e métodos referentes ao Capítulo 2

4.1.2.1 Animais

Foram utilizados 76 ratos *Wistar* de 2 e 22 meses de idade fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 29818) da respectiva instituição. Os animais permaneceram em grupos de no máximo 3, em caixas de Plexiglass (40 x 33,3 x 17 cm), com troca de maravalha a cada dois dias e condições padrão de biotério (ciclo de 12h claro/escuro), com temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade ($60\% \pm 10$) controladas e água e comida fornecidas à vontade, e posteriormente foram divididos em 10 grupos experimentais conforme o desenho experimental:

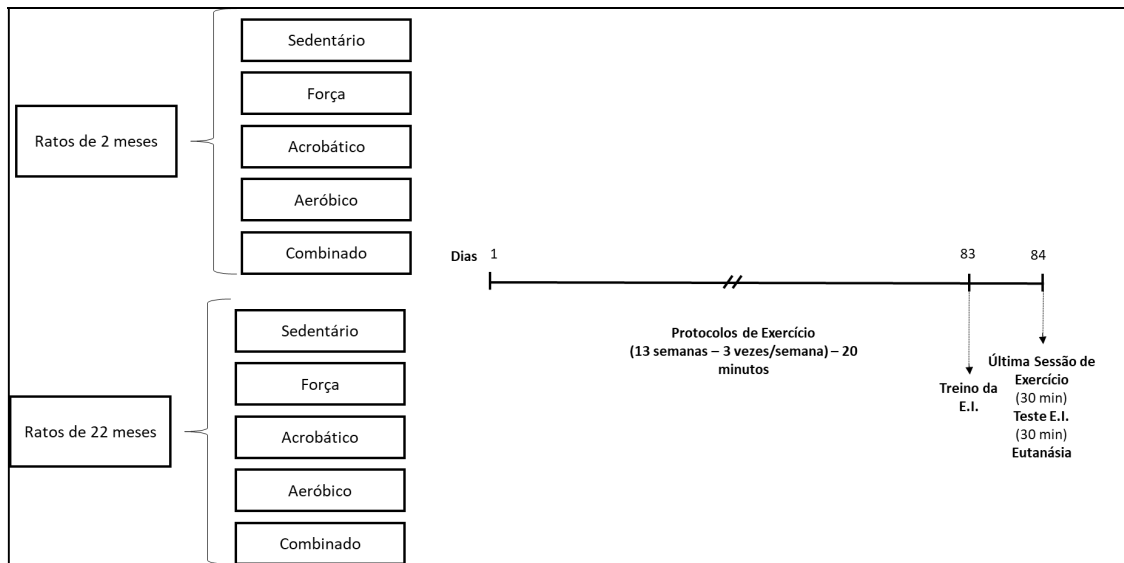


Figura 8 - Desenho Experimental 2

4.1.2.2 Protocolos de Exercício

Os ratos adultos jovens e envelhecidos foram randomicamente divididos em 5 grupos (n=6-9): sedentário, aeróbico, acrobático, força e combinado. Todos os grupos experimentais, exceto o grupo sedentário, foram submetidos a 20 minutos de exercício, 3 vezes por semana durante 12 semanas. Os animais foram habituados a cada modalidade por meio da exposição aos diferentes aparatos uma semana antes do início dos protocolos de exercício. Os animais sedentários receberam manipulação semelhante aos grupos exercitados, sendo colocados na esteira desligada ou aparato do treino acrobático e força sem carga por curtos períodos. Nenhum choque ou estímulo físico foi utilizado nesse estudo. Todos os procedimentos ocorreram entre as 14:00 e 17:00h.

Exercício Aeróbico

O protocolo de treino aeróbico consistiu em corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos (Inbramed TK 01, Porto Alegre, Brasil). Para determinar a velocidade de corrida foi utilizada a medida de consumo máximo de oxigênio indireto (VO₂máx) recomendada por Brooks e White

(1987). Nesta medida os animais foram submetidos à corrida em esteira com velocidade progressiva (5 m/min a cada 3 min) até atingirem a exaustão. O tempo de fadiga (em minutos) e a velocidade máxima (em m/min) foram tomados como índice da capacidade de exercício e usados para a mensuração de VO₂máx indireto. Além de ser usado para determinação inicial da intensidade do treino, essa medida foi repetida a cada três semanas para progressão da velocidade de acordo com as adaptações ao exercício, totalizando 4 medidas. Os animais do grupo aeróbico foram submetidos à corrida na esteira durante 20 minutos, 3 vezes diariamente.

Treino de força

O protocolo de treino de força foi adaptado de Gil e colaboradores (2015), utilizando uma escada vertical (1m de comprimento e 85º de inclinação) com uma caixa escura no topo (20 x 20 x 20 cm) (Figura 9). Os animais eram condicionados a escalar até a caixa escura em series de 8 repetições com peso fixado em suas caudas. O peso foi determinado usando o teste de uma repetição máxima (1RM) adaptada para ratos. Nesse teste os animais inicialmente subiam a escada com metade do seu peso corporal nas caudas. Após realizarem essa atividade com sucesso, 30g eram adicionados para uma nova tentativa (2 escaladas + 2 minutos de descanso). Esse procedimento foi repetido até que os animais não conseguissem mais escalar e o peso final foi considerado a capacidade máxima. Os animais iniciaram o protocolo com 50% da capacidade máxima e a cada 3 semanas, 10% da carga máxima era adicionada até um limite de 80% nas últimas 3 semanas [95].

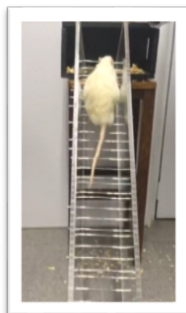


Figura 9 - Aparato para o treino de força

Protocolo Acrobático

O treino acrobático foi adaptado conforme protocolo de Jones et al (1999)[96]. Em cada sessão de treinamento os animais tinham que completar 5 atividades 6 vezes: (1) atravessar uma escada horizontal (100 cm de comprimento, 3 cm entre os degraus), (2) atravessar obstáculos (barreiras de 5 a 21 cm de altura), (3) atravessar uma gangorra, (4) andar sobre uma barra estreita (90cm de comprimento e 10 cm de largura) e (5) andar sobre uma corda suspensa (100 cm de comprimento e 5 cm de largura). A cada 3 semanas o circuito era modificado/dificultado afim de fornecer desafios motores continuamente [97].

Treino Combinado

As sessões de treinamento combinado consistiram em 6 min de treinamento aeróbio, 6 min de treinamento acrobático e 6 min de treinamento de resistência. A dificuldade aumentou no protocolo combinado da mesma maneira que anteriormente descrita individualmente acima[10, 95, 97]. O teste do VO_2 e o de uma repetição máxima foram determinados da mesma forma como descrito acima nos protocolos aeróbico e força.

4.1.2.3 Paradigma de memória: Teste de esquiva inibitória

O teste da esquiva inibitória foi realizado conforme descrito previamente no subitem 4.1.1.2 dos materiais e métodos desta tese.

4.1.2.4. Preparação das amostras

Todos os ratos foram eutanasiados por decapitação 1 hora após a última sessão de exercícios. O hipocampo foi rapidamente dissecado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e depois armazenado a $-80^{\circ}C$ até os ensaios bioquímicos.

4.1.2.5 Imunoprecipitação da cromatina

Para avaliar a associação entre a acetilação e metilação das histonas na região promotora do gene *Bdnf*, *Cfos* e *Dnmt3a* foi empregada a técnica de imunoprecipitação da cromatina[98].

Resumidamente, as amostras de hipocampo (n=4-5) foram fixadas em formaldeído 1% por 8 minutos em temperatura ambiente. A fixação foi interrompida pela adição de glicina 2M, e o tecido foi lavado 5 vezes com PBS gelado e inibidor de proteases.

A cromatina foi solubilizada e extraída usando tampões de lise; o tecido fixado homogeneizado com tampão de lise celular (10 Mm Tris, 10 Mm NaCl e 0,2% NP-40). O homogeneizado foi centrifugado a 5500xg por 5 minutos, o sobrenadante descartado, e o pellet foi solubilizado com o tampão de lise nuclear (ChIP kit number 17-295; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY).

Em seguida, o extrato de cromatina foi submetido à sonicação (Bioruptor (Diagenode®) de 20-35 ciclos, 30s on/off em alta potência), gerando fragmentos de DNA de 100 pb. Após a fragmentação, a densidade óptica de cada amostra foi determinada e quantidades iguais de lisado de cromatina (60µg) foram diluídos em um tampão RIPA (1M TRIS HCl, 5M de NaCl, 0.5M de EDTA, NP40, 10% SDS) até o volume de 1 ml.

A solução de cromatina já fragmentada foi incubada overnight com grânulos magnéticos (SureBeads™ catálogo 161-4823 da BIORAD®) associados aos anticorpos anti-histona H3K9ac, H4H8ac, H3K9me2 e H3K4me3 (Abcam®). Os grânulos foram lavados com tampão de alto e baixo teor de sal, tampão de LiCl e tampão de eluição no qual foram separados dos grânulos magnéticos após 4h a 65°C. O DNA associado às histonas acetiladas foi purificado com kit comercial (Qiaquick PCR purification kit, catálogo 28104 da Qiagen®).

Quantificação do DNA por PCRq em tempo real

Os níveis da acetilação e metilação de histonas em cada promotor de interesse foram determinados usando a quantidade de histonas acetiladas associadas ao DNA por PCRq em tempo real (ABI Prism 7700; Applied Biosystems, Foster City, CA). Para amplificar as regiões promotoras utilizamos os primers do *Bdnf* (Forward GGCAGTTGGACAGTCATTGG Reverse – GGGCGATCCACTGAGCAAAG), *Fos* (Forward CCGACTCCTTCTCCAGCATG G Reverse –

GCGGCAGGTTTACTCTGAGT) e *Dnmt3a* (Forward TGGTGCCAGGAAAGGAAAGReverse – TGAGGCACCAATCTGAACCC). O imunoprecipitado de DNA amplificado, correu em triplicata na presença de SYBR-Green (Applied Biosystems). Os valores de limiar de ciclo (Ct) de cada amostra foram obtidos usando o software Sequence Detector 1.1. A quantificação relativa de modelo de DNA foi realizada como descrito anteriormente por Gupta et al. (2012) [99] e pelo Manual Applied Biosystems com adaptações.

4.1.2.6 Análise Estatística

Todos os dados foram avaliados de acordo com a homogeneidade e normalidade após o teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene. A influência da idade no paradigma de esquia inibitória e nos marcadores epigenéticos foi avaliada pelo teste t de Student, que comparou apenas animais sedentários adultos e envelhecidos. Os efeitos das modalidades de exercício sobre o paradigma de esquia inibitória e os marcadores epigenéticos foram avaliados pela ANOVA de uma via. Em todos os testes, $p \leq 0,05$ foi considerado como indicador de significância estatística.

5. Capítulo 1:

Treadmill exercise induces selective changes in hippocampal histone acetylation during the aging process in rats

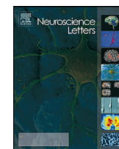
Neuroscience Letters 634: 19-24.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.008>



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Research article

Treadmill exercise induces selective changes in hippocampal histone acetylation during the aging process in rats



Louisiana Carolina Ferreira de Meireles^a, Karine Bertoldi^a, Laura Reck Cechinel^a,
Bruna Luisa Schallenger^c, Vanessa Kappel da Silva^b, Nadja Schröder^b,
Ionara Rodrigues Siqueira^{a,c,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

H I G H L I G H T S

- Exercise improved aversive memory retention.
- H4K12 acetylation levels increased in hippocampi of all exercised animals.
- Exercise increased H3K9 acetylation levels only in hippocampi of aged rats.

A R T I C L E I N F O

Article history:

Received 1 July 2016

Received in revised form

26 September 2016

Accepted 2 October 2016

Available online 4 October 2016

Keywords:

Hippocampus

Exercise

Histone acetylation

Memory

Aging

Rats

A B S T R A C T

Physical exercise and the aging process have been shown to induce opposite effects on epigenetic marks, such as histone acetylation. The impact of exercise on hippocampal histone acetylation on specific lysine residues, especially during the aging process, is rarely studied. The aim of this study was to investigate the effect of treadmill exercise (20 min/day during 2 weeks) on H3K9, H4K5 and H4K12 acetylation levels in hippocampi of young adult and aged rats. Male Wistar rats aged 3 or 20–21 months were assigned to sedentary and exercise groups. Single-trial step-down inhibitory avoidance conditioning was employed as an aversive memory paradigm. Hippocampal H3K9, H4K5 and H4K12 acetylation was determined by Western blotting. The daily moderate exercise protocol improved the aversive memory performance and increased hippocampal H4K12 acetylation levels in both tested ages. Exercise was also able to increase H3K9 acetylation levels in aged rats. An age-related decline in memory performance was observed, without any effect of the aging process on histone acetylation state. Our data suggest that treadmill exercise can impact hippocampal the histone acetylation profile in an age- and lysine-dependent manner. In addition, higher hippocampal H4K12 acetylation levels at both ages may be related to improvement of aversive memory performance.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A growing body of evidence suggests that moderate exercise is able to impact brain functions such as cognition, learning and memory performance, and cognitive decline in aging [4,25,26]. Epigenetic modifications, specifically global histone acetylation and

histone-modifying enzymes, have been linked to exercise effects on memory performance in rodent models. The histone acetylation corresponds to acetyl groups attached to lysine (K) residues on the amino-terminal tails of histones (H) and has been widely associated with enhanced transcriptional activity [2,17]. A single session of exercise (20 min) increased histone acetylase enzyme (HAT) (the enzyme that adds acetyl groups to histones) and decreased histone deacetylase enzyme (HDAC) (the enzyme that removes acetyl groups) activity immediately and one hour after exercise in the rat hippocampus [14]. Additionally, voluntary exercise protocols have induced changes in HDAC activity [1,16]. A previous study indicated that a moderate daily exercise protocol (20 min/day during 2 weeks) improved transiently aversive memory performance, (eval-

* Corresponding author at: Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: ionara@ufrgs.br (I.R. Siqueira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.008>

0304-3940/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

uated by an inhibitory avoidance test) and concomitantly reversed age-induced decreases of hippocampal global H4 [22]. Despite these findings, exercise effects on specific lysine modifications in rodent hippocampi are rarely investigated [12,15].

Another remarkable point is the fact that aversive learning context exposure in different fear-motivated learning tasks can alter epigenetic marks, suggesting that the influence of the learning paradigm on acetylation levels should be considered. Interestingly, a training session of fear conditioning was able to alter hippocampal global acetylation of H2B, H3 and H4 [6,20] as well as specific lysine, such as H4K12, H3K9, H3K14, H4K5 and H4K8 in young adult rodents, while H4K12 acetylation state was unchanged in aged hippocampus [9,24]. The authors suggested that the lack of this specific acetylation during the acquisition stage can be related to age-dependent memory impairment [24]. In addition, it has been observed that exposure to a memory paradigm, including the test session, is able to alter H3K14 acetylation in the hippocampus of young adult rats [12]. However, little is known regarding its contribution to aversive memory consolidation in the aging process.

Despite the growing body of evidence describing the effects of exercise, the aging process and exposure to the aversive memory paradigm on epigenetic parameters [10,19], there are few studies evaluating the interaction among these factors, particularly histone acetylation on specific lysine residues, in brain areas. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of a treadmill exercise protocol (20 min/day during 2 weeks) on histone acetylation levels on specific lysine residues, such as H3K9, H4K5 and H4K12, in hippocampi of 3 or 20–21-month-old Wistar rats. We asked whether exercise and aging effects are differentially modified by exposure to an inhibitory avoidance task.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats aged 3 and 20–21 months old were used and maintained under standard conditions (12-h light/dark, 22°C ± 2°C) with food and water *ad libitum*. Animals were provided by Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and housed five per cage (Plexiglass cages, dimensions: 40 × 33.3 × 17 cm). The NIH "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication No. 80-23, revised 1996) was followed in all experiments and the Local Ethics Committee approved all handling and experimental conditions (nr. 23997).

2.2. Exercise protocol

Rats were randomly divided into a sedentary (SED) or exercised (EXE) groups (n = 10–12; Fig. 1). The SED group animals was handled exactly as the EXE group and left on the treadmill while it was not operating for 5 min. The exercise training was performed on a motorized rodent treadmill (AVS Projetos, São Paulo, Brazil) with individual Plexiglas lanes. The peak oxygen uptake (VO₂) was indirectly measured in all animals prior to training.

Each rat ran on a treadmill at a low initial speed, and the speed was increased at a rate of 5 m/min every 3 min until the point of exhaustion (g, failure of the rat to continue running). The time to fatigue (in min) and workload (in m/min) were obtained as indices of exercise capacity, which, in turn, were taken as VO₂max [3,8]. The animals initially refusing to run were encouraged by gently tapping on their backs.

The exercise training consisted of running sessions at 60% of VO₂max. The rats were subjected to one 20-min running session daily for 2 weeks. Treadmill velocity progression is represented in

Table 1. In the first two sessions, rats were adapted to the treadmill. Neither electric shock nor physical prodding were used in this study. All of the procedures took place between 02:00 P.M. and 05:00 P.M.

2.3. Inhibitory avoidance

The animals were exposed or not exposed to an inhibitory avoidance task. We used single-trial step-down inhibitory avoidance conditioning as a model of fear-motivated memory. At step-down inhibitory avoidance training, the animals learned to associate a location in the training apparatus (a grid floor) with an aversive stimulus (footshock). In the training trial, rats were placed on a platform and immediately after stepping down on the grid received a 0.6 mA, 3.0 s footshock prior to removal from the apparatus. The test trial took place 24 h after the training trial, the rats were exposed to the platform and no footshock was delivered; latencies to step down were recorded and used as a measure of memory retention. Retention test latencies measurements were cut off at 180 s. The exercised and exposed to learning context groups, were subjected to inhibitory avoidance test session 30 min after the last exercise session and 30 min before euthanasia. The general procedures for inhibitory avoidance behavioral training and the retention test were described in a previous report [21,22].

2.4. Preparation of the samples

Rats were sacrificed by decapitation 1 h after the last training session of exercise. It has been demonstrated that our exercise protocol improved aversive memory performance as well as hippocampal global H4 at 1 h after the last training session of exercise, and the behavioral test was performed 30 min before euthanasia [22]. Hippocampi were quickly dissected, immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until the histone extraction. The hippocampi were homogenized (n = 5), placed in EDTA-free (Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil) solution 1 × containing a protease inhibitor cocktail tablet, and stored at –80 °C for subsequent analysis. Histones were extracted as previously described [11]. Briefly, PBS buffer (Phosphate-Buffered-Saline) containing 250 μL Triton and 10 mg Na₃N was added to the homogenated samples to a 50 mL final volume. After 10 min on ice, samples were centrifuged at 6500g for 10 min at 4 °C. The supernatant was removed, and the pellet was collected. An equal volume of 0.2N HCl was added, and acid extraction of histones was carried out over night at 4 °C. The next day, samples were centrifuged at 6500g for 10 min at 4 °C, and this histone extract was stored at –80 °C. The protein concentration of each sample was measured using the Coomassie Blue method, and bovine serum albumin was used as a standard [7].

2.5. Western blot analysis

Twenty-five μg of total protein was separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% non fat dry milk in TBS containing 0.05% Tween-20 and were incubated overnight with the following antibodies: anti-β-actin (ab8227, Abcam) at 1:1500, anti-acetyl histone H3 (Lys-9, ab10812, Abcam) at 1:500, anti-acetyl histone H4 (Lys-5, K5, ab51997, Abcam) at 1:700, and anti-acetyl histone H4 (Lys-12, K12, ab61238, Abcam) at 1:700. Goat anti-rabbit (ab6721, HRP) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used and detected using the ECL Western Blotting Substrate Kit (ab65628, Abcam, EUA). Pre-stained molecular weight protein markers (Benchmark marker, Invitrogen) were used to determine the molecular weight of the detected bands and confirm antibodies target specificity. Quantification was performed using a Kodak Gel Logic 2200 Imaging

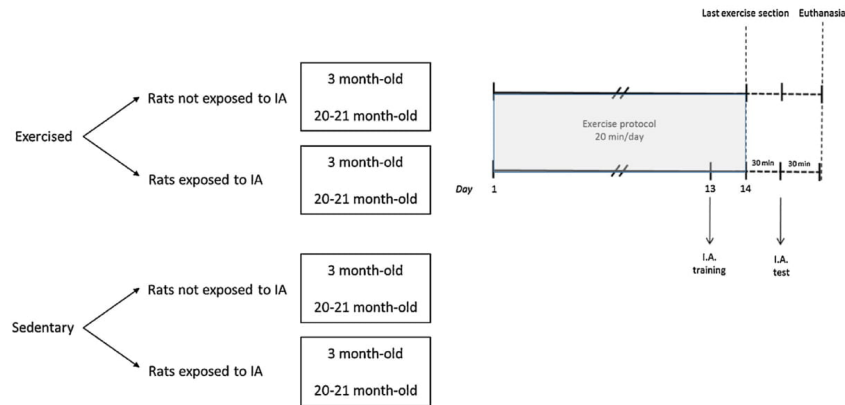


Fig. 1. Experimental Design.

Table 1

Velocities progression in time during adaptation period (1–2 days) and training protocol (3–14 days) in 3 and 20–21-month-old Wistar rats.

	1–2 min VO ₂ max 40%	2–6 min VO ₂ max 50%	6–14 min VO ₂ max 60%	14–18 min VO ₂ max 50%	18–20 min VO ₂ max 40%
Adaptation period (1–2 days) 3 month-old rats	7 m/min	8.6 m/min	10.4 m/min	8.6 m/min	7 m/min
Adaptation period (1–2 days) 20–21 month-old rats	5.86 m/min	7.34 m/min	8.8 m/min	7.34 m/min	5.86 m/min
Training protocol (3–14 days) 3 month-old rats	1–4 min VO ₂ max 40% 7 m/min	4–16 min 10.4 m/min	VO ₂ max 60%		1–4 min VO ₂ max 40% 7 m/min
Training protocol (3–14 days) 20–21 month-old rats	5.86 m/min	8.8 m/min			5.86 m/min

system. Total protein levels were normalized according to each sample's β -actin protein level.

2.6. Statistical analysis

The results of ratios between acetylated H3K9, H4K5, H4K12, and β -actin protein levels were expressed as a percentage of control and analyzed using three-way analysis of variance (ANOVA) with age, exercise and exposure to inhibitory avoidance as factors. The results of the inhibitory avoidance test were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) with age and exercise as factors. In all tests, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

Our work investigated the interaction between exercise, the aging process and exposure to memory paradigms on hippocampal histone acetylation markers. A moderate treadmill exercise protocol (20 min/day during 2 weeks) improved aversive memory performance in the inhibitory avoidance paradigm in both tested ages of young (3 months old) and aged (20–21 months old) Wistar rats. Latencies to step down from the platform during the test session of inhibitory avoidance are presented in Fig. 2. As expected, aged rats exhibited a worse performance in the inhibitory avoidance paradigm ($F_{(1;60)} = 8680$; $p < 0.005$), and exercise was able

to improve the step down latency in both ages ($F_{(1;60)} = 39.632$; $p < 0.0001$).

We also evaluated the effects of exercise on histone acetylation levels on specific lysine residues in hippocampi of rats. H4K12 acetylation levels are illustrated in Fig. 3. Three-way ANOVA revealed a significant effect of exercise, given that there was an increase of H4K12 levels in all exercised groups ($F_{(1,27)} = 9.201$; $p = 0.006$).

Fig. 4 highlights the hippocampal H3K9 acetylation levels. Three-way ANOVA showed the effect of exercise ($F_{(1,29)} = 7.460$; $p = 0.012$) and a significant interaction between exercise and age ($F_{(1,29)} = 4.785$; $p = 0.039$). Forced exercise increased H3K9 acetylation in 21-month-old rats comparing to respective sedentary groups (Tukey posthoc; $p = 0.04$) without any effect in young groups. H4K5 acetylation levels were unchanged (data not shown).

Neither age nor exposure to the learning context *per se* showed any effect on hippocampal histone specific acetylation.

4. Discussion

Our study indicates that a daily moderate exercise protocol can impact hippocampal histone specific acetylation in an age and lysine-dependent manner in rats. Forced exercise was able to improve the step down latency in the inhibitory avoidance task and concomitantly increased hippocampal H4K12 acetylation levels in

both young adult and aged rats. This is an important finding considering that hippocampal H4K12 acetylation seems to be essential for the expression of genes related to memory formation such as Formin 2 [24].

Another remarkable result is the age-dependent effect of forced exercise on H3K9 acetylation levels, since increased hippocampal H3K9 acetylation in aged groups was observed without any change to levels in young adult animals. Interestingly, Elsner et al. showed that our exercise protocol decreased H3K9 methylation only in 3-month old rats with no effects in 20-month-old animals [15]. Taken together, these data suggest that exercise impacts H3K9 epigenetic profiles in an age-dependent manner. H3K9 acetylation has been described as an important epigenetic mark involved with neuronal gene expression.

Previous studies with voluntary exercise protocols observed increases in H3 global and specific lysine residue (H3K9 and H3K14) acetylation and memory-related gene expression, such as Calbindin (Calb1) and BDNF in brain structures [1,10]. In addition, forced aerobic exercise, such as swimming, improved memory impairment induced by isoflurane by enhancing histone acetylation levels, such as H3K9 [29]. Taken together, it is possible to infer that increases in H3K9 acetylation observed in aged and exercised rats could reflect enhances in gene transcription.

Furthermore, H3K9 acetylation has been linked to inflammatory pathways. Soliman and colleagues described the role of H3K9 acetylation in neuroprotection after brain inflammation models [28], since acetate supplementation reversed lipopolysaccharides (LPS) effects by increasing H3K9 acetylation in primary mouse astroglial cultures. We suggest that increases in H3K9 acetylation induced by forced exercise (20 min/day during 2 weeks) in 20–21-month-old rats may be associated with previous findings describing the modulation of pro-inflammatory markers in aged hippocampi [22].

Interestingly, most of the experimental studies on the epigenetic effects of exercise have used voluntary protocols, despite the fact that forced exercise is more comparable to human exercise [27]. Either forced or voluntary protocols are able to alter epigenetic mechanisms and produce some differences in the acetylation profile of specific lysine residues.

Intlekofer et al. suggested that H4K12 acetylation is not involved in the benefits of voluntary exercise on non-reinforced hippocampal-dependent learning, specifically an object location memory task in young adult mice [18]. On the other hand, forced exercise improved performance in a negatively motivated hippocampal-dependent paradigm and an inhibitory avoidance task, concomitantly increasing H4K12 acetylation levels in all studied ages. Taken together, these studies indicate that forced and voluntary exercises impact H4K12 acetylation differently. In addition, we can infer that forced exercise is more effective than voluntary exercise in the aging process, since a lower degree of acetylation at H4K12 has been linked to impairment in memory consolidation of aged rodent [24].

Considering that hippocampal H3K9, H4K5 and H4K12 acetylation levels were not changed by exposure to learning context (training and test sessions), it is possible to infer that these epigenetic marks are not primarily required in the consolidation phase of inhibitory avoidance memories and that inhibitory avoidance paradigm-induced alteration of epigenetic parameters is mainly on the H3K14 acetylation status [12]. In accordance, Blank et al. also did not observe changes in hippocampal H3K9 and H3K14 acetylation levels after training and retention sessions of an inhibitory avoidance paradigm [5]. Changes in hippocampal histone acetylation levels on specific lysine residues during the acquisition phase in aversive memory have been described [9,24].

An important point of discussion is the role of histone acetylation during the aging process. Previously, an increase in HDAC activity in hippocampi of aged rats was described [13], which is

consistent with a decrease in global H4 acetylation in hippocampi of 20-month-old rats [22]. Moreover, the impairment in aversive memory performance in aged rats was related to reduced global H4 acetylation levels [22]. Conversely, in the current study, H3K9, H4K5 and H4K12 acetylation levels were not significantly altered by aging. Taken together, it is possible to infer that aging-induced effects on global H4 acetylation levels and memory performance might be related to other specific lysines, such as H4K8 and H4K16.

Recently, hippocampal H4K5 acetylation was linked to memory formation after contextual fear conditioning [23]. However, we did not find any difference in H4K5 acetylation. This disagreement may be related to differences in fear-motivated learning tasks and different time-points in which the hippocampi were collected. In our work, hippocampi were collected 30 min after the inhibitory avoidance test, while Park et al. collected the samples one hour after fear conditioning training and after re-exposure to the context on day 3.

In summary, our data revealed that a forced exercise protocol is able to increase hippocampal histone specific acetylation in a lysine- and age-dependent manner because exercise-induced increases in H4K12 acetylation were observed in all tested groups and H3K9 acetylation levels changed exclusively in aged rats. Exercise-induced improvement of aversive memory retention may be related to changes in hippocampal H4K12 acetylation. Further studies are needed to elucidate the relationship between these epigenetic modifications and physiological effects induced by exercise, especially during the aging process.

Acknowledgments

This work was supported, in part, by grant 476634/2013-0 from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq/Brazil. CNPq fellowships (Dr. I.R. Siqueira; L.C.F. Meireles, K. Bertoldi, L. R. Cechinel and B. L. Schallenger);

References

- [1] J.L. Abel, E.F. Rissman, Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain, *Int. J. Dev. Neurosci.* 31 (2013) 382–390.
- [2] S. Akbarian, M. Beer, V. Haroutunian, Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition, *JAMA Neurol.* 70 (2013) 711–718.
- [3] R.M. Arida, F.A. Scorza, N.F. dos Santos, C.A. Peres, E.A. Cavalheiro, Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats, *Epilepsy Res.* 37 (1999) 45–52.
- [4] N.C. Berchtold, N. Castello, C.W. Cotman, Exercise and time-dependent benefits to learning and memory, *Neuroscience* 167 (2010) 588–597.
- [5] M. Blank, A. Werenicz, L.A. Velho, D.F. Pinto, A.C. Fedi, M.W. Lopes, T.V. Peres, R.B. Leal, A.S. Dornelles, R. Roesler, Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats, *Neurosci. Lett.* 594 (2015) 76–81.
- [6] O. Bousiges, R. Neidl, M. Majchrzak, M.-A. Müller, A. Barbelivien, A.P. d. Vasconcelos, A. Schneider, J.-P. Loeffler, J.-C. Cassel, A.-L. Bouillier, Detection of histone acetylation levels in the dorsal hippocampus reveals early tagging on specific residues of H2B and H4 histones in response to learning, *PLoS One* 8 (2013).
- [7] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 7 (1976) 248–254.
- [8] G.A. Brooks, T.P. White, Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise, *J. Appl. Physiol.* 45 (1978) 1009–1015.
- [9] W.B. Chwang, K.J. O'Riordan, J.M. Levenson, J.D. Sweatt, ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning, *Learn. Mem.* 13 (2006) 322–328.
- [10] A. Collins, L.E. Hill, Y. Chandramohan, D. Whitcomb, S.K. Droste, J.M.H.M. Reul, Exercise improves cognitive responses to psychological stress through enhancement of epigenetic mechanisms and gene expression in the dentate gyrus, *PLoS One* 4 (2009) 4330.
- [11] P.F. da Silva, V.A. Garcia, A.d.S. Dornelles, V.K. da Silva, N. Maurmann, B.C.D. Portal, R.D.P. Ferreira, F.C. Piazza, R. Roesler, N. Schröder, Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate, *Neuroscience* 200 (2012) 42–49.
- [12] L.C.F. de Meireles, K. Bertoldi, V.R. Elsner, F.d.S. Moysés, I.R. Siqueira, Treadmill exercise alters histone acetylation differently in rats exposed or not exposed to aversive learning context, *Neurobiol. Learn. Mem.* 116 (2014) 193–196.

- [13] G. dos Santos Sant' Anna, V. Rostirola Elsner, F. Moysés, L. Reck Cechinel, G. Agustini Lovatel, I. Rodrigues Siqueira, Histone deacetylase activity is altered in brain areas from aged rats, *Neurosci. Lett.* 556 (2013) 152–154.
- [14] V.R. Elsner, G.A. Lovatel, K. Bertoldi, C. Vanzella, F.M. Santos, C. Spindler, E.F. de Almeida, P. Nardin, I.R. Siqueira, Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus, *Neuroscience* 192 (2011) 580–587.
- [15] V.R. Elsner, G.A. Lovatel, F. Moysés, K. Bertoldi, C. Spindler, L.R. Cechinel, A.R. Muotri, I.R. Siqueira, Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study, *Exp. Gerontol.* 48 (2013) 136–139.
- [16] F. Gómez-Pinilla, Z. Ying, R.R. Roy, R. Molteni, V.R. Edgerton, Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity, *AJP – JN Physiol.* 88 (2002) 2187–2195.
- [17] J. Gräff, I.M. Mansuy, Epigenetic codes in cognition and behaviour, *Behav. Brain Res.* 192 (2008) 70–87.
- [18] K.A. Intlekofer, N.C. Berchtold, M. Malvaez, A.J. Carlos, S.C. McQuown, M.J. Cunningham, M.A. Wood, C.W. Cotman, Exercise and sodium butyrate transform a sub-threshold learning event into long-term memory via a BDNF-dependent mechanism, *Neuropsychopharmacology* 104 (2013), aop1038/npp.2013.
- [19] K.A. Intlekofer, C.W. Cotman, Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease, *Neurobiol. Dis.* 57 (2012).
- [20] J.M. Levenson, K.J. O'Riordan, K.D. Brown, M.A. Trinh, D.L. Molfese, J.D. Sweatt, Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 14.
- [21] G.A. Lovatel, K. Bertoldi, V.R. Elsner, C. Vanzella, F.d.S. Moysés, C. Spindler, V.R. Funck, L.M. Pereira, C.V. de Oliveira, M.S. Oliveira, C.A. Netto, I.R. Siqueira, Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function, *Neurobiol. Learn. Mem.* 98 (2012).
- [22] G.A. Lovatel, V.R. Elsner, K. Bertoldi, C. Vanzella, F.d.S. Moysés, A. Vizuete, C. Spindler, L.R. Cechinel, C.A. Netto, A.R. Muotri, I.R. Siqueira, Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus, *Neurobiol. Learn. Mem.* 101 (2013) 94–102.
- [23] C.S. Park, H. Rehrauer, I.M. Mansuy, Genome-wide analysis of H4K5 acetylation associated with fear memory in mice, *BMC Genomics* 14 (2013).
- [24] S. Peleg, F. Sananbenesi, A. Zovoilis, S. Burkhardt, S. Bahari-Javan, R.C. Agis-Balboa, P. Cota, J.L. Wittnam, A. Gogol-Doering, L. Opitz, G. Salinas-Riester, M. Dettenhofer, H. Kan, L. Farinelli, W. Chen, A. Fischer, Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice, *Science* 328 (2010) 753–756.
- [25] H.v. Praag, T. Shubert, C. Zhao, F.H. Gage, Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice, *J. Neurosci.* 25 (2005) 8680–8685.
- [26] Z. Radak, T. Kanelo, S. Tahara, H. Nakamoto, J. Pucsek, M. Sasvari, C. Nyakase, S. Goto, Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain, *Neurochem. Int.* 38 (2001) 17–23.
- [27] Z. Radak, A. Toldy, Z. Szabo, S. Siamilis, C. Nyakas, G. Silye, J. Jakus, S. Goto, The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain, *Neurochem. Int.* 49 (2006) 387–392.
- [28] M.L. Soliman, C.K. Combs, T.A. Rosenberger, Modulation of inflammatory cytokines and mitogen-activated protein kinases by acetate in primary astrocytes, *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8 (2013) 287–300.
- [29] T. Zhong, F. Ren, C.S. Huang, W.Y. Zou, Y. Yang, Y.D. Pan, B. Sun, E. Wang, Q.L. Guo, Swimming exercise ameliorates neurocognitive impairment induced by neonatal exposure to isoflurane and enhances hippocampal histone acetylation in mice, *Neuroscience* 316 (2016) 378–388.

6. Capítulo 2

Effects of exercise modalities on memory performance and hippocampal epigenetic marks at *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a* genes during aging

Submetido à revista *Neurobiology of Aging* em 07/03/18

Effects of exercise modalities on memory performance and hippocampal epigenetic marks at *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a* genes during aging

Louisiana Carolina Ferreira de Meireles^a, Fernando Galvão Jr.^a, Deena M. Walker^b, Laura Reck Cechinel^a, Ágnis Iohana de Souza Grefenhagen^c, Gisele Andrade^d, Roberta Passos Palazzo^d, Carla Giovanna Basso^a, Gisele Agustini Lovateli^e, Eric J. Nestler^b, Ionara Rodrigues Siqueira^{a,c,d}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^bDepartment of Neuroscience and Friedman Brain Institute; Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, United States of America

^cDepartamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^dPrograma de Pós Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^eDepartamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Santa Catarina, Araranguá, Santa Catarina, Brazil

*Corresponding author: Ionara Rodrigues Siqueira. Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel Fax: +55 51 3308 3121; e-mail: ionara@ufrgs.br.

Abstract

We aimed to investigate the effects of different exercise modalities on aversive memory and epigenetic landscapes at *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a* gene promoters in hippocampus of rats. Young adult and aged male Wistar rats were subjected to aerobic, acrobatic, resistance or combined exercise modalities (3 times a week, 20 min/day) for 12 weeks. Aging was associated with altered histone modifications at the promoters of *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a*. Aerobic, acrobatic and combined modalities improved aversive memory performance in young adult and aged rats. Moreover, these modalities altered hippocampal epigenetic marks, particularly H3K9ac or H3K4me3, at the *cFos* promoter of aged animals. Aerobic and resistance modalities partially reversed age-induced increases in H3K4me3 at the *Bdnf* promoter. Resistance and combined modalities changed H4K8ac at the *Dnmt3a* promoter in young adult rats. Our results provide new insight by providing a biological mechanism which supports the utility of exercise modalities to attenuate memory deficits during aging.

Keywords

Exercise; rats; aversive memory; histone methylation, histone acetylation; epigenetic marks.

1. Introduction

It is well established that aged individuals are more likely to suffer memory impairments. Clinical research showed that physiological aging typically affects specific cognitive abilities such as spatial memory, working memory, reaction time and long-term memory (Hansen and Zhang, 2013; Podtelezchnikov et al., 2011). Age-related cognitive deficits have been observed in pre-clinical studies using animal models including rodents and non-human primates (Barreto et al., 2010; Comrie et al., 2018; Lovatel et al., 2013; McQuail et al., 2016).

The American Heart Association and American College of Sports Medicine recommend a combination of aerobic, resistance and balance exercise be prescribed for elderly patients as it has been shown to contribute to a healthy and independent lifestyle and improve functional capacity as well as cognitive performance (Chodzko-Zajko et al., 2009; Nelson et al., 2007). Beneficial effects of physical exercise on memory in aged populations have been reported (Nouchi et al., 2014; Segal et al., 2012; Suzuki et al., 2012), but studies investigating the impact of combined exercise modalities on age-related cognitive impairments in rodents are rare. Instead, most experimental work evaluating combination of exercise modalities have focused on metabolic and skeletal muscle modifications in young adult (YA) rats (Ogasawara et al., 2014; Shen et al., 2015). The effect of combined modality on memory performance and its mechanism of action are rarely studied (Zarrinkalam et al., 2016), especially on age-related deficits.

Animal models are widely used to understand the neurobiological mechanisms through which exercise protects and restores brain function independent of aging. In this context, different exercise modalities were able to improve memory in rodents (Berchtold et al., 2010; Cassilhas et al., 2012a; Cotman and Berchtold, 2002). In YA rats, 8 weeks of progressive resistance exercise improved aversive memory and increased peripheral and hippocampal IGF-1 levels (Cassilhas et al., 2012a). Another exercise modality, namely, acrobatic (which is similar to balance training in humans), induced axonal remodeling and synaptogenesis in motor cortex, cerebellum and

striatum (Salame et al., 2016; Tamakoshi et al., 2014). However, there are few studies investigating resistance or acrobatic exercise effects in memory tasks using animal models during aging. To our knowledge, only aerobic modalities have been studied in aging models. Previous data indicate that 2 weeks of a moderate aerobic protocol reversed age-induced memory impairments, and regulated the inflammatory profile related to aging in hippocampus, decreasing pro-inflammatory cytokines and increasing anti-inflammatory cascades (Lovatel et al., 2013). Additionally, this protocol increased global histone H4 acetylation levels and acetylation of specific lysine residues (H4K12 and H3K9) in hippocampi of 20-21 month-old Wistar rats when compared to non-exercised controls (de Meireles et al., 2016; Lovatel et al., 2013).

Epigenetic mechanisms, specifically histone modifications, have been proposed as modulators of the protective effects of exercise on memory. Aerobic exercise induced hippocampal H3 acetylation at Brain Derived Neurotrophic Factor (*Bdnf*) gene promoter of 3 month-old rats, a crucial gene for learning, memory and synaptic plasticity (Gomez-Pinilla et al., 2011). Although the epigenetic mechanisms have not been investigated, resistance and acrobatic exercise increased *Bdnf* expression in the hippocampus (Klintsova et al., 2004; Novaes Gomes et al., 2014). However, there is a dearth of information regarding the epigenetic modulation exerted by exercise modalities in the aging hippocampus.

Taken together, the aim of this study was to investigate the potential protective effects of different exercise modalities, aerobic, resistance, acrobatic and their combination, on age-related declines in aversive memory and identify exercise-induced epigenetic mechanisms, specifically histone modifications, associated with aging and the protective effects of exercise within the hippocampus. We have focused on the promoter regions of three genes important for synaptic plasticity, neuronal activity and neuronal development: *Bdnf*, *cFos* and DNA methyltransferase 3a (*Dnmt3a*) (Bayraktar and Kreutz, 2017; Kitraki et al., 1993).

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Male *Wistar* (n=76) rats aged 2 and 22 months were maintained under standard conditions (12-h light/dark, 22 C±2°C), with food and water *ad libitum*. Animals were provided by the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and housed three per cage (Plexiglass cages, dimensions: 40 x 33.3 x 17 cm). The NIH "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication No. 80–23, revised 1996) was followed in all experiments. The Local Ethics Committee approved all handling and experimental conditions (nr. 29818).

2.2 Exercise Protocols

Rats were randomly divided into five groups (n= 6-9): sedentary, aerobic, acrobatic, resistance and combined. Experimental groups, except sedentary, were subjected to 20-minute exercise sessions for 12 weeks (Experimental Design in Figure 1). Animals were habituated to each exercise modality by exposure to the different exercise apparatus for 1 week prior to exercise protocol commenced. Sedentary animals were exposed to "sham" exercise protocols in that they were placed on a non-functional treadmill, acrobatic or resistance apparatus. Neither electric shock nor physical prodding were used in this study. All the procedures took place between 14:00 and 17:00 hr.

2.2.1 Aerobic protocol

Aerobic training was performed on a motorized rodent treadmill (AVS Projetos, São Paulo, Brazil) with individual Plexiglas lanes. The peak oxygen uptake (VO_2) was indirectly measured in all animals prior to training. Each rat ran on a treadmill at a low initial speed, and the speed was increased at a rate of 5 m/min every 3 minutes until the point of exhaustion (i.e., failure of the rat to continue running). The time to fatigue (in min) and workload (in m/min) were obtained as indices of exercise capacity, which, in turn, were taken as VO_{2max} (Arida et al., 1999; Brooks and White, 1978). The aerobic training consisted of running sessions at 60% of VO_{2max} (Lovatell et

al., 2013). The animals initially refusing to run were encouraged by gently tapping on their backs. VO_2 max was assessed every three weeks in order to increase treadmill speed according to the animal's adaptation to exercise, maintaining training at 60% of VO_2 max.

2.2.2 Acrobatic protocol

Acrobatic exercises were employed according to Jones et al. (Jones et al., 1999). Animals were required to complete five activities six times each: (1) transverse a horizontal ladder (100-cm of diameter, 3-cm spaced rungs), (2) walk through an obstacle course (barriers 5- to 21-cm-high), (3) cross a seesaw, (4) transverse a narrow bar (90-cm of diameter and 10 cm of width) and (5) transverse a rope (100-cm of diameter and 5-cm of width). The obstacles were changed, bars and rope were narrowed and the space between the rungs of the ladder was increased every three weeks in order to increase the training difficulty (Black et al., 1990).

2.2.3 Resistance protocol

Resistance exercise training was performed as adapted from Gil et al (2015), using a climbing ladder (height 1 m, inclination of 85 degrees), which was designed to make the rats ascend towards a dark chamber (20 x 20 x 20 cm) with weight attached to their tails. Animals scaled the ladder in series of 8 repetitions with weight attached to their tails, with 2 minutes of rest. The weight for training was determined using 1 RM (repetition maximum) test performed prior to training, animals climbed the ladder twice with 50% of their body weight attached to their tails. After successful completion of the task, 30 g were added for another trial (climbed ladder 2X + 2 minutes of rest). This was repeated until animals were unable to climb the ladder and the weight was recorded as the maximum overload. Animals started the experiment climbing with 50% of the maximum overload attached to their tails; every three weeks, 10% of the maximum overload was added, until they reached the maximum of 80% of the overload in the last 3 weeks (Gil and Kim, 2015).

2.2.4 Combined protocol

The training sessions consisted of 6 min of aerobic training, 6 min of acrobatic training and 6 min of resistance training. The difficulty increased in the combined protocol in the same manner as previously described individually above (Black et al., 1990; Gil and Kim, 2015; Lovatel et al., 2013). The VO_2 and the maximum overload were determined by the same tests used in the aerobic and resistance groups.

2.3. Memory Paradigm: Inhibitory Avoidance

We used single-trial step-down inhibitory avoidance conditioning as a model of fear-motivated memory in which the animals learned to associate a location in the training apparatus (a depressed area indicated by a grid floor) with an aversive stimulus (footshock). In the training trial, rats were placed on a platform and immediately after stepping down on the grid received a 0.6 mA, 3.0 second footshock prior to removal from the apparatus. The test trial took place 24 hours after the training trial, in which the rats were placed in the platform and no footshock was delivered; latencies to step down were recorded and used as a measure of memory retention. Retention test latencies measurements were cut off at 180 s. All animals were subjected to inhibitory avoidance test session 30 minutes after the last exercise session. The general procedures for inhibitory avoidance behavioral training and the retention test were described in a previous report (Lovatel et al., 2012; Lovatel et al., 2013).

2.4. Preparation of the Samples

All rats were euthanized by decapitation 1 hour after the last exercise session. The whole hippocampi were quickly dissected, immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C until the ChIP analysis.

2.5. Quantitative Chromatin Immunoprecipitation (qChIP)

ChIP analysis of the frozen hippocampus (n=4-5) was performed as previously described by Peña et al, 2017 (Peña et al., 2017) with minor modifications. Samples were cross-linked in 1% formaldehyde for 12 minutes at room temperature. The crosslinking reaction was stopped by adding glycine (2 M). Samples were homogenized in cold PBS with protease inhibitors (PIs),

incubated in cold cell lysis buffer (5 mM PIPES pH 8, 85 mM KCl, 0.5% NP40) with PIs, and sonicated in cold nuclear lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS) with PIs at 4°C for 30-40 cycles in a Bioruptor (Diagenode®) until average fragment size was 100-150 bp as assessed by BioAnalyzer (Agilent). Samples were frozen in aliquots at -80°C until immunoprecipitation. Histone modifications (acetylation and methylation) were assessed using the following antibodies from Abcam: anti-acetyl(ac) H3K9ac (15823), H4K8ac (15823), anti-methyl(me) H3K9me2 (1220) and H3K4me3 (8580). Mouse and Rabbit Isotype Control antibodies (37355 and 172730 respectively) were included as negative controls..

Magnetic beads (Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse/Rabbit IgG) were blocked (4% BSA in PBS) and incubated with antibody at 4°C for 6 hours. 1000 ng of chromatin from each sample was incubated with antibody-bead mix overnight (16 hours) for immunoprecipitation. Prior to antibody incubation, 10% aliquots were removed from each sample as input. Chromatin samples were then washed 1x each with low salt buffer (0.1% SDS, 1% TritonX100, 2 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8), high salt buffer (0.1% SDS, 1% TritonX100, 2 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8), LiCl buffer (150 mM LiCl, 1% NP40, 1% NaDOC, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8), and TE buffer + NaCl (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). Samples were then eluted in buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) and reverse crosslinked overnight at 65°C. After RNAse and proteinase K incubations, DNA was purified using the PCR Purification Kit (Qiagen® 28106) and stored at 4°C until qPCR analysis (Applied Biosystems QuantStudio®). Primers for qChIP (Integrated DNA technologies®) were designed using Primer Blast (NCBI) to amplify promoter regions (Table 1). qChIP results, including IgG controls, were calculated as percent of input. All antibodies showed significant enrichment over their comparable IgG control (Supplemental Data 1).

2.6. Statistical Analysis

All data were evaluated for normal distribution and homogeneity of variance using Kolmogorov-Smirnov and Levene test. The influence of age on inhibitory avoidance paradigm and epigenetic

markers was evaluated by Student's t-test comparing only sedentary adult and sedentary aged animals. The exercise modalities effects on inhibitory avoidance paradigm and epigenetic markers were evaluated by One-Way ANOVA and by Kurskal-Wallis test considering the distribution of variance. In all tests, $p \leq 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1 Exercise exerts modality-dependent effects on aversive memory.

First, baseline differences in YA vs aged sedentary controls was analyzed (Figure 2). Student's t-test revealed that aged rats underperformed in the inhibitory avoidance paradigm ($p=0.03$) compared to YA animals (Figure 2A). Given the age-related changes observed between control groups, we analyzed the effects of exercise modalities within YA and aged animals separately. One-way ANOVA showed a main effect of exercise modalities on step down latency in YA ($(F_{(4,41)} = 17.3; p < 0.0001)$) and aged ($(F_{(4,37)} = 3.851; p = 0.012)$) rats (Figures 2B and 2C). Dunnett's post-hoc analysis revealed that acrobatic ($p=0.005$ and $p=0.022$), aerobic ($p=0.002$ and $p=0.031$) and combined ($p < 0.001$ and $p=0.016$) exercise enhanced memory performance in YA rats and ameliorated the age-related deficiencies observed in aged rats compared to sedentary animals. The p-values refer to YA and aged rats, respectively.

3.2. Aging modulates epigenetic marks at the *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a* gene promoters in hippocampus.

We next evaluated the age-related alterations in histone modifications associated with 3 genes (*Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a*) important for brain development, synaptic plasticity and cognition (Bayraktar and Kreutz, 2017; Gómez-Pinilla et al., 2002 ; Kitraki et al., 1993) in the sedentary controls. Age-related changes were observed in histone methylation at *Bdnf* (Figure 3A), *cFos* (Figure 3B) and *Dnmt3a* (Figure 3C). Specifically, H3K4 trimethylation (H3K4me3) was decreased at the *cFos* promoter but increased ($p=0.007$) at the *Dnmt3a* and *Bdnf* promoters ($p=0.04$ and $p=0.001$) in aged vs YA animals. Age-related effects were observed for H3K9 dimethylation

(H3K9me2) at the *Bdnf* promoter ($p=0.05$). Fewer age-related effects were observed with regard to histone acetylation. While no effects were observed in H3K9 acetylation (H3K9ac), H4K8 acetylation (H4K8ac) was increased at the *Bdnf* promoter ($p=0.002$) and decreased at the *cFos* promoter ($p=0.01$) in aged animals.

3.3 Exercise modalities influenced H4K8ac and H3K4me3 at the *Bdnf* promoter in hippocampus in an age-dependent way.

We hypothesized that the protective effects of exercise in the aged animals would be associated with changes in histone modifications at the *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a* promoters. Therefore, we analyzed changes in histone modifications in hippocampus after exercise in the YA and aged animals separately. The tested exercise modalities altered epigenetic parameters at the *Bdnf* promoter in an age-specific manner (Fig. 4A and 4B). One-Way ANOVA showed the effect of exercise ($F_{(4;20)} = 4.43$; $p=0.013$); resistance ($p=0.029$), acrobatic ($p=0.039$) and aerobic ($p=0.027$) modalities increased H4K8ac in YA rats. Meanwhile, in aged animals, exercise modalities decreased H3K4me3 ($F_{(4;20)} = 12.014$; $p<0.0001$) in aerobic ($p=0.012$) and resistance ($p=0.012$) groups.

3.4. Exercise modalities influenced H3K9ac or H3K4me3 at the *cFos* promoter in hippocampus in an age-dependent way.

One-Way ANOVA demonstrated the effect of exercise on H3K9ac (Fig. 5A; $F_{(4;21)} = 5.17$; $p=0.008$) and H4K4me3 (Fig. 5B; $F_{(4;21)} = 3.92$; $p=0.018$) at the *cFos* promoter in a modality-dependent way only in aged rats. H3K9ac was induced in hippocampus by acrobatic ($p=0.04$) and by aerobic ($p=0.05$) protocols. Concurrently, acrobatic ($p=0.05$) and combined ($p=0.03$) increased H3K4me3 in this gene region.

3.5 Resistance and combined protocols decreased H4K8ac at the *Dnmt3a* promoter in hippocampus in an age-dependent way.

We observed an effect of exercise ($F_{(4,20)} = 4.517$; $p=0.014$) on H4K8ac at the *Dnmt3a* promoter in adult animals in a modality-dependent way (Figure 6). Resistance ($p=0.048$) and combined ($p=0.012$) groups exhibited lower H4K8ac levels in hippocampus compared to the sedentary group in YA animals. In contrast, there was no effect of exercise on aged animals.

4. Discussion

This study demonstrates that chronic moderate acrobatic, aerobic and combined exercise can alleviate age-related cognitive deficits in aversive memory performance. We also show, for the first time in the literature, that epigenetic regulation at three important genes for memory formation, *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a*, in the hippocampus is associated with this alleviation. In summary, our findings contribute to clinical research in the elderly population by providing a potential mechanism of action of exercise modalities.

Previous literature has shown that aerobic exercise, 20 min/day for 2 weeks, is capable of improving aversive memory in both YA and aged rats (Lovatel et al., 2013). Here we replicate and expand on those findings. Aerobic exercise as well as acrobatic and combined modalities were able to improve step down latency in the inhibitory avoidance task in YA and aged animals. Additionally, our findings demonstrate that similar effects on memory performance can be obtained with a long-term duration protocol of aerobic exercise, with different frequency of training (specifically 12 weeks, three times a week, 20 minutes). Previous reports in YA rodents observed the advantage of aerobic over acrobatic training on different memory paradigms, such as eye blink conditioning and water-escape motivated radial arm maze (Green et al., 2011; Lambert et al., 2005), findings that we did not find here. This difference may be due to the specific kind of memory evaluated.

It is possible to suggest that greater training frequencies are needed for resistance exercise-induced memory improvements, since here resistance exercise alone did not affect aversive memory in either YA or aged rats. Previous reports described that this modality 5 times a week

improved passive avoidance task and spatial memory performance in 3 month-old rats (Cassilhas et al., 2012a; Cassilhas et al., 2012b).

Although the American College of Sports and Medicine recommends a combination of exercise modalities for elderly populations to improve general health (Chodzko-Zajko et al., 2009), this is the first pre-clinical research supporting the prescription of combined modality exercise, using aerobic, acrobatic and resistance training, to improve memory function during aging. Combined modalities have been shown to improve cognition in YA rodents. Zarrinkalam et al (2016) compared endurance, resistance and combined exercise (resistance and endurance) and showed selective effects of these modalities on spatial and aversive memory in YA rats submitted to a morphine addiction model, which leads to memory impairment (Zarrinkalam et al., 2016). Here we show that our combined modality had improved measures of aversive memory in *both* ages, providing rational basis for the clinical recommendation during life span. In order to identify potential molecular mechanisms underlying the effects of aging and exercise, we examined histone modifications associated with the promoters of 3 genes related to learning and memory in the hippocampus (Bayraktar and Kreutz, 2017; Gomez-Pinilla et al., 2008; Gómez-Pinilla et al., 2002 ; Kitraki et al., 1993). We observed lower H3K9me2 and increased H4K8ac and H3K4me3 at the *Bdnf* promoter in hippocampi of aged rats. Taken that H3K9me2 is a repressive mark related to gene silencing (Gupta et al., 2010), while H4K8ac and H3K4me3 are associated to transcriptional activation (Wang et al., 2008), our results suggest a chromatin landscape aiding *Bdnf* transcription in healthy aged animals. In support of this, previous literature suggests that expression of a *Bdnf* precursor, proBDNF, was augmented in the hippocampus of 24 month-old Wistar rats (Perovic et al., 2013) and 22–24 months old C57BL/6 mice (Buhusi et al., 2017). Considering that proBDNF processing into mature BDNF occurs at different rates over the lifespan (Perovic et al., 2013 ; Silhol et al., 2007), it is possible to suggest that aged hippocampi have higher proBDNF levels. ProBDNF has been proposed to play a role in neuronal apoptosis (Teng et al., 2005), inhibiting neuronal migration (Xu et al., 2011), memory

impairment (Buhusi et al., 2017) and induction of hippocampal long-term depression (LTD), suggesting that proBDNF might oppose the known effects of its mature counterpart on memory (Woo et al., 2005). An age-dependent effect on the *Bdnf* promoter was observed, since aerobic and resistance aged groups had decreased hippocampal *Bdnf* promoter H3K4me3, suggesting that these protocols can attenuate age-induced effects, and could lead to a reduction in gene transcription and consequently reduced levels of proBDNF.

Conversely, YA rats submitted to resistance, acrobatic and aerobic modalities had increased hippocampal *Bdnf* promoter H4K8ac, which may indicate an increase in *Bdnf* transcription. Previous reports have reported the impact of several exercise modalities on *Bdnf* expression. Aerobic exercise increased *Bdnf* expression in YA (Gomez-Pinilla et al., 2011) and adolescent rodents (Abel and Rissman, 2013). Although Klistsova and colleagues (2004) also observed increased levels in BDNF expression and its receptor, TrkB protein, in motor cortex and cerebellum in YA rats after acrobatic training (Klistsova et al., 2004), this is the first study describing the effects of acrobatic exercise on hippocampal *Bdnf* epigenetic regulation. In addition, it is possible to suggest that longer training periods of resistance training are necessary to modulate *Bdnf* expression, since our protocol of 12 weeks increased hippocampal *Bdnf* promoter H4K8ac, while 4 and 8 weeks did not alter hippocampal *Bdnf* expression in YA rats (Cassilhas et al., 2012a; Novaes Gomes et al., 2014). Surprisingly, our combined modality did not regulate epigenetically the *Bdnf* promoter, although this failure can be related to previous literature that multicomponent exercise was unable to impact peripheral blood BDNF levels in humans (Ives et al.). Taken that resistance modality did not affect cognitive outcomes even with increased *Bdnf* H4K8ac, while combined exercise improved memory performance without any effect on this histone modification, it is possible to infer that cognitive effects of exercise cannot be related exclusively to *Bdnf* H4K8ac modulation.

Regarding the *cFos* promoter, our results demonstrated reductions in H3K4me3 and H4K8ac, both associated with transcriptional activation, in aged animals (Wang et al., 2008). These data

corroborate previous research demonstrating regulation of *cFos* expression by aging (Kitraki et al., 1993; Li et al., 2015), since an age-related reduction in cFOS protein levels was found in brain regions such as hippocampus, hypothalamus, striatum, cerebral cortex and cerebellum of rats, probably owing to reduced neuronal activity during the aging process. In addition, decreased *cFos* expression was observed in hippocampus of middle-aged mice with visuospatial memory impairment (Li et al., 2015). This report and ours reinforce the evidence that *cFos* expression has an important role in memory impairment during aging. Taken that Ono and colleagues (1993) did not show alterations in *cFos* gene DNA methylation in the whole brain (Ono et al., 1993), our results support histone modifications as possible mechanisms mediating age-related alterations in *cFos* expression.

It is important to note that acrobatic, aerobic and combined exercise improved memory performance and concomitantly affected hippocampal activation epigenetic marks, specifically H3K9ac and/or H3K4me3, at *cFos* promoter in aged rats. Aerobic exercise has been pointed out as capable of attenuating cognitive decline and epigenetic repression promoted by age (de Meireles et al., 2016). In this study, this modality induced an age-dependent effect, since we observed increased hippocampal H3K9ac at the *cFos* promoter only in aged groups, which could be related to augmented gene expression. This result suggests that aerobic exercise alters this mark in adverse situations, such as during aging. In accordance, swimming increased hippocampal H3K9ac and *cFos* expression in animals submitted to a isoflurane-induced memory impairment paradigm without any effect in animals not exposed to isoflurane (Zhong et al., 2016).

Acrobatic modality exerted a broader effect, altering two evaluated epigenetic marks, H3K9ac and H3K4me3, at the *cFos* promoter in aged animals, which would suggest transcriptional activation. In accordance, previous studies reported increased *cFos* expression in motor cortex after acrobatic training in rodents (Kleim et al., 1996). In addition to the management of the postural instability and improve balance (Garcia et al., 2012) in elderly people, this work brings

a new perspective about acrobatic exercise effects on aversive memory in aging and highlights the involvement of hippocampal epigenetic regulation.

Our study is the first report of the impact of combined exercise, including aerobic, resistance and acrobatic training, in animal models. Our combined protocol had similar effects as acrobatic and aerobic protocols on memory performance, and concomitantly was able to induce epigenetic changes, specifically H3K4me3, in hippocampal at the *cFos* promoter. The relevance to clinical practice is based on the fact of individual profiles of elderly patients could restrict their training with aerobic or resistance conditions. The spent time with each component is reduced in combined modality, allowing that individuals with some limitations to achieve the full beneficial response as well.

Another remarkable finding of our study is the effect of aging and exercise on hippocampal *Dnmt3a* promoter regulation. DNMT3A is an important enzyme for *de novo* DNA methylation which is strongly associated with gene repression, a mechanism already observed in age-related alterations (Akbarian et al., 2013; Gräff and Mansuy, 2008). It is relevant to highlight that the *Dnmt3a* gene is necessary for normal memory formation (Bird, 2002; Feng et al., 2010; Morris et al., 2014). A previous report by Morris and colleagues (2014) demonstrated that *Dnmt3a* knockout mice have synaptic alterations as well as learning deficits in several associative and episodic memory tasks (Morris et al., 2014). Here, we observed an increase in hippocampal H3K4me3 at the *Dnmt3a* promoter mediated by age that can be related to increased *Dnmt3a* expression and consequently increased DNA methylation. Our finding is in agreement with recent literature questioning the paradigm of global DNA hypomethylation in aging (Jung and Pfeifer, 2015), since it has been observed that levels of 5-methylcytosine (5-mC), 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) and DNMT3A are augmented in brain tissue, especially in hippocampus (Chouliaras et al., 2011; Chouliaras et al., 2012; Ianov et al., 2017). Our data may be related to findings by Chouliaras and colleagues (2011), who observed enhancement of *Dnmt3a* expression in 24 month-old mice (Chouliaras et al., 2011).

Evidence shows that DNA methylation is an important mechanism by which exercise affects gene expression. In this study, age- and modality-associated effects were observed in epigenetic marks at the *Dnmt3a* promoter, given that resistance and combined protocols decreased hippocampal H4K8ac in YA rats, which might decrease its expression. Moreover, exercise modalities did not exert any effect in aged animals. Together, we could exclude the involvement of epigenetic modulation of exercise at the *Dnmt3a* promoter in hippocampus on functional improvement observed during aging. Although the aerobic protocol used here (12 weeks, 3 times a week) did not modify any studied epigenetic marks (H3K9ac, H3K4me3, H3K9me2 and H4K8ac) at the *Dnmt3a* promoter, previously our research group and others showed exercise modulation of hippocampal DNMT levels in YA rodents (Abel and Rissman, 2013; Elsner et al., 2013). Elsner and colleagues (2013) observed modulation of DNMT3B levels after a single session of aerobic exercise in 3 month-old rats, without any effect in aged animals (Elsner et al., 2013). Abel and colleagues (2013) observed decreased *Dnmt3a*, *Dnmt3b* and *Dnmt1* expression in adolescent mice exercised with voluntary wheel running.

5. Conclusions

Results of the current study support the hypothesis that exercise training starting in late adulthood impacts age-related cognitive declines, since acrobatic, aerobic and combined modalities are able to improve aversive memory performance in aged rats and that epigenetic mechanisms at hippocampal *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a* promoters might be involved with both the aging process and exercise effects. Our work supports the idea that exercise alters hippocampal epigenetic marks in an age-dependent manner. Aerobic and resistance modalities attenuate age-induced effects on hippocampal *Bdnf* promoter H3K4me3. Besides, exercise modalities which improved memory performance in aged rats were able to modify H3K9ac or H3K4me3 at the *cFos* promoter that could increase gene transcription. These insights provide a substantial basis for rational prescription of exercise modalities in the elderly population not only for

metabolic and cardiovascular improvements but also for cognitive benefits, what can be exploited as a potential therapeutic target to reduce memory disorders during aging.

Acknowledgments

This work was supported, in part, by grant PDSE - 88881.135752/2016-01 from Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES) from Brazil and P50MH096890 from the U.S. National Institute of Mental Health (E.J. Nestler). CNPq fellowships (Dr. I.R. Siqueira; L.C.F. Meireles, K. Bertoldi and L. R. Cechinel) CAPES fellowship (F.J. Galvão).

References

- Abel, J.L., Rissman, E.F., 2013. Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain. *International Journal of Developmental Neuroscience* 31(6), 382-390.
- Akbarian, S., Beeri, M., Haroutunian, V., 2013. EPigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition. *JAMA Neurology* 70(6), 711-718.
- Arida, R.M., Scorza, F.A., dos Santos, N.F., Peres, C.A., Cavalheiro, E.A., 1999. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Research* 37(1), 45-52.
- Barreto, G., Huang, T.-T., Giffard, R.G., 2010. Age-related defects in sensorimotor activity, spatial learning and memory in C57BL/6 mice. *Journal of neurosurgical anesthesiology* 22(3), 214-219.
- Bayraktar, G., Kreutz, M.R., 2017. Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression? *The Neuroscientist*, 1073858417707457.
- Berchtold, N.C., Castello, N., Cotman, C.W., 2010. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience* 167(3), 588-597.
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16(1), 6-21.
- Black, J.E., Isaacs, K.R., Anderson, B.J., Alcantara, A.A., Greenough, W.T., 1990. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(14), 5568-5572.
- Brooks, G.A., White, T.P., 1978. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol.* 45(6), 1009-1015.
- Buhusi, M., Etheredge, C., Granholm, A.-C., Buhusi, C.V., 2017. Increased Hippocampal ProBDNF Contributes to Memory Impairments in Aged Mice. *Frontiers in Aging Neuroscience* 9, 284.
- Cassilhas, R.C., Lee, K.S., Fernandes, J., Oliveira, M.G.M., Tufik, S., Meeusen, R., de Mello, M.T., 2012a. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. *Neuroscience* 202, 309-317.
- Cassilhas, R.C., Lee, K.S., Venâncio, D.P., Oliveira, M.G.M., Tufik, S., de Mello, M.T., 2012b. Resistance exercise improves hippocampus-dependent memory. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45(12), 1215-1220.
- Chodzko-Zajko, W.J., Proctor, D.N., Fiatarone Singh, M.A., Minson, C.T., Nigg, C.R., Salem, G.J., Skinner, J.S., 2009. Exercise and Physical Activity for Older Adults. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 41(7), 1510-1530.

Chouliaras, L., van den Hove, D.L.A., Kenis, G., Dela Cruz, J., Lemmens, M.A.M., van Os, J., Steinbusch, H.W.M., Schmitz, C., Rutten, B.P.F., 2011. Caloric restriction attenuates age-related changes of DNA methyltransferase 3a in mouse hippocampus. *Brain, Behavior, and Immunity* 25(4), 616-623.

Chouliaras, L., van den Hove, D.L.A., Kenis, G., Keitel, S., Hof, P.R., van Os, J., Steinbusch, H.W.M., Schmitz, C., Rutten, B.P.F., 2012. Age-related increase in levels of 5-hydroxymethylcytosine in mouse hippocampus is prevented by caloric restriction. *Current Alzheimer research* 9(5), 536-544.

Comrie, A.E., Gray, D.T., Smith, A.C., Barnes, C.A., 2018. Different macaque models of cognitive aging exhibit task-dependent behavioral disparities. *Behavioural Brain Research* 344, 110-119.

Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences* 25(6), 295-301.

de Meireles, L.C.F., Bertoldi, K., Cechinel, L.R., Schallenberger, B.L., da Silva, V.K., Schröder, N., Siqueira, I.R., 2016. Treadmill exercise induces selective changes in hippocampal histone acetylation during the aging process in rats. *Neuroscience Letters* 634, 19-24.

Elsner, V.R., Lovatel, G.A., Moysés, F., Bertoldi, K., Spindler, C., Cechinel, L.R., Muotri, A.R., Siqueira, I.R., 2013. Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: A preliminary study. *Experimental Gerontology* 48(2), 136-139.

Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S.L., Le, T., Li, E., Sweatt, J.D., Silva, A.J., Fan, G., 2010. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nature Neuroscience* 13, 423.

Garcia, P.C., Real, C.C., Ferreira, A.F.B., Alouche, S.R., Britto, L.R.G., Pires, R.S., 2012. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. *Brain Research* 1456, 36-48.

Gil, J.H., Kim, C.K., 2015. Effects of different doses of leucine ingestion following eight weeks of resistance exercise on protein synthesis and hypertrophy of skeletal muscle in rats. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 19(1), 31-38.

Gomez-Pinilla, F., Vaynman, S., Ying, Z., 2008. Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur J Neurosci.* 28(11), 2278-2287.

Gómez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R.R., Molteni, R., Edgerton, V.R., 2002 Voluntary Exercise Induces a BDNF-Mediated Mechanism That Promotes Neuroplasticity. *AJP - JN Physiol* 88(5), 2187-2195.

Gomez-Pinilla, F., Zhuang, Y., Feng, J., Ying, Z., Fan, G., 2011. Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. *Eur J Neurosci.* 33(3), 383-390.

Gräff, J., Mansuy, I.M., 2008. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural Brain Research* 192(1), 70-87.

Green, J.T., Chess, A.C., Burns, M., Schachinger, K.M., Thanellou, A., 2011. The effects of two forms of physical activity on eyeblink classical conditioning. *Behavioural Brain Research* 219(1), 165-174.

Gupta, S., Kim, S.Y., Artis, S., Molfese, D.L., Schumacher, A., Sweatt, J.D., Paylor, R.E., Lubin, F.D., 2010. Histone methylation regulates memory formation. *J Neurosci.* 30(10), 3589-3599.

Hansen, R.T., Zhang, H.-T., 2013. Senescent-induced dysregulation of cAMP/CREB signaling and correlations with cognitive decline. *Brain Research* 1516, 93-109.

Ianov, L., Riva, A., Kumar, A., Foster, T.C., 2017. DNA Methylation of Synaptic Genes in the Prefrontal Cortex Is Associated with Aging and Age-Related Cognitive Impairment. *Frontiers in Aging Neuroscience* 9, 249.

Ives, S.J., Norton, C., Miller, V., Minicucci, O., Robinson, J., O'Brien, G., Escudero, D., Paul, M., Sheridan, C., Curran, K., Rose, K., Robinson, N., He, F., Arciero, P.J., Multi-modal exercise training and protein-pacing enhances physical performance independent of growth hormone and BDNF but may be dependent on IGF-1 in exercise-trained men. *Growth Hormone & IGF Research* 32, 60-70.

Jones, T.A., Chu, C.J., Grande, L.A., Gregory, A.D., 1999. Motor Skills Training Enhances Lesion-Induced Structural Plasticity in the Motor Cortex of Adult Rats. *The Journal of Neuroscience* 19(22), 10153-10163.

Jung, M., Pfeifer, G.P., 2015. Aging and DNA methylation. *BMC Biology* 13, 7.

Kitraki, E., Bozas, E., Philippidis, H., Stylianopoulou, F., 1993. Aging-related changes in IGF-II and c-fos gene expression in the rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience* 11(1), 1-9.

Kleim, J.A., Lussnig, E., Schwarz, E.R., Comery, T.A., Greenough, W.T., 1996. Synaptogenesis and FOS Expression in the Motor Cortex of the Adult Rat after Motor Skill Learning. *The Journal of Neuroscience* 16(14), 4529-4535.

Klitssova, A.Y., Dickson, E., Yoshida, R., Greenough, W.T., 2004. Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise. *Brain Research* 1028(1), 92-104.

Lambert, T.J., Fernandez, S.M., Frick, K.M., 2005. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 83(3), 206-216.

Li, Y., Abdourahman, A., Tamm, J.A., Pehrson, A.L., Sánchez, C., Gulinello, M., 2015. Reversal of age-associated cognitive deficits is accompanied by increased plasticity-related gene expression after chronic antidepressant administration in middle-aged mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 135(Supplement C), 70-82.

Lovatel, G.A., Bertoldi, K., Elsner, V.R., Vanzella, C., Moysés, F.d.S., Spindler, C., Funck, V.R., Pereira, L.M., de Oliveira, C.V., Oliveira, M.S., Netto, C.A., Siqueira, I.R., 2012. Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function. *Neurobiology of Learning and Memory*(0).

Lovatel, G.A., Elsner, V.R., Bertoldi, K., Vanzella, C., Moysés, F.d.S., Vizuete, A., Spindler, C., Cechinel, L.R., Netto, C.A., Muotri, A.R., Siqueira, I.R., 2013. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory* 101(0), 94-102.

McQuail, J.A., Beas, B.S., Kelly, K.B., Simpson, K.L., Frazier, C.J., Setlow, B., Bizon, J.L., 2016. NR2A-Containing NMDARs in the Prefrontal Cortex Are Required for Working Memory and Associated with Age-Related Cognitive Decline. *The Journal of Neuroscience* 36(50), 12537-12548.

Morris, M.J., Adachi, M., Na, E.S., Monteggia, L.M., 2014. Selective role for DNMT3a in learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 115, 30-37.

Nelson, M.E., Rejeski, J., Blair, S.N., Duncan, P.W., Judge, J.O., King, A.C., Macera, C.A., Castaneda-Sceppa, C., 2007. Physical Activity and Public Health in Older Adults: Recommendation From the American College of Sports Medicine and the American Heart Association *Circulation* 116, 1094-1105.

Nouchi, R., Taki, Y., Takeuchi, H., Sekiguchi, A., Hashizume, H., Nozawa, T., Nouchi, H., Kawashima, R., 2014. Four weeks of combination exercise training improved executive functions, episodic memory, and processing speed in healthy elderly people: evidence from a randomized controlled trial. *Age* 36(2), 787-799.

Novaes Gomes, F.G., Fernandes, J., Vannucci Campos, D., Cassilhas, R.C., Viana, G.M., D'Almeida, V., de Moraes Rêgo, M.K., Buainain, P.I., Cavalheiro, E.A., Arida, R.M., 2014. The beneficial effects of strength exercise on hippocampal cell proliferation and apoptotic signaling is impaired by anabolic androgenic steroids. *Psychoneuroendocrinology* 50, 106-117.

Ogasawara, R., Sato, K., Matsutani, K., Nakazato, K., Fujita, S., 2014. The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 306(10), E1155-E1162.

Ono, T., Uehara, Y., Kurishita, A., Tawa, R., Sakurai, H., 1993. Biological Significance of DNA Methylation in the Ageing Process. *Age and Ageing* 22(suppl_1), S34-S43.

Peña, C.J., Kronman, H.G., Walker, D.M., Cates, H.M., Bagot, R.C., Purushothaman, I., Issler, O., Loh, Y.-H.E., Leong, T., Kiraly, D.D., Goodman, E., Neve, R.L., Shen, L., Nestler, E.J., 2017. Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science* 356(6343), 1185-1188.

Perovic, M., Tesic, V., Djordjevic, A.M., Smiljanic, K., Loncarevic-Vasiljkovic, N., Ruzdijic, S., Kanazir, S., 2013. BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat. *AGE* 35(6), 2057-2070.

Podtelezchnikov, A.A., Tanis, K.Q., Nebozhyn, M., Ray, W.J., Stone, D.J., Loboda, A.P., 2011. Molecular Insights into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Its Relationship to Normal Aging. *PLoS One* 6(12), e29610.

Salame, S., Garcia, P.C., Real, C.C., Borborema, J., Mota-Ortiz, S.R., Britto, L.R.G., Pires, R.S., 2016. Distinct neuroplasticity processes are induced by different periods of acrobatic exercise training. *Behavioural Brain Research* 308, 64-74.

Segal, S.K., Cotman, C.W., Cahill, L.F., 2012. Exercise-Induced Noradrenergic Activation Enhances Memory Consolidation in Both Normal Aging and Patients with Amnesic Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis* 32(4), 1011-1018.

Shen, Y., Xu, X., Yue, K., Xu, G., 2015. Effect of different exercise protocols on metabolic profiles and fatty acid metabolism in skeletal muscle in high-fat diet-fed rats. *Obesity* 23(5), 1000-1006.

Sihol, M., Arancibia, S., Maurice, T., Tapia-Arancibia, L., 2007. Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neuroscience* 146(3), 962-973.

Suzuki, T., Shimada, H., Makizako, H., Doi, T., Yoshida, D., Tsutsumimoto, K., Anan, Y., Uemura, K., Lee, S., Park, H., 2012. Effects of multicomponent exercise on cognitive function in older adults with amnesic mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *BMC Neurol.* 12(128).

Tamakoshi, K., Ishida, A., Takamatsu, Y., Hamakawa, M., Nakashima, H., Shimada, H., Ishida, K., 2014. Motor skills training promotes motor functional recovery and induces synaptogenesis in the motor cortex and striatum after intracerebral hemorrhage in rats. *Behavioural Brain Research* 260, 34-43.

Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., Kraemer, R.T., Nykjaer, A., Hempstead, B.L., 2005. ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75^{NTR} and Sortilin. *The Journal of Neuroscience* 25(22), 5455-5463.

Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Peng, W., Zhang, M.Q., Zhao, K., 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature genetics* 40(7), 897-903.

Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.-J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., Lu, B., 2005. Activation of p75^{NTR} by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *J Neurosci* 25(26), 10669-10679.

Xu, Z.-Q., Sun, Y., Li, H.-Y., Lim, Y., Zhong, J.-H., Zhou, X.-F., 2011. Endogenous proBDNF is a negative regulator of migration of cerebellar granule cells in neonatal mice. *European Journal of Neuroscience* 33(8), 1376-1384.

Zarrinkalam, E., Heidarianpour, A., Salehi, I., Ranjbar, K., Komaki, A., 2016. Effects of endurance, resistance, and concurrent exercise on learning and memory after morphine withdrawal in rats. *Life Sciences* 157, 19-24.

Zhong, T., Ren, F., Huang, C.S., Zou, W.Y., Yang, Y., Pan, Y.D., Sun, B., Wang, E., Guo, Q.L., 2016. Swimming exercise ameliorates neurocognitive impairment induced by neonatal exposure to isoflurane and enhances hippocampal histone acetylation in mice. *Neuroscience* 316, 378-388.

Table and Figure Legends

Figure 1. Experimental Design (I.A.: Inhibitory Avoidance)

Figure 2. Effect of aging and exercise modalities on step-down latency in inhibitory avoidance paradigm. Columns represent mean \pm S.D. (n = 7-10). 2A. Effect of aging on step-down latency. Student's t-test *values significantly different from the 5 months-old groups. 2B and 2C. Effect of exercise on step-down latency in young adult and aged rats respectively. One-Way ANOVA; #values significantly different from the respective sedentary group.

Figure 3. Effect of aging at the *Bdnf*, *cFos* and *Dnmt3a* promoters in hippocampus of Wistar rats. 3A. Effect of aging on acetylated (H4K8 and H3K9) and methylated (H3K9me2 and H3K4me3) chromatin. 3B. Effect of aging on acetylated (H4K8 and H3K9) and methylated (H3K4me3 and H3K9me2) chromatin. 3C. Effect of aging on acetylated (H3K9) and methylated (H3K4me3 and H3K9me2) chromatin. Columns represent mean \pm S.D. (n = 4-5) and data are presented as percent input. Student's t-test *values significantly different from the 5 months-old groups.

Figure 4. Effect of exercise at the *Bdnf* promoter in hippocampus of Wistar rats. 4A. Effect of exercise on H4K8ac chromatin. 4B. Effect of exercise on H3K4me3 chromatin. Columns represent mean \pm S.D. (n = 4-5) and data are presented as percent input. One-Way ANOVA #values significantly different from the respective sedentary group.

Figure 5. Effect of exercise at the *cFos* promoter in hippocampus of Wistar rats. 5A. Effect of exercise on H3K9ac chromatin. 5B. Effect of exercise on H3K4me3 chromatin. Columns represent mean \pm S.D. (n = 4-5) and data are presented as percent input. One-Way ANOVA #values significantly different from the respective sedentary group.

Figure 6. Effect of exercise on H4K8ac chromatin at the *Dnmt3a* promoter in hippocampus of Wistar rats. Columns represent mean \pm S.D. (n = 4-5) and data are presented as percent input. One-Way ANOVA #values significantly different from the respective sedentary group.

Table 1: Gene name, accession number, forward primer sequence, and reverse primer sequence of primer pairs used in quantitative PCR amplification.

Figure 2

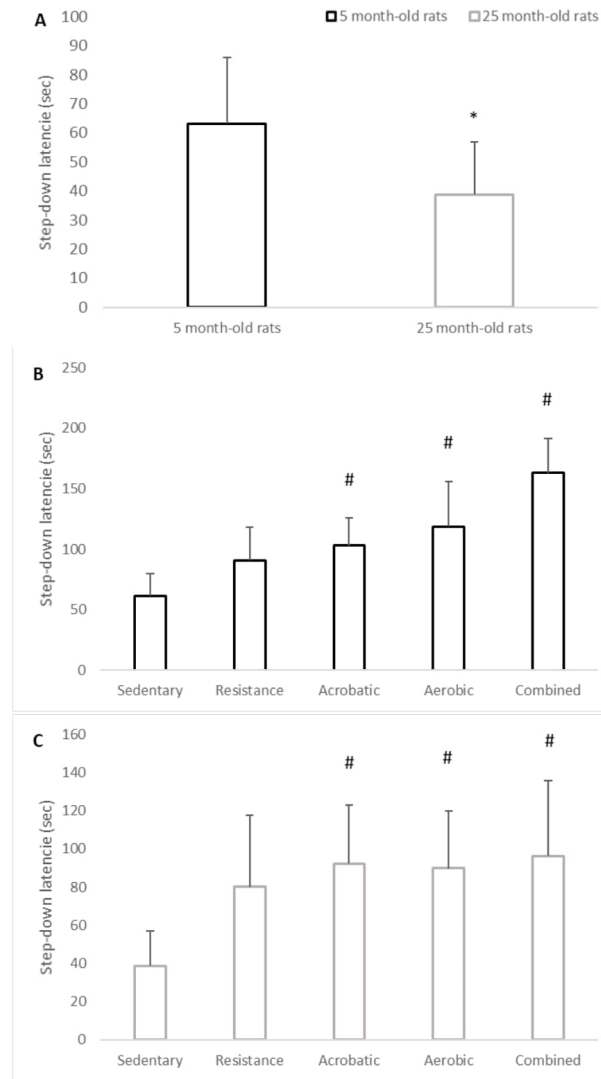


Figure 3

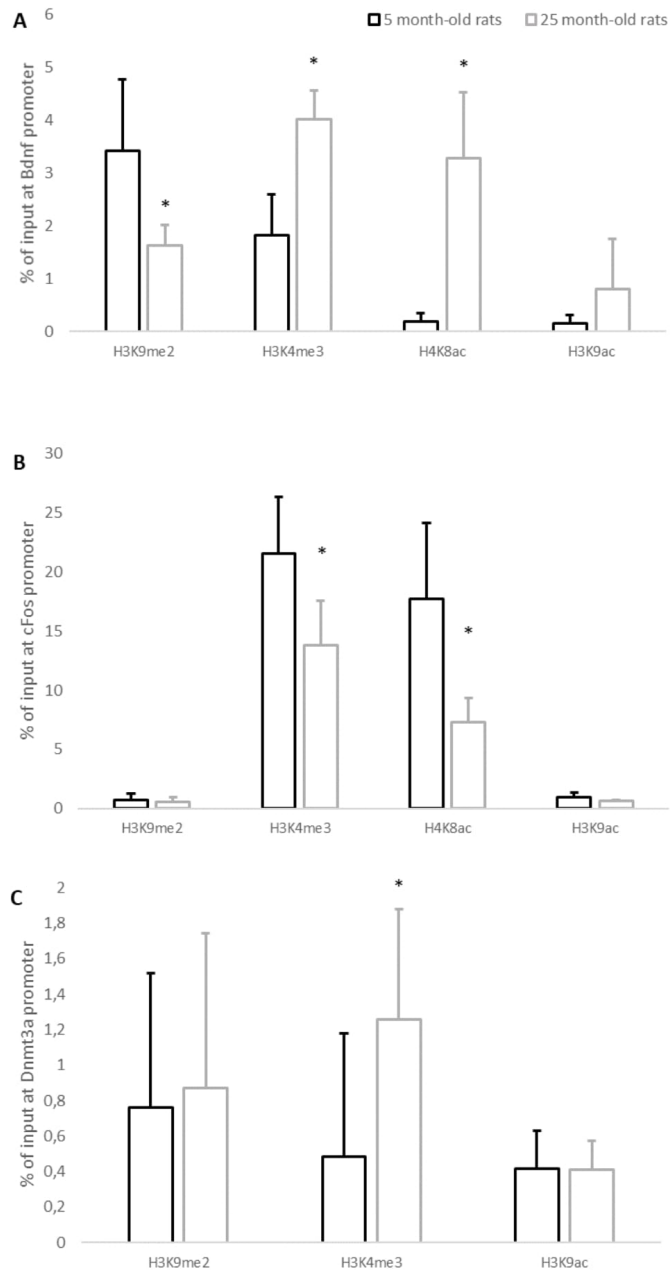


Figure 4

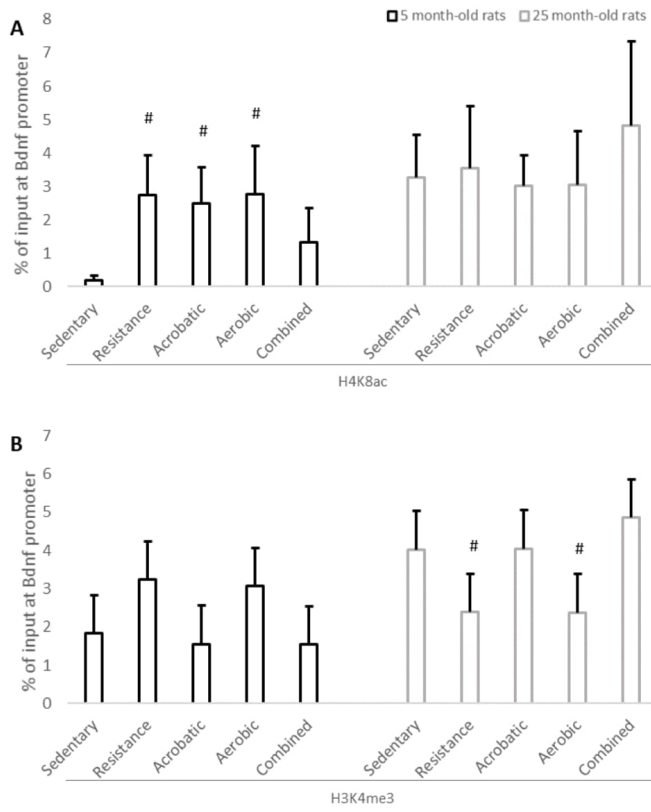


Figure 5

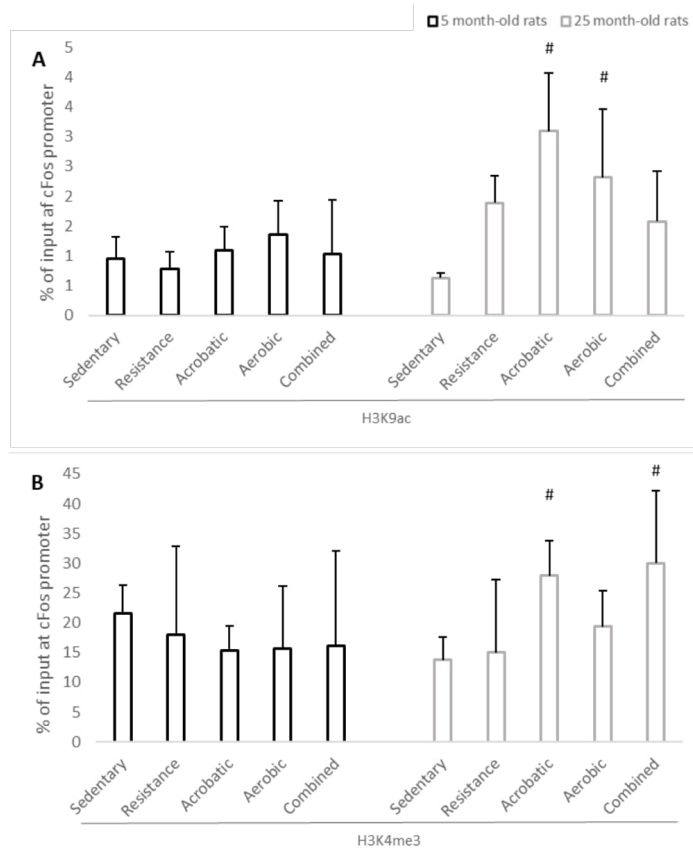
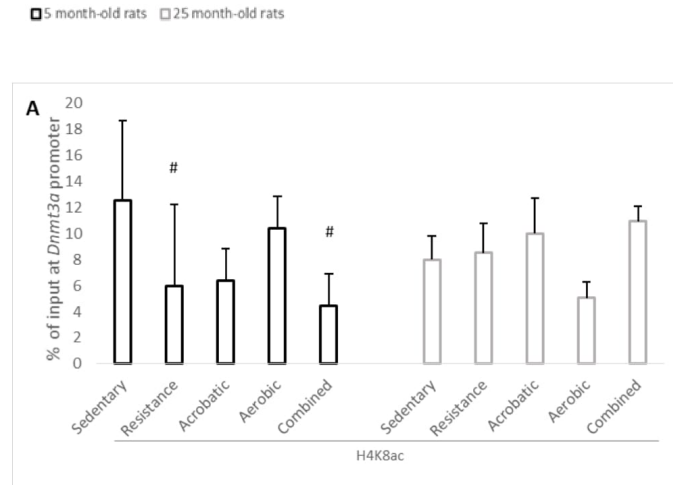
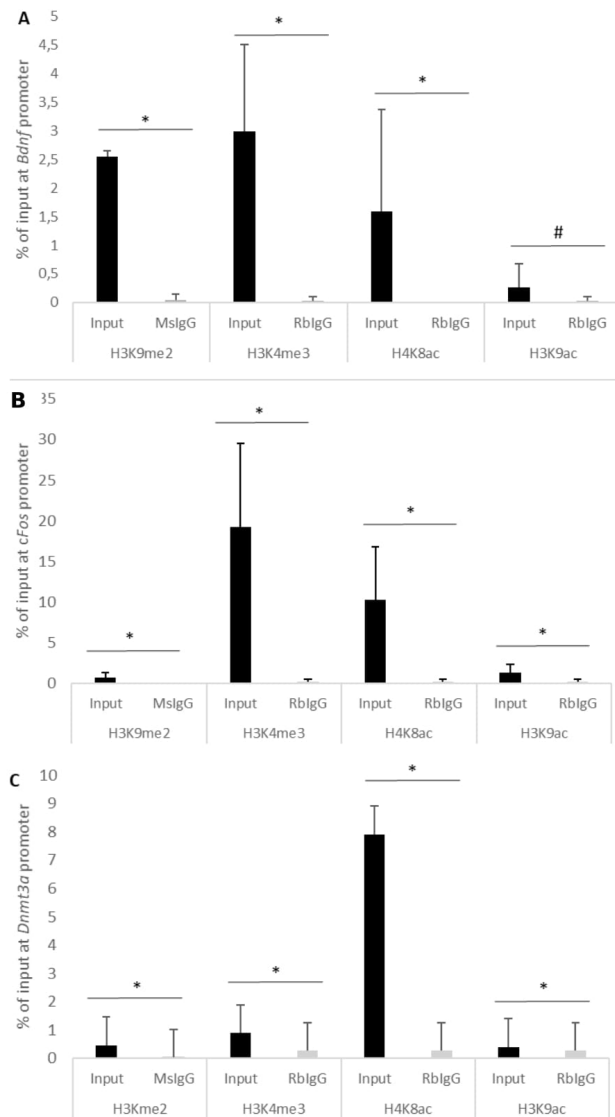


Figure 6.



Supplemental Data

Antibody enrichment over IgG control. Columns represent mean \pm S.D. and data are presented as percent of input at the respective promoter. Panel A. *Bdnf* promoter. Panel B. *cFos* promoter. Panel C. *Dnmt3a* promoter. Student t-test *difference between Input and IgG $p < 0,001$. #difference between Input and IgG $P < 0,01$.



7. Discussão

Nessa tese foi investigado o impacto de diferentes modalidades de exercício físico sobre a memória aversiva e marcadores epigenéticos globais e em região promotora de genes de interesse no hipocampo de ratos *Wistar* durante o processo de envelhecimento.

O déficit de memória relacionado ao envelhecimento, achados dos capítulos 1 e 2, já foi demonstrado na literatura tanto em humanos [6, 7] como em roedores, não só na memória aversiva [10, 30] mas também em paradigmas de memória espacial e declarativa [8, 9]. Nesse trabalho pudemos replicar e complementar os achados já descritos anteriormente [100, 101] sobre o efeito do exercício na memória. Observamos que as modalidades aeróbica, acrobática e combinada foram eficazes na melhora da memória aversiva em ratos adultos jovens e na atenuação dos déficits cognitivos relacionados ao envelhecimento, efeitos não encontrados nos animais do grupo força.

Os achados do 1º e 2º capítulo referentes à melhora da memória aversiva induzida pelo exercício aeróbico, estão de acordo com a literatura prévia que mostra os efeitos benéficos desta modalidade sobre a memória em ratos jovens e envelhecidos [100, 102, 103]. Trabalhos anteriores demonstraram que o exercício aeróbico tem vantagem sobre o treino acrobático em diferentes paradigmas de memória [104, 105], achado não observado neste trabalho em ambas as idades estudadas, provavelmente pela especificidade do tipo de memória avaliada.

Por outro lado, o exercício de força não melhorou o desempenho na esQUIVA inibitória em ratos adultos jovens ou envelhecidos, contrariando trabalhos anteriores em que o treino de força 5 vezes por semana melhorou a memória aversiva em ratos de 3 meses [40, 106]. Uma possível explicação para esse fenômeno é que protocolos com frequências de treinamento superiores são necessárias para eficácia dessa modalidade na memória, uma vez que nosso protocolo foi de 3 vezes por semana.

Embora o *American College of Sports and Medicine* recomende o uso de diferentes modalidades de exercício para melhoria da saúde geral de idosos [14], este é o primeiro estudo pré-clínico que investigou a associação dos protocolos aeróbico, força e acrobático com o objetivo de melhorar a memória durante o envelhecimento. A combinação dos treinos de força e aeróbico já se mostrou eficaz na melhora da cognição de roedores. Zarrinkalam et al (2016) compararam os treinos de força, aeróbico e a combinação dessas modalidades na memória espacial e aversiva de ratos adultos jovens expostos a um modelo de adição de morfina, que causa déficit de memória [107].

No respectivo trabalho, foi observado que a combinação de modalidades melhorou a memória aversiva, enquanto os protocolos aeróbico e de força isoladamente foram ineficazes. O presente estudo mostrou que a associação dos exercícios aeróbico, força e acrobático também melhorou a memória aversiva não só em ratos adultos jovens, mas também em ratos envelhecidos, desta forma, essa tese fornece base racional para prescrição clínica da combinação de modalidades durante diferentes etapas da vida.

Os mecanismos epigenéticos, especificamente as modificações em histonas, têm sido propostos como mecanismo para os déficits de memória relacionados ao envelhecimento. Em relação à acetilação de histonas, especificamente a H3K9, não foi observado um efeito do envelhecimento (1º e 2º capítulo). Trabalhos prévios também não observaram mudanças na acetilação da H3K9 em hipocampo de ratos *Wistar* envelhecidos após as fases de aquisição e retenção da esQUIVA inibitória [108]. Esse achado pode estar relacionado com os resultados de Elsner e colaboradores (2013), que observaram um aumento da metilação da H3K9 global relacionada ao envelhecimento em ratos *Wistar*, sugerindo que esse resíduo de lisina globalmente estaria mais suscetível à metilação do que à acetilação. Peleg e colaboradores (2010), estudando o padrão de acetilação das histonas H3K9 e H4K12 em ratos jovens e envelhecidos demonstrou que os níveis basais

dessas marcas epigenéticas não foram alterados pela idade. No entanto, após o condicionamento de medo os animais envelhecidos tiveram um aumento da acetilação da H3K9, mas não da H4K12 sugerindo a regulação hipocampal dessa lisina como chave para o déficit de memória relacionado ao envelhecimento [68]. No primeiro capítulo dessa tese não observamos o efeito do envelhecimento em nenhuma das lisinas estudadas (H3K9, H4K5 e H4K12). Esses achados são interessantes quando analisados junto ao 2º capítulo, pois revelam que mesmo com um aumento da atividade hipocampal da HDAC e desacetilação global da H4 em ratos envelhecidos [10, 74], aparentemente existe um padrão lisina e gene dependente para as mudanças epigenéticas relacionadas ao envelhecimento.

No gene do *cFos* e no do *Bdnf* foi possível observar efeitos antagônicos no padrão de acetilação da H4K8, uma vez que houve uma diminuição da acetilação desse resíduo na região promotora do *cFos* e aumento na região promotora do *Bdnf*. Em relação à região promotora do *cFos*, a redução da acetilação da H4K8 e da trimetilação da H3K4 (modificação ativadora transcricional [109]), sugerem uma diminuição na transcrição do gene *cFos* em hipocampo relacionada ao envelhecimento. Esses resultados parecem corroborar achados prévios nos quais se observou redução na expressão do *Cfos* em diversas regiões cerebrais induzida pelo envelhecimento [89, 110]. Em estudos com camundongos de meia idade, a redução na expressão do *cFos* hipocampal foi correlacionada ao dano na memória visuo-espacial, reforçando o papel importante da expressão desse gene nas cascatas de formação de memória no processo de envelhecimento [110].

Diferente do observado na região promotora do *cFos*, no gene do *Bdnf* houve um aumento da acetilação da H4K8 e da trimetilação da H3K4 (ambas as marcas ativadoras) em concomitância com uma redução da dimetilação da H3K9 (marca repressora [63]), sugerindo um aumento na

transcrição hipocampal desse gene. A literatura prévia corrobora esses achados, uma vez que já foi observado um aumento na expressão do precursor do *Bdnf* (proBDNF) em hipocampo de ratos de 24 meses [111] e de camundongos C57BL/6 de 22-24 meses [112]. Considerando que o processamento do proBDNF em BDNF maduro ocorre em taxas diferentes durante a vida [111, 113], baseado nos achados dessa tese é possível sugerir que ocorra um acúmulo de proBDNF no hipocampo de ratos envelhecidos. É importante salientar que o proBDNF, diferente de sua forma madura, participa de cascatas ativadoras de apoptose [114], inibe a migração neuronal [115] e está relacionado com déficits de memória [112, 116].

Um dos achados mais interessantes dessa tese são os efeitos do exercício, de maneira modalidade-dependente, contrabalanceando os efeitos do envelhecimento sobre marcadores epigenéticos em histonas, globalmente e em região promotora dos genes *Bdnf* e *cFos*. No 1º capítulo dessa tese observamos que o exercício aeróbico (20 minutos, diariamente, durante 2 semanas) aumentou globalmente a acetilação da H4K12 em hipocampo de animais jovens e envelhecidos. Esse achado é relevante, uma vez que Peleg e colaboradores (2010) relataram a importância da regulação epigenética dessa lisina em hipocampo na formação da memória de animais envelhecidos [68]. O aumento da acetilação dessa lisina induzido pelo exercício físico foi relacionado à melhora no desempenho dos animais no teste da esQUIVA inibitória e teve efeito semelhante ao encontrado em outros trabalhos com o uso de inibidores da HDAC [68].

Na região promotora do *Bdnf*, o treino de força e aeróbico reverteram parcialmente o efeito do envelhecimento, uma vez que ficou evidente uma diminuição da trimetilação da H3K4 hipocampal, sugerindo uma redução da expressão do proBDNF. Nos animais jovens, os treinos de força, acrobático e aeróbico aumentaram a acetilação da H4K8 na região promotora do *Bdnf*, sugerindo um aumento da transcrição deste gene. Trabalhos prévios corroboram esse achado, uma vez que

demonstraram o impacto de algumas modalidades na expressão de *Bdnf*. O exercício aeróbico aumentou a expressão de *Bdnf* em ratos adultos jovens [75] e camundongos adolescentes [90]. Apesar de estudos anteriores já demonstrarem o aumento nos níveis de BDNF e do seu receptor TrkB em córtex motor e cerebelo de ratos adultos jovens após o treinamento acrobático [44], essa tese é o primeiro relato dos efeitos dessa modalidade em marcadores epigenéticos em região promotora do *Bdnf*. Além disso, é possível sugerir que o treino de força em protocolos de maior frequência seja capaz de modular a expressão do *Bdnf*, uma vez que nosso protocolo de 12 semanas aumentou a acetilação da H4K8 hipocampal na região promotora deste gene, enquanto 4 e 8 semanas de treino não alteraram a expressão de *Bdnf* hipocampal de ratos *Wistar* adultos jovens [87, 106].

Assim como no gene do *Bdnf*, foi possível observar que algumas modalidades de exercício atenuaram os efeitos do envelhecimento em marcas epigenéticas na região promotora do *cFos* ao mesmo tempo em que provocaram a melhora da memória. Especificamente o exercício aeróbico e o acrobático aumentaram a acetilação da H3K9 e o exercício acrobático e o combinado aumentaram a trimetilação da H3K4 na região promotora do *cFos* em ratos envelhecidos. O exercício aeróbico já se mostrou capaz de atenuar os déficits cognitivos e a repressão epigenética promovida pelo envelhecimento [10]. Nesse estudo, essa modalidade mostrou um efeito idade-dependente, uma vez que induziu um aumento na acetilação da H3K9 na região promotora do *cFos*, sugerindo um aumento na sua expressão, apenas em ratos envelhecidos. Esse resultado pode estar relacionado com outros trabalhos que mostraram que o exercício aeróbico é capaz de alterar a acetilação da H3K9 em situações prejudiciais para a memória, como o envelhecimento. Zhong e colaboradores (2016) observaram que o exercício de natação aumentou a acetilação hipocampal da H3K9 e a expressão de *cFos* em ratos submetidos a um modelo de déficit de memória induzido pelo uso do isoflurano, e o mesmo protocolo não teve efeito algum nos ratos

não expostos ao modelo [91]. A acetilação da H3K9 na região promotora do *cFos* em hipocampo de ratos envelhecidos submetidos ao protocolo de exercício aeróbico e a ausência de efeito nos animais adultos jovens está em concordância com o 1º capítulo dessa tese, no qual observamos globalmente um aumento na acetilação dessa lisina apenas em hipocampo de animais envelhecidos.

Por outro lado, a modalidade acrobática teve um efeito mais amplo no gene do *cFos* alterando duas marcas epigenéticas, a acetilação da H3K9 e a trimetilação da H3K4 nos animais envelhecidos, sendo essas marcas relacionadas à ativação transcricional. Estudos prévios corroboram esse achado demonstrando um aumento na expressão do *cFos* no córtex motor após o treino acrobático [43]. Em conjunto, esses achados trazem novas perspectivas sobre o uso terapêutico do treino acrobático, não apenas para o tratamento da instabilidade postural e melhorar o equilíbrio [117] mas também a fim melhorar o déficit de memória relacionado ao envelhecimento. Além disso, fornecemos os mecanismos epigenéticos dessa regulação no hipocampo.

Nosso estudo é o 1º relato do impacto do exercício combinado, incluindo componente acrobático, força e aeróbico em modelos animais. Nosso protocolo combinado teve efeitos semelhantes ao acrobático e aeróbico na melhora da memória e concomitantemente induziu mudanças epigenéticas, especificamente induzindo um aumento na trimetilação da H3K4 na região promotora do *cFos*. Esses achados são relevantes para prática clínica, uma vez que muitos idosos apresentam restrições osteoarticulares ou cardiorrespiratórias que restringem sua capacidade física para treino por longos períodos. No treino combinado o tempo referente para cada atividade é menor, permitindo que indivíduos com limitações motoras possam ter as respostas benéficas de cada modalidade e da combinação delas.

Outro aspecto a ser enfatizado é o efeito do envelhecimento e do exercício na regulação epigenética no gene *Dnmt3a*. A *Dnmt3a* é uma importante enzima para a metilação *de novo* (que ocorre em sítios com nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia) e está fortemente associada com a repressão gênica, um mecanismo já observado no envelhecimento [61, 118]. É importante destacar que o gene da *Dnmt3a* é necessário para a formação da memória [119-121]. Morris e colegas (2014) demonstraram que camundongos *knockout* para este gene possuem alterações sinápticas importantes e déficits de memória (episódica e associativa) [120]. Aqui, observamos um aumento na trimetilação hipocampal da H3K4 na região promotora do gene *Dnmt3a* em ratos envelhecidos, o que sugere um aumento na expressão da *Dnmt3a* e conseqüentemente na metilação do DNA. Nossos achados estão de acordo com a literatura recente, que questiona o paradigma da hipometilação global do DNA no envelhecimento [122], uma vez que já foram observados níveis de 5-metilcitosina (5-mC), 5-hydroximetilcitosina (5-hmC) e DNMT3A aumentados no tecido cerebral e especificamente em hipocampo de roedores envelhecidos [123-125].

Nossos resultados estão relacionados com os achados de Chouliaras e colegas (2011) que observaram aumento na expressão da *Dnmt3a* em camundongos de 24 meses [123]. Evidências mostram que a metilação do DNA é um importante mecanismo pelo qual o exercício afeta a expressão gênica. Nesse estudo observamos efeitos idade e modalidade-dependentes na regulação epigenética do gene da *Dnmt3a* em sua região promotora, uma vez que os protocolos de força e combinados diminuíram a acetilação da H4K8 apenas em ratos jovens, sugerindo uma diminuição na expressão gênica. Dados estes resultados, podemos excluir o envolvimento da modulação epigenética hipocampal do gene *Dnmt3a* nos efeitos funcionais benéficos do exercício na memória durante o envelhecimento.

Apesar do protocolo de exercício aeróbico utilizado nesse estudo (3 vezes por semana, durante 12 semanas) não ter modificado nenhuma das marcas epigenéticas estudadas (H3K9ac, H3K4me3, H3K9me2 e H4K8ac) na região promotora do gene *Dnmt3a*, nosso grupo de pesquisa e outros já demonstraram a modulação epigenética hipocampal nos níveis de DNMT em camundongos jovens [78, 90]. Nosso grupo de pesquisa em 2013, observou a modulação da DNMT3B, outra DNA metiltransferase *de novo*, após a sessão única de exercício em ratos de 3 meses sem efeito algum nos animais envelhecidos [78]. Abel e colaboradores (2013) também evidenciaram uma diminuição da expressão das *Dnmt3a*, *Dnmt3b* e *Dnmt1* modulada pelo exercício aeróbico voluntário em camundongos adolescentes[90].

Em suma, nossos dados demonstraram que o exercício físico melhora a memória aversiva de ratos *Wistar*, de maneira protocolo dependente, sendo as modalidades aeróbica, acrobática e combinada efetivas na melhora da memória de animais adultos jovens e na atenuação dos déficits de cognitivos induzidos pelo processo de envelhecimento. Além disso, um importante achado desse trabalho foram as mudanças relacionadas ao envelhecimento e ao exercício físico em marcas epigenéticas tanto em histonas específicas quanto em região promotora de genes de interesse no hipocampo de ratos *Wistar*. Esse é o primeiro trabalho na literatura que investigou os efeitos de diferentes modalidades de exercício físico sobre a memória e marcadores epigenéticos durante o processo de envelhecimento.

8. Conclusões

Os resultados apresentados nessa tese nos permitem concluir que:

- Os exercícios aeróbico, acrobático e combinado exercem um efeito benéfico na memória tanto em animais adultos jovens quanto em animais envelhecidos, podendo ser indicado para essa finalidade em qualquer etapa da vida.

- Globalmente o envelhecimento não alterou a acetilação das histonas H3K9, H4K12 e H4K5 em hipocampo de ratos *Wistar*.

- O exercício aeróbico diário moderado (20 minutos/dia durante 14 dias) aumentou a acetilação da H3K9 global apenas em hipocampo de animais envelhecidos e da H4K12 globalmente em hipocampo de ambas as idades estudadas.

- A exposição ao contexto de aprendizado, paradigma da esQUIVA inibitória, não influenciou na acetilação global dos resíduos de lisina da H3K9, H4K12 e H4K5 em hipocampo de ambas as idades estudadas.

- Na região promotora de genes de interesse, o envelhecimento teve um efeito lisina dependente.

No promotor do gene *Bdnf* houve um aumento nos níveis das marcas ativadoras (H3K4me3 e H4K8ac) e redução de marcas repressoras (H3K9me2), sugerindo um aumento na transcrição desse gene e provável acúmulo de seu precursor. No promotor do gene *cFos* foi observado uma redução de marcas ativadoras (H3K4me3 e H4K8ac) indicando uma redução em sua transcrição.

Na região promotora do gene *Dnmt3a* foi observada a mudança apenas de uma marca ativadora (H3K4me3).

- Nosso trabalho indica que as modalidades de exercício alteram as marcas epigenéticas em hipocampo de maneira idade-dependente.

- As modalidades aeróbicas e o treino de força atenuaram os efeitos induzidos pela idade, reduzindo a trimetilação da H3K4 no promotor *Bdnf* em hipocampo. Em ratos adultos jovens os exercícios de força, acrobático e aeróbico aumentaram a acetilação da H4K8.

- As modalidades de exercício que melhoraram o desempenho da memória em ratos envelhecidos foram capazes de modificar H3K9ac ou H3K4me3 hipocampais no promotor *cFos* sugerindo um aumento na transcrição desse gene, atenuando os efeitos do envelhecimento.
- Na região promotora do gene *Dnmt3a* o protocolo de força e o treino combinado aumentaram a acetilação da H4K8 apenas em hipocampo de animais jovens.

Esses achados nos fornecem uma base substancial tanto nos mecanismos de ação epigenéticos pelos quais as diferentes modalidades de exercício melhoram a memória no envelhecimento, mas também para a prescrição clínica racional do exercício na população idosa. As modalidades de exercício não só melhoram o metabolismo, imunidade e causam adaptações benéficas ao sistema cardiovascular como já descrito na literatura, mas também geram benefícios cognitivos, o que pode ser explorado como potencial alvo terapêutico para reduzir os transtornos da memória durante o envelhecimento.

10. Referências Bibliográficas

1. Organization, W.H., *Envelhecimento ativo: Uma política de Saúde* WHO/NMH/NPH/02.8. 2005, Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde.
2. Ferreira, D.C.d.O. and A.Y. Yoshitome, *Prevalência e características das quedas de idosos institucionalizados*. Revista Brasileira de Enfermagem, 2010. **63**: p. 991-997.
3. Freitas, M.C.d., T.A. Queiroz, and J.A.V.d. Sousa, *O significado da velhice e da experiência de envelhecer para os idosos*. Revista da Escola de Enfermagem da USP, 2010. **44**: p. 407-412.
4. Silva, M.d.G.d. and M.R. Boemer, *The experience of aging: a phenomenological perspective*. Revista Latino-Americana de Enfermagem, 2009. **17**: p. 380-386.
5. Pinto, R.B.R. and L.C. Bastos, *Abordagem das pesquisas em epidemiologia aplicada à gerontologia no Brasil: revisão da literatura em periódicos, entre 1995 e 2005*. Rev Bras Epidemiol, 2007. **10**(3): p. 361-369.
6. Podtelezchnikov, A.A., et al., *Molecular Insights into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Its Relationship to Normal Aging*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e29610.
7. Hansen, R.T. and H.-T. Zhang, *Senescent-induced dysregulation of cAMP/CREB signaling and correlations with cognitive decline*. Brain Research, 2013. **1516**: p. 93-109.
8. Barreto, G., T.-T. Huang, and R.G. Giffard, *Age-related defects in sensorimotor activity, spatial learning and memory in C57BL/6 mice*. Journal of neurosurgical anesthesiology, 2010. **22**(3): p. 214-219.
9. McQuail, J.A., et al., *NR2A-Containing NMDARs in the Prefrontal Cortex Are Required for Working Memory and Associated with Age-Related Cognitive Decline*. The Journal of Neuroscience, 2016. **36**(50): p. 12537-12548.
10. Lovatel, G.A., et al., *Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus*. Neurobiology of Learning and Memory, 2013. **101**(0): p. 94-102.
11. Comrie, A.E., et al., *Different macaque models of cognitive aging exhibit task-dependent behavioral disparities*. Behavioural Brain Research, 2018. **344**: p. 110-119.
12. Churchill, J.D., et al., *Exercise, experience and the aging brain*. Neurobiology of Aging, 2002. **23**(5): p. 941-955.
13. Roig, M., et al., *The effects of cardiovascular exercise on human memory: A review with meta-analysis*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2013. **37**(8): p. 1645-1666.
14. Chodzko-Zajko, W.J., et al., *Exercise and Physical Activity for Older Adults*. Medicine & Science in Sports & Exercise, 2009. **41**(7): p. 1510-1530.
15. Nelson, M.E., et al., *Physical Activity and Public Health in Older Adults: Recommendation From the American College of Sports Medicine and the American Heart Association*. Circulation, 2007. **116**: p. 1094-1105.
16. Chtara, M., et al., *Effect of concurrent endurance and circuit resistance training sequence on muscular strength and power development*. J Strength Cond Res., 2008. **22**(4): p. 1037-45.
17. Gergley, J.C., *Comparison of two lower-body modes of endurance training on lower-body strength development while concurrently training*. J Strength Cond Res. , 2009. **23**(3): p. 979-87.
18. Mikkola, J., et al., *Neuromuscular and cardiovascular adaptations during concurrent strength and endurance training in untrained men*. Int J Sports Med. , 2012. **33**(9).
19. Jones, T.W., et al., *Performance and neuromuscular adaptations following differing rations of concurrent strength and endurance training*. J Strength Cond Res., 2013. [Epub ahead of print].

20. Cadore, E.L., et al., *Physiological effects of concurrent training in elderly men*. Int J Sports Med. , 2010. **31**(10): p. 689-97.
21. Karavirta, L., et al., *Individual responses to combined endurance and strength training in older adults*. . Med Sci Sports Exerc, 2011. **43**(3): p. 484-90.
22. Cadore, E.L., et al., *Neuromuscular adaptations to concurrent training in the elderly: effects of intrasession exercise sequence*. Age (Dordr). 2013. **35**(3): p. 891-903.
23. Barnett, A., et al., *Community-based group exercise improves balance and reduces falls in at-risk older people: a randomised controlled trial*. Age and Ageing, 2003. **32**(4): p. 407-414.
24. Nouchi, R., et al., *Four weeks of combination exercise training improved executive functions, episodic memory, and processing speed in healthy elderly people: evidence from a randomized controlled trial*. Age, 2014. **36**(2): p. 787-799.
25. Segal, S.K., C.W. Cotman, and L.F. Cahill, *Exercise-Induced Noradrenergic Activation Enhances Memory Consolidation in Both Normal Aging and Patients with Amnesic Mild Cognitive Impairment*. J Alzheimers Dis, 2012. **32**(4): p. 1011-1018.
26. Suzuki, T., et al., *Effects of multicomponent exercise on cognitive function in older adults with amnesic mild cognitive impairment: a randomized controlled trial*. BMC Neurol., 2012. **12**(128).
27. Shen, Y., et al., *Effect of different exercise protocols on metabolic profiles and fatty acid metabolism in skeletal muscle in high-fat diet-fed rats*. Obesity, 2015. **23**(5): p. 1000-1006.
28. Ogasawara, R., et al., *The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle*. American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism, 2014. **306**(10): p. E1155-E1162.
29. Tseng, B.Y., et al., *Masters athletes exhibit larger regional brain volume and better cognitive performance than sedentary older adults*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2013: p. n/a-n/a.
30. Lovatell, G.A., et al., *Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function*. Neurobiology of Learning and Memory, 2012(0).
31. Pietrelli, A., et al., *Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats*. Neuroscience, 2012. **202**(0): p. 252-266.
32. Ben, J., et al., *Running exercise effects on spatial and avoidance tasks in ovariectomized rats*. Neurobiology of Learning and Memory, 2010. **94**(3): p. 312-317.
33. Hopkins, M.E., R. Nitecki, and D.J. Bucci, *Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels*. Neuroscience, 2011. **194**: p. 84-94.
34. Chen, M.-S. and B.C. Jiang, *Resistance Training Exercise Program for Intervention to Enhance Gait Function in Elderly Chronically Ill Patients: Multivariate Multiscale Entropy for Center of Pressure Signal Analysis*. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2014. **2014**: p. 471356.
35. Daly, R.M., et al., *Effectiveness of dual-task functional power training for preventing falls in older people: study protocol for a cluster randomised controlled trial*. Trials, 2015. **16**: p. 120.
36. Liu, C.-j. and N.K. Latham, *Progressive resistance strength training for improving physical function in older adults*. The Cochrane database of systematic reviews, 2009(3): p. CD002759-CD002759.

37. Fallah, N., et al., *A Multi-State Model of Cognitive Dynamics in Relation to Resistance Training: The Contribution of Baseline Function*. *Annals of epidemiology*, 2013. **23**(8): p. 463-468.
38. Liu-Ambrose, T., et al., *Resistance Training and Executive Functions: A 12-Month Randomised Controlled Trial*. *Archives of internal medicine*, 2010. **170**(2): p. 170-178.
39. Fernandes, J., et al., *A single bout of resistance exercise improves memory consolidation and increases the expression of synaptic proteins in the hippocampus*. *Hippocampus*, 2016. **26**(8): p. 1096-1103.
40. Cassilhas, R.C., et al., *Resistance exercise improves hippocampus-dependent memory*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2012. **45**(12): p. 1215-1220.
41. Anderson, B.J., A.A. Alcantara, and W.T. Greenough, *Motor-Skill Learning: Changes in Synaptic Organization of the Rat Cerebellar Cortex*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 1996. **66**(2): p. 221-229.
42. Chu, C.J. and T.A. Jones, *Experience-Dependent Structural Plasticity in Cortex Heterotopic to Focal Sensorimotor Cortical Damage*. *Experimental Neurology*, 2000. **166**(2): p. 403-414.
43. Kleim, J.A., et al., *Synaptogenesis and FOS Expression in the Motor Cortex of the Adult Rat after Motor Skill Learning*. *The Journal of Neuroscience*, 1996. **16**(14): p. 4529-4535.
44. Klintsova, A.Y., et al., *Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise*. *Brain Research*, 2004. **1028**(1): p. 92-104.
45. Salame, S., et al., *Distinct neuroplasticity processes are induced by different periods of acrobatic exercise training*. *Behavioural Brain Research*, 2016. **308**: p. 64-74.
46. Peng, J.-Y. and B.-M. Li, *Protein synthesis is essential not only for consolidation but also for maintenance and post-retrieval reconsolidation of acrobatic motor skill in rats*. *Molecular Brain*, 2009. **2**(1): p. 1-10.
47. Lustosa, L.P., et al., *Efeito de um programa de treinamento funcional no equilíbrio postural de idosos da comunidade*. *Fisioterapia e Pesquisa*, 2010. **17**: p. 153-156.
48. Nascimento, L.C.G.d., L.J. Patrizzi, and C.C.E.S. Oliveira, *Efeito de quatro semanas de treinamento proprioceptivo no equilíbrio postural de idosos*. *Fisioter. Mov.*, 2012. **25**(2): p. 325-331.
49. Wayne, P.M., et al., *The Impact of Tai Chi on Cognitive Performance in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2014. **62**(1): p. 25-39.
50. Kim, T.H.M., et al., *The mental-attention Tai Chi effect with older adults*. *BMC Psychology*, 2016. **4**: p. 29.
51. Kaliman, P., et al., *Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process*. *Ageing Research Reviews*, 2011. **10**(4): p. 475-486.
52. Yoo, C.B. and P.A. Jones, *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. *Nature Reviews* 2006. **5**: p. 37-50.
53. Gravina, S. and J. Vijg, *Epigenetic factors in aging and longevity*. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 2010. **459**: p. 247-258.
54. Waggoner, D., *Mechanisms of Disease: Epigenesis*. *Seminars in Pediatric Neurology*, 2007. **14**(1): p. 7-14.
55. Rountree, M.R., et al., *DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer*. *Oncogene*, 2001. **20**(24): p. 3156-3165.
56. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. *Nature*, 2000. **403**(6): p. 41-45.

57. Liu, L., et al., *DNA methylation impacts on learning and memory in aging*. *Neurobiol Aging*, 2009. **30**(04): p. 549–560.
58. Graff, J. and I.M. Mansuy, *Epigenetic dysregulation in cognitive disorders*. *Eur. J. Neurosci.*, 2009. **30**: p. 1-8.
59. Kiefer, J.C., *Epigenetics in Development*. *Developmental Dynamics*, 2007. **236**: p. 1144-1156.
60. Arrowsmith, C.H., et al., *Epigenetic protein families a new frontier for drug discovery*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012. **Advanced online publication**.
61. Gräff, J. and I.M. Mansuy, *Epigenetic codes in cognition and behaviour*. *Behavioural Brain Research*, 2008. **192**(1): p. 70-87.
62. Kouzarides, T., *Histone methylation in transcriptional control*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002. **12**(2): p. 198-209.
63. Gupta, S., et al., *Histone methylation regulates memory formation*. *J Neurosci.*, 2010. **30**(10): p. 3589-99.
64. Klose, R.J. and Y. Zhang, *Regulation of histone methylation by demethylation and demethylation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(4): p. 307-318.
65. Walker, M.P., et al., *Reversible epigenetic histone modifications and Bdnf expression in neurons with aging and from a mouse model of Alzheimer's disease*. *Age (Dordr.)*, 2012. **[Epub ahead of print]**.
66. dos Santos Sant' Anna, G., et al., *Histone deacetylase activity is altered in brain areas from aged rats*. *Neuroscience Letters*, (0).
67. Ricobaraza, A., et al., *Phenylbutyrate Ameliorates Cognitive Deficit and Reduces Tau Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model*. *Neuropsychopharmacology.*, 2009. **34**: p. 1721-1732.
68. Peleg, S., et al., *Altered Histone Acetylation Is Associated with Age-Dependent Memory Impairment in mice*. *Science*, 2010. **328**: p. 753-756.
69. Bousiges, O., et al., *Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus*. *Neuropsychopharmacology.*, 2010. **35**(13): p. 16.
70. Levenson, J.M., et al., *Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279** (39): p. 14.
71. Morse, S.J., et al., *Environmental Enrichment Reverses Histone Methylation Changes in the Aged Hippocampus and Restores Age-Related Memory Deficits* *Biology*, 2015. **4**: p. 298-313.
72. Sen, N., *Epigenetic Regulation of Memory by Acetylation and Methylation of Chromatin: Implications in Neurological Disorders, Aging, and Addiction*. *NeuroMolecular Medicine*, 2015. **17**(2): p. 97-110.
73. Saha, R.N. and K. Pahan, *HATs and HDACs in neurodegeneration: A tale of disconcerted acetylation homeostasis*. *Cell Death and Differentiation*, 2006. **13**(4): p. 539-550.
74. Elsner, V.R., et al., *Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus*. *Neuroscience*, 2011. **192**(0): p. 580-587.
75. Gomez-Pinilla, F., et al., *Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation*. *Eur J Neurosci.*, 2011. **33**(3): p. 383-90.
76. Cechinel, L.R., et al., *Treadmill exercise induces age and protocol-dependent epigenetic changes in prefrontal cortex of Wistar rats*. *Behavioural Brain Research*, 2016. **313**: p. 82-87.

77. Levenson, J.M. and J.D. Sweatt, *Epigenetic mechanisms in memory formation*. Nat Rev Neurosci. , 2005. **6**(2): p. 108-18.
78. Elsner, V.R., et al., *Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: A preliminary study*. Experimental Gerontology, 2013. **48**(2): p. 136-139.
79. Erickson, K.I., et al., *BDNF is Associated With Age-Related Decline in Hippocampal Volume*. J Neurosci., 2010 **30**(15): p. 5368-5375.
80. Canivet, A., et al., *Effects of BDNF polymorphism and physical activity on episodic memory in the elderly: a cross sectional study*. European Review of Aging and Physical Activity, 2015. **12**: p. 15.
81. Musumeci, G., et al., *Changes in serotonin (5-HT) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in frontal cortex and hippocampus of aged rat treated with high tryptophan diet*. Brain Research Bulletin, 2015. **119, Part A**: p. 12-18.
82. Jia, Z., et al., *Erythropoietin Attenuates the Memory Deficits in Aging Rats by Rescuing the Oxidative Stress and Inflammation and Promoting BDNF Releasing*. Molecular Neurobiology, 2015: p. 1-7.
83. Denham, J., et al., *Epigenetic changes in leukocytes after 8 weeks of resistance exercise training*. European Journal of Applied Physiology, 2016. **116**(6): p. 1245-1253.
84. Lindholm, M.E., et al., *An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training*. Epigenetics, 2014. **9**(12): p. 1557-1569.
85. dos Santos, J.M., et al., *The effect of exercise on skeletal muscle glucose uptake in type 2 diabetes: An epigenetic perspective*. Metabolism - Clinical and Experimental. **64**(12): p. 1619-1628.
86. Phillips, B.E., et al., *Molecular Networks of Human Muscle Adaptation to Exercise and Age*. PLoS Genet, 2013. **9**(3): p. e1003389.
87. Novaes Gomes, F.G., et al., *The beneficial effects of strength exercise on hippocampal cell proliferation and apoptotic signaling is impaired by anabolic androgenic steroids*. Psychoneuroendocrinology, 2014. **50**: p. 106-117.
88. Bayraktar, G. and M.R. Kreutz, *Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression?* The Neuroscientist, 2017: p. 1073858417707457.
89. Kitraki, E., et al., *Aging-related changes in IGF-II and c-fos gene expression in the rat brain*. International Journal of Developmental Neuroscience, 1993. **11**(1): p. 1-9.
90. Abel, J.L. and E.F. Rissman, *Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain*. International Journal of Developmental Neuroscience, 2013. **31**(6): p. 382-390.
91. Zhong, T., et al., *Swimming exercise ameliorates neurocognitive impairment induced by neonatal exposure to isoflurane and enhances hippocampal histone acetylation in mice*. Neuroscience, 2016. **316**: p. 378-388.
92. Brooks, G.A. and T.P. White, *Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise* Journal of Applied Physiology, 1978. **48**(6): p. 6.
93. da Silva, P.F., et al., *Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate*. Neuroscience, 2012. **200**(0): p. 42-49.
94. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem., 1976. **7**(72): p. 248-54.

95. Gil, J.H. and C.K. Kim, *Effects of different doses of leucine ingestion following eight weeks of resistance exercise on protein synthesis and hypertrophy of skeletal muscle in rats.* Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry, 2015. **19**(1): p. 31-38.
96. Jones, T.A., et al., *Motor Skills Training Enhances Lesion-Induced Structural Plasticity in the Motor Cortex of Adult Rats.* The Journal of Neuroscience, 1999. **19**(22): p. 10153-10163.
97. Black, J.E., et al., *Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(14): p. 5568-5572.
98. Peña, C.J., et al., *Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2.* Science, 2017. **356**(6343): p. 1185-1188.
99. Gupta-Agarwal, S., et al., *G9a/GLP Histone Lysine Dimethyltransferase Complex Activity in the Hippocampus and the Entorhinal Cortex is Required for Gene Activation and Silencing during Memory Consolidation.* The Journal of Neuroscience, 2012. **32**(16): p. 5440-5453.
100. Aguiar-Jr, A.S., et al., *Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling.* Mechanisms of Ageing and Development, 2011. **132**: p. 560-567.
101. Albeck, D.S., et al., *Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat.* Behavioural Brain Research 2006. **168**: p. 345-348.
102. Radak, Z., et al., *Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain.* Neurochemistry International), 2001. **38**: p. 17-23.
103. Radak, Z., et al., *The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain.* Neurochemistry International, 2006. **49**(4): p. 387-392.
104. Lambert, T.J., S.M. Fernandez, and K.M. Frick, *Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice.* Neurobiology of Learning and Memory, 2005. **83**(3): p. 206-216.
105. Green, J.T., et al., *The effects of two forms of physical activity on eyeblink classical conditioning.* Behavioural Brain Research, 2011. **219**(1): p. 165-174.
106. Cassilhas, R.C., et al., *Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms.* Neuroscience, 2012. **202**: p. 309-317.
107. Zarrinkalam, E., et al., *Effects of endurance, resistance, and concurrent exercise on learning and memory after morphine withdrawal in rats.* Life Sciences, 2016. **157**: p. 19-24.
108. Blank, M., et al., *Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats.* Neuroscience Letters, 2015. **594**(0): p. 76-81.
109. Wang, Z., et al., *Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome.* Nature genetics, 2008. **40**(7): p. 897-903.
110. Li, Y., et al., *Reversal of age-associated cognitive deficits is accompanied by increased plasticity-related gene expression after chronic antidepressant administration in middle-aged mice.* Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2015. **135**(Supplement C): p. 70-82.
111. Perovic, M., et al., *BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat.* AGE, 2013 **35**(6): p. 2057-2070.
112. Buhusi, M., et al., *Increased Hippocampal ProBDNF Contributes to Memory Impairments in Aged Mice.* Frontiers in Aging Neuroscience, 2017. **9**: p. 284.
113. Silhol, M., et al., *Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats.* Neuroscience, 2007. **146**(3): p. 962-73.

114. Teng, H.K., et al., *ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75^{NTR} and Sortilin*. *The Journal of Neuroscience*, 2005. **25**(22): p. 5455-5463.
115. Xu, Z.-Q., et al., *Endogenous proBDNF is a negative regulator of migration of cerebellar granule cells in neonatal mice*. *European Journal of Neuroscience*, 2011. **33**(8): p. 1376-1384.
116. Woo, N.H., et al., *Activation of p75^{NTR} by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression*. 2005. **8**: p. 1069.
117. Garcia, P.C., et al., *Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain*. *Brain Research*, 2012. **1456**: p. 36-48.
118. Akbarian, S., M. Beerli, and V. Haroutunian, *Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition*. *JAMA Neurology*, 2013. **70**(6): p. 711-718.
119. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. *Genes & Development*, 2002. **16**(1): p. 6-21.
120. Morris, M.J., et al., *Selective role for DNMT3a in learning and memory*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2014. **115**: p. 30-37.
121. Feng, J., et al., *Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons*. *Nature Neuroscience*, 2010. **13**: p. 423.
122. Jung, M. and G.P. Pfeifer, *Aging and DNA methylation*. *BMC Biology*, 2015. **13**: p. 7.
123. Chouliaras, L., et al., *Caloric restriction attenuates age-related changes of DNA methyltransferase 3a in mouse hippocampus*. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2011. **25**(4): p. 616-623.
124. Chouliaras, L., et al., *Age-related increase in levels of 5-hydroxymethylcytosine in mouse hippocampus is prevented by caloric restriction*. *Current Alzheimer research*, 2012. **9**(5): p. 536-544.
125. Ianov, L., et al., *DNA Methylation of Synaptic Genes in the Prefrontal Cortex Is Associated with Aging and Age-Related Cognitive Impairment*. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2017. **9**: p. 249.