



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLÓGIA

MODULAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS EM ENCÉFALOS
DE RATOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO

VIVIANE ROSTIROLA ELSNER

Porto Alegre, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLÓGIA

MODULAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS EM ENCÉFALOS
DE RATOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO

VIVIANE ROSTIROLA ELSNER

Orientadora: Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

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
doutor em Fisiologia.

Porto Alegre, 2014.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por Ele estar sempre ao meu lado, iluminando meus passos e guiando meus caminhos. Além de ter me dado sabedoria, força e perseverança a cada dia para enfrentar os desafios e as dificuldades impostas. Tenho convicção de que, sem a fé que possuo seria impossível concluir esta trajetória.

Aos meus pais, Edson e Dirce, por terem me ensinando os princípios e valores que tenho hoje e por nunca terem poupado esforços para que, incondicionalmente, eu pudesse me dedicar aos estudos. Mesmo à distância, vocês sempre estiveram ao meu lado, me fazendo sentir seus cuidados e amor. Ao Gui, meu irmão, primos e tios que sempre torceram pelo meu sucesso profissional e apostaram no meu futuro (Amo vocês).

Ao meu marido Rodrigo, pelo amor, companheirismo paciência, incentivo e apoio ao longo dessa caminhada. Você literalmente “caiu do céu, de pára-quadras” no meu caminho, e me permitiu realizar o maior sonho da minha vida, que não foi o dia do casamento em si, e sim, a possibilidade de construir uma família ao lado de alguém tão especial.

À Profa. Ionara Rodrigues Siqueira, minha orientadora, por ter me acolhido tão bem em seu laboratório, pela confiança depositada em mim, pelas infinitas horas destinadas ao meu estudo, pelo exemplo profissional, competência, paciência, dedicação, empenho e estímulo; além das críticas, que foram essenciais para meu crescimento como pessoa e como pesquisadora. Agradeço também pela amizade e ajuda em todas as circunstâncias.

Aos queridos colegas de laboratório Kaki, Gi, Felipe, Chris, Lou, Arthi, Carla, Laura, Wagner, pela fidelidade, competência, comprometimento e imensa prestatividade e ajuda durante os experimentos. Mas agradeço a vocês principalmente pela amizade verdadeira e ensinamentos que cada um me passou. Sinto-me uma pessoa privilegiada em ter convivido com pessoas tão maravilhosas como vocês.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e ao CNPq pela oportunidade e pela bolsa concedida. Também, aos professores do Programa de Fisiologia, pelos ensinamentos e pelo crescimento científico proporcionado. À secretária do Curso de Pós-Graduação Alice, bem como às secretárias do Departamento de Farmacologia Ângela e Jane, que sempre estiveram dispostas a ajudar.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UFRGS, pela oportunidade de estágio na Universidade de San Diego, Califórnia – EUA, durante o período de 12 a 23 de novembro de 2011, concedida com recursos referentes ao edital “Missão científica de curta duração no exterior para estudantes dos Programas de Pós-Graduação da UFRGS”. Agradeço também ao professor Dr. Alysson Muotri, pesquisador responsável pelo laboratório onde fiz este estágio, e todo seu grupo.

Aos fiéis amigos de Erechim, e às pessoas incríveis que conheci em Porto Alegre. Vocês tornam minha vida melhor!

Por mais que eu quisesse, nenhuma palavra seria suficiente para expressar o quanto sou grata e o quanto vocês foram importantes para mim. Então, neste momento, gostaria de dividir minha alegria e dizer que a vitória não é só minha, é também de vocês.

*“Deus não prometeu plantio sem tempestades, caminhos sem riscos,
trajetórias sem acidentes, trabalhos sem dificuldades. Mas prometeu força
nas perdas, sabedoria nas tormentas e consolo no desespero”.*

Augusto Cury

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epigenética	2
1.2 Epigenética e Função Cerebral	6
1.3 Exercício, Epigenética e Função Cerebral	11
2. JUSTIFICATIVA	16
3. HIPÓTESE DE TRABALHO	18
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo geral	21
4.2 Objetivos específicos	21
5. MATERIAIS E MÉTODOS	22
6. RESULTADOS	29
6.1 CAPÍTULO 1: Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study	30
6.2 CAPÍTULO 2: Treadmill exercise impacts histone deacetylase activity in striatum from adolescent Wistar rats	35
7. DISCUSSÃO	54
8. CONCLUSÃO	65
9. PERSPECTIVAS	67
10. REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS***Introdução***

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da cromatina	2
Figura 2. Representação esquemática da reação de metilação do DNA	3
Figura 3. Representação esquemática das modificações epigenéticas em histonas	4
Figura 4. Representação esquemática da reação de acetilação de histonas	4
Figura 5. Esteira ergométrica adaptada para ratos	24
Figura 6. Esquema do desenho experimental	25

Capítulo 1

Figura 1. Effect of the aging process on methylation parameters in rat hippocampus	32
Figura 2. Effect of the single exercise session on DNMT3b (A) and DNMT1 (B) levels in rat hippocampus	33
Figura 3. Effect of the single exercise session (A) and chronic protocol (B) on H3-K9 methylation levels in rat hippocampus	33

Capítulo 2

Figura 1. Effects of the single exercise session (20min) on global HDAC activity in striatum from adolescent (Panel A), young adult (Panel B) and aged (Panel C) Wistar rats	52
Figura 2. Effects of the chronic treadmill protocol (2 weeks, 20 min daily) on global HDAC activity in striatum from adolescent (Panel A), young adult (Panel B) and aged (Panel C) Wistar rats	53

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ANOVA	Análise de Variância
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
Cdk5	Quinase Dependente de Ciclina 5
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
CRF	Fator Liberador de Corticotrofina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMTs	DNA Metiltransferases
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EGTA	Ácido tetracético etilenoglicol
EXE	Exercitado
EXE1h	Exercitado morto 1h após o exercício
EXE18h	Exercitado morto 18h após o exercício
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
HAT	Histona Acetiltransferase
HCl	Ácido Clorídrico
HDAC	Histona Desacetilase
HTMs	Histona Metiltransferases
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
KCl	Cloreto de Potássio

LTM	Memória de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MBPs	Proteínas ligadoras de metil-CpG
m/min	Metros por minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial de Hidrogênio
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluoreto
POG	Privação de oxigênio e glicose
PP1	Proteína fosfatase do tipo-1
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SED	Sedentário
SNC	Sistema Nervoso Central
SED1h	Sedentário morto 1h após o exercício
SED18h	Sedentário morto 18h após o exercício
TCA	Ácido Tricloroacético
Tris-HCl	Tris-Hidroclorito
VO₂ max	Consumo máximo de oxigênio
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
μL	Microlitro

RESUMO

A epigenética é considerada como a interface entre os componentes genéticos, o ambiente externo e o estilo de vida. Estudos recentes sugerem uma relação entre o processo de envelhecimento cerebral e o desequilíbrio de mecanismos epigenéticos, contudo, estes dados ainda não são conclusivos. Ainda, tem sido demonstrado que o exercício físico parece alterar marcadores epigenéticos em hipocampo de ratos adultos jovens. Sabe-se que o grau de neuroplasticidade varia com a idade e que as estruturas encefálicas podem responder diferentemente à exposição ao exercício. Assim, este trabalho teve como objetivo central investigar o impacto do exercício físico sobre parâmetros epigenéticos em hipocampo e estriado de ratos Wistar em diferentes fases do desenvolvimento. Na primeira etapa, avaliou-se os efeitos do processo de envelhecimento e do exercício físico sobre parâmetros de metilação, conteúdo das enzimas DNA metiltransferase 1 (DNMT1) e DNA metiltransferase 3b (DNMT3b) e níveis de metilação da histona H3-K9 em hipocampus de ratos Wistar adultos jovens (3 meses) e envelhecidos (20 meses). Os animais foram submetidos a diferentes protocolos de exercício físico: sessão única, que constituiu em corrida em esteira durante 20 minutos, ou treinamento crônico, caracterizado pela corrida em esteira por 20 minutos durante duas semanas. Ainda, no intuito de verificar os efeitos agudos e tardios do exercício, os animais foram decapitados 1 ou 18 horas após a sessão única ou o último treino do protocolo crônico. Observou-se um perfil de hipometilação global nos animais envelhecidos, uma vez que este grupo apresentou uma redução no conteúdo hipocampal da enzima DNMT1 e nos níveis de metilação da histona H3-K9. A sessão única de exercício reduziu agudamente o conteúdo hipocampal das enzimas DNMT1 e DNMT3b no grupo adulto jovem, um indicativo de aumento da atividade transcricional e expressão gênica. No entanto, não afetou estes marcadores no grupo envelhecido. Além disto, a sessão única de exercício induziu uma redução nos níveis de metilação da histona H3-K9 no grupo adulto jovem, enquanto que, no grupo envelhecido induziu um aumento neste parâmetro em ambos os tempos testados. Ainda, o protocolo crônico reduziu de forma persistente este parâmetro no grupo adulto jovem, mas não alterou em ratos envelhecidos. Na segunda etapa, analisou-se o efeito destes mesmos protocolos de exercício sobre a atividade global da enzima Histona Desacetilase (HDAC) em estriado de ratos Wistar em diferentes fases do desenvolvimento, adolescentes (25 dias), adultos jovens (3 meses) e envelhecidos (20 meses). A sessão única de exercício induziu efeitos persistentes na atividade da HDAC nos adolescentes, visto que o grupo exercitado apresentou uma diminuição neste parâmetro em ambos os tempos testados, sugerindo um aumento nos níveis de acetilação de histonas e ativação da maquinaria transcricional. No entanto, o exercício não alterou a atividade desta enzima nos demais grupos, ratos adultos

jovens e envelhecidos. Estes resultados sugerem que o exercício físico moderado de corrida em esteira é capaz de induzir mudanças epigenéticas em encéfalo de ratos, o que pode alterar a atividade transcricional, e assim, modular a expressão de genes específicos envolvidos com a função cerebral. Além disso, demonstramos que a modulação epigenética em resposta ao exercício ocorre de forma protocolo e idade-dependentes.

ABSTRACT

Epigenetics is considered as the interface between the genetic components, the external environment and lifestyle. Recent studies suggest a relationship between the brain aging process and the imbalance of epigenetic mechanisms, however, these data are not conclusive. Moreover, it has been shown that exercise seems to alter epigenetic markers in the hippocampus of adult rats. It is known that the neuroplasticity degree varies with age and that the brain structures may respond differently to exercise exposure. Therefore, this work was mainly aimed to investigate the impact of physical exercise on epigenetic parameters in the hippocampus and striatum of rats at different stages of development. In the first moment, we evaluated the effects of the aging and exercise on methylation parameters, DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and DNA methyltransferase 3b (DNMT3b) content and histone H3-K9 methylation levels in hippocampi from young adult (3 months) and aged (20 months) Wistar rats. The animals were subjected to different exercise protocols: a single session, which consisted in running on a treadmill for 20 minutes, or chronic training, characterized by running on a treadmill for 20 minutes during two weeks. Moreover, in order to examine the acute and delayed effects of exercise, the animals were decapitated 1 or 18 hours after the single session or the last training session of chronic protocol. It was observed a global hypomethylation profile in the aged animals, since this group showed a reduction on hippocampal DNMT1 enzyme content and on histone H3-K9 methylation levels. The single exercise session acutely reduced hippocampal content of DNMT1 and DNMT3b enzymes in the young adult group, an indicative of increased transcriptional activity and gene expression. However, did not affect these markers in the aged group. Furthermore, the single exercise session induced a reduction on histone H3-K9 methylation levels in the young adult group, while in the aged group, increased this parameter in both tested times. Moreover, the chronic protocol also reduced persistently this parameter in the young adult group, but did not alter in the aged rats. In the second moment, it was analyzed the effect of these same exercise protocols on the global enzyme Histone Deacetylase (HDAC) activity in the striatum of Wistar rats at different stages of development, adolescents (25 days), young adult (3 months) and aged (20 months). The single exercise session induced persistent effects on HDAC activity in the adolescents, given that the exercised group showed a decrease in this parameter in both time points evaluated, suggesting increased levels of histone acetylation and transcriptional machinery activation. However, the exercise did not alter this enzyme activity in the other groups, young adult and aged rats. These results suggest that moderate exercise treadmill running it is able to induce epigenetic changes in rat brain, which might alter the transcriptional activity, and thus might modulate the expression of specific genes involved with

the brain function. Furthermore, we demonstrated that epigenetic modulation in response to exercise occurs in a protocol and age-dependent manner.

Introdução

1.1 Epigenética

A epigenética, expressão que significa “acima do genoma”, consiste no estudo das alterações na expressão de genes específicos que independem de mudanças na sequência primária do DNA. E sim, a epigenética envolve modificações estruturais na cromatina decorrentes da interação do indivíduo com o ambiente (Bird, 2007).

A estrutura da cromatina consiste em uma unidade de DNA dividida em duas espirais, as quais se enrolam em torno de um octâmero protéico formado por quatro pares de histonas: H2A, H2B, H3 e H4, conforme observado na figura 1 (Kouzarides, 2007; Strahl e Allis, 2000).

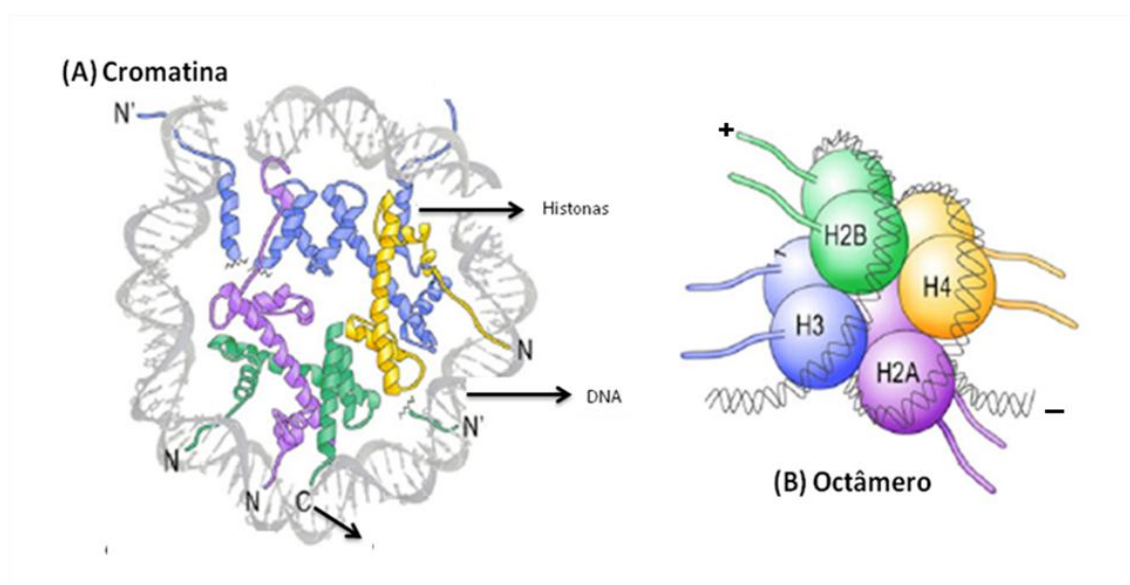


Figura 1 (A) Estrutura da cromatina, formada por histonas envolvidas por duas moléculas de DNA; **(B)** Octâmero proteico formado por quatro pares de histonas (Adaptada de Gräff e Mansuy, 2008).

Assim, os mecanismos epigenéticos englobam modificações tanto na molécula de DNA, quanto em histonas. A molécula de DNA é suscetível a uma única modificação epigenética, a metilação, reação catalisada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs). Estas enzimas transferem o grupo metil da molécula doadora S-adenosilmetionina (SAM) para a posição 5' do anel piramidal da citosina, formando 5-metil desoxicitidina e S-adenosil homocisteína (SAH), processo que resulta na redução da transcrição gênica (Figura 2) (Reik et al., 1999). Existem 2 famílias de DNMTs: as DNMTs de manutenção, responsáveis por manter os padrões de metilação durante o processo de replicação celular, incluindo as DNMT1, as quais utilizam como substrato DNA hemi-metilado; e as DNMTs com função de metilação propriamente dita dos genes (mecanismo denominado como *de novo* metilação). Estas são divididas em DNMT3a e DNMT3b, as quais estão envolvidas na transferência de grupos metil para sítios previamente não metilados (Lei et al., 1996; Reik et al., 1999).

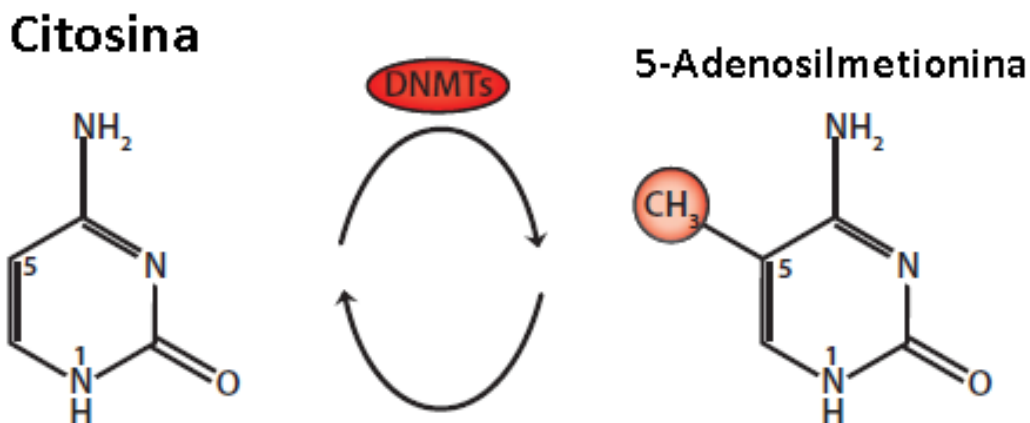


Figura 2 Reação de metilação do DNA (Adaptado de Zovkic et al., 2013).

A metilação ocorre preferencialmente nas chamadas ilhas “CpG”, regiões do DNA com grande número de resíduos de Citosina e Guanina adjacentes, localizados na região promotora de vários genes (Gupta et al., 2010; Reik et al., 1999). Uma das propostas para explicar os possíveis mecanismos envolvidos com a repressão gênica mediada pela metilação do DNA seria através da diminuição direta da transcrição por meio do bloqueio dos fatores de transcrição aos seus sítios de ligação (Prendergast e Ziff, 1991). Outro modelo incluiria a participação de proteínas ligadoras de metil-CpG (MBPs), as quais reconhecem o DNA metilado e recrutam complexos co-repressores. Estes incluem a participação de outras enzimas, como as Histona Desacetilases (HDACs), para silenciar indiretamente a transcrição gênica (Nan, 1998).

Já as histonas podem sofrer diversas modificações em sua cauda N-terminal, incluindo a acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação e ADP-poli-ribosilação (Figura 3). Uma vez que estas proteínas são modificadas, elas remodelam a cromatina, tornando-a mais ou menos compacta, o que influencia o processo de transcrição gênica. Este processo tem sido reconhecido como “o código das histonas” (Strahl e Allis, 2000; Kouzarides, 2007). A acetilação e a metilação de histonas serão o foco deste estudo.

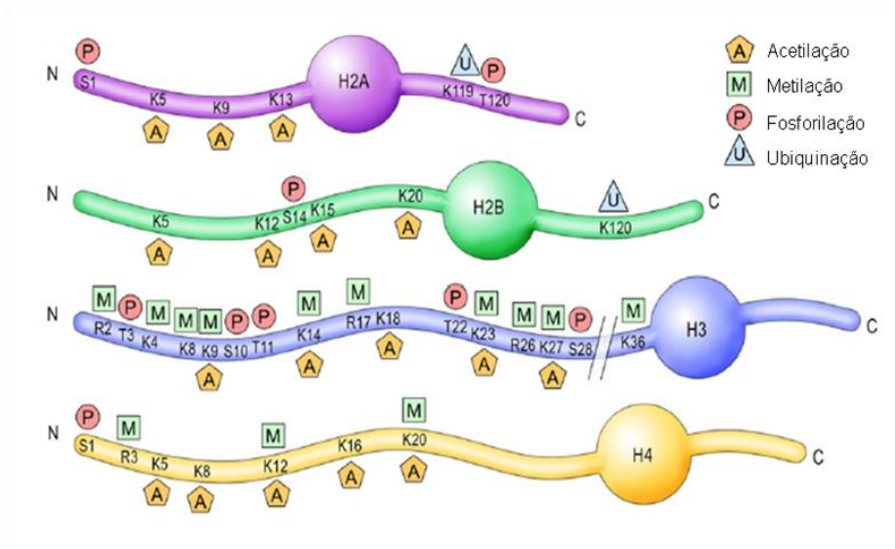


Figura 3 Modificações epigenéticas em histonas (Adaptada de Gräff e Mansuy, 2008).

O estado dinâmico de acetilação e desacetilação de histonas é regulado por dois grupos de enzimas, as Histonas Acetiltransferases (HAT) e as Histonas Desacetilases (HDAC), respectivamente. A HAT catalisa a adição do grupo acetil da molécula doadora Acetil-coenzima A (acetil-CoA) na cauda N-terminal das histonas, o que neutraliza a carga positiva das extremidades destas proteínas e conseqüentemente enfraquece as interações eletrostáticas com o DNA, carregado negativamente. Este processo causa o relaxamento da estrutura da cromatina, facilitando a ação de fatores transcricionais, o que pode aumentar a expressão de genes específicos. Inversamente, as HDAC promovem a desacetilação das histonas, ligando-se fortemente ao DNA, tornando a estrutura da cromatina mais compacta, contribuindo para o silenciamento gênico (Figura 4A e 4B). Assim, o sistema HAT-HDAC desempenha um papel chave na modificação da estrutura da cromatina, o que está diretamente relacionado ao controle do processo transcricional e expressão gênica (Kouzarides, 2007; Khan e La Thangue, 2008).

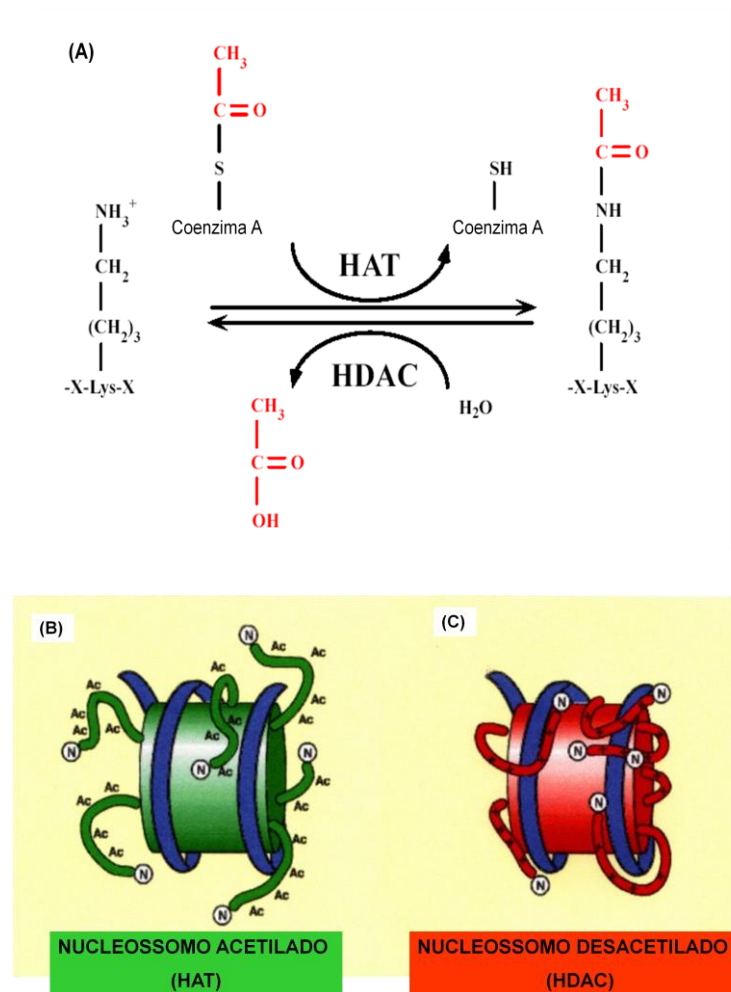


Figura 4 (A) Acetilação e desacetilação de histonas, pela ação da HAT e da HDAC; (B) Eucromatina, cromatina “aberta”; (C) Heterocromatina, cromatina condensada (Adaptado de <http://bricker.tcnj.edu/Amb/amble9.html>).

Diferente da acetilação de histonas, frequentemente associada com a ativação da atividade transcricional e aumento da expressão gênica, a metilação das histonas, catalisada por enzimas denominadas Histona Metiltransferases (HTMs), pode resultar em ativação ou repressão gênica. Estas respostas dependem de fatores como a histona e a lisina onde ocorre a adição do grupo metil, além do grau de metilação (mono, di ou tri-metilação). Por exemplo, tem sido descrito que a mono-metilação da histona H3 na lisina 9 (H3-K9) resulta em ativação transcricional, enquanto que a di e tri-metilação da H3-K9 estão associadas à repressão e ao silenciamento gênico. Inversamente, no caso da histona H3 na lisina 4 (H3-K4), a di e a tri-metilação induzem o relaxamento da estrutura da cromatina, contribuindo para a ativação do processo transcricional (Gupta et al., 2010).

É importante destacar que os mecanismos epigenéticos não são eventos isolados, e sim, atuam em conjunto. Eles interagem e influenciam um ao outro para regular a estrutura da

cromatina, modulando a expressão de genes específicos, inclusive de genes relacionados com a função cerebral (Gupta et al., 2010; Lubin e Sweatt, 2007).

1.2 Epigenética e Função Cerebral

O papel de mecanismos epigenéticos em diferentes fases do desenvolvimento cerebral tem sido considerado nas últimas décadas. Especificamente, as modificações epigenéticas parecem ser importantes fatores reguladores durante o desenvolvimento neural, além de estarem envolvidas na plasticidade sináptica, no comportamento, no aprendizado e na memória. Ainda, o desequilíbrio nos níveis de acetilação de histonas e de metilação de histonas e de DNA estão associados ao processo de envelhecimento fisiológico. Além de que, estão presentes em condições neurodegenerativas e na patogênese de disfunções cognitivas e mentais, como a Síndrome de Rett, esquizofrenia e depressão (Jingwen et al., 2013; Saha e Pakan, 2006; MacDonald e Roskams, 2009).

1.2.1 Acetilação de histonas e Função Cerebral

A modulação da acetilação de histonas sobre a função cerebral é o mecanismo epigenético melhor compreendido. Estudos experimentais recentes tem relacionado este mecanismo a diversos eventos nas diferentes fases do desenvolvimento, como por exemplo, predisposição à adição a drogas de abuso e a formação da memória.

Foi demonstrado que o consumo de drogas de abuso durante a adolescência aumentou os níveis centrais de acetilação de histonas em roedores, sugerindo o envolvimento deste mecanismo epigenético em alterações comportamentais e neurais relacionadas à adição (Renthal e Nestler, 2008; Quown e Wood, 2010). Especificamente, foi demonstrado que a administração crônica de etanol induziu um aumento na atividade da enzima acetiladora de histonas, a HAT, em córtex pré frontal de ratos Wistar de 30 dias, além de aumentar os níveis de acetilação das histonas H3 e H4 na região promotora de genes envolvidos com a adição, como o cFos, FosB e quinase dependente de ciclina 5(Cdk5) (Pascual et al., 2012). Em estriado, Kumar e colegas (2005) demonstraram que a administração de cocaína aumentou a acetilação nos genes promotores do cFos e FosB. Ainda, um aumento na acetilação da histona H3 foi observado na região promotora dos genes Cdk5 e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Alguns autores também tem descrito que acetilação de histonas parece ser um

componente chave nos processos de formação e consolidação da memória em roedores adultos jovens (Fontán-Lozano et al., 2008; Cotman et al., 2007; Bousiges et al., 2013; Bredy et al., 2007). Fontán-Lozano e colaboradores (2008) observaram que após serem submetidos ao teste de reconhecimento de objeto, os animais apresentaram aumento nos níveis hipocampais de acetilação da histona H3. Neste contexto, é interessante citar que o hipocampo exerce papel crucial na plasticidade sináptica e nos processos de aprendizado e memória (Cotman et al., 2007). Bousiges e colegas (2013) observaram ainda que além de induzir aumento nos níveis hipocampais de acetilação da histona H3, a exposição à este mesmo paradigma também alterou os níveis de acetilação das histonas H4 e H2B. Somado a isto, foi demonstrado que a acetilação de histonas pode influenciar a memória de extinção, uma vez que elevados níveis de acetilação da histona H4 no éxon IV do gene do BDNF foi verificado em córtex pré frontal de camundongos expostos ao teste de medo condicionado (Bredy et al., 2007).

Dados obtidos em nosso laboratório mostraram uma redução nos níveis de acetilação global da histona H4 em hipocampus de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento normal, o qual foi associado a um déficit da memória aversiva, avaliado através da tarefa da esquiwa inibitória (Lovatell et al., 2013). Adicionalmente, ratos de 24 meses de idade submetidos à tarefa do labirinto aquático (*Water Maze*), apresentaram déficit de memória, além de menores níveis hipocampais de acetilação das histonas H3 e H4 quando comparados ao grupo adulto jovem (Castellano, 2012). Estes achados podem estar relacionados a uma diminuição na expressão hipocampal de genes como o do BDNF em ratos envelhecidos (Blalock et al., 2003; Rowe et al., 2007). Cabe descrever que o hipocampo é uma região encefálica extremamente suscetível aos processos degenerativos decorrentes do envelhecimento. Isto pode explicar, pelo menos em parte, o comprometimento das funções intelectuais em idosos (Mattson et al., 2006), o qual parece ser influenciado pela modulação dos níveis de acetilação de histonas.

É importante salientar que a desacetilação global de histonas parece aumentar no processo inicial de apoptose neuronal na neurodegeneração (Rouaux et al., 2003). Além de que, uma elevada atividade da HDAC tem sido observada durante o processo de morte neuronal. Pode-se destacar ainda que a perda do balanço entre a atividade das enzimas HAT e HDAC a favor da HDAC parece ser um mecanismo crítico e decisivo envolvido na disfunção e toxicidade neuronal, fatores relacionados às doenças neurodegenerativas (Saha e Pakan, 2006). Assim, agentes que promovam aumento no nível de acetilação de histonas, tais como ativadores da HAT e inibidores da HDAC, parecem ser recursos terapêuticos promissores não somente na melhora da memória, como também no manejo de doenças neurodegenerativas.

Com base nestas evidências, estudos pré-clínicos tem investigado o uso de inibidores de HDAC no desempenho em testes de memória. Foi observado que a Tricostatina pode aumentar a potenciação de longa duração (LTP) (Levenson et al., 2004), enquanto que a administração sistêmica ou intra-hipocampal de Butirato de Sódio parece estar relacionada com a melhora da memória para o condicionamento ao medo (Vecsey et al., 2007) e para a memória de reconhecimento de objetos em roedores jovens (Stefanko et al., 2009). Levenson e colegas (2004) também observaram que o Butirato de Sódio aumentou a memória de longa duração (LTM) no teste de medo condicionado, o que foi acompanhado por um aumento nos níveis hipocampais de acetilação da H3 após o treino. Ainda, foi demonstrado que este mesmo inibidor de HDAC pode melhorar o desempenho de animais envelhecidos no teste de reconhecimento de objetos (Reolon et al., 2011). Conseqüentemente, estes dados sugerem que o estado de hiperacetilação de histonas exerce um papel crucial na formação e consolidação da memória, assim como pode reverter déficits de memória associados ao processo de envelhecimento.

1.2.2 Metilação de histonas e Função Cerebral

Embora os efeitos da acetilação de histonas sejam melhor estudados, o papel da metilação destas proteínas sobre a função cerebral tem sido pouco explorado. Foi descrito que a metilação da histona H3-K4 parece estar envolvida em eventos como a neurogênese (Lim et al., 2009) e no desenvolvimento do tubo neural durante o período embrionário (Patel et al., 2007). Enquanto que, a metilação da histona H3-K9 tem demonstrado participar nos processos de diferenciação neural e mielinização de oligodendrócitos (Sen e Synder, 2011). Estes achados sugerem que a metilação da histona H3, independentemente da lisina, parece exercer um importante papel na maturação do SNC.

Gupta e colegas (2010) investigaram a relação entre os níveis de metilação da histona H3 durante a consolidação da memória em hipocampo de ratos adultos jovens expostos à tarefa de medo condicionado. Os autores observaram que esta tarefa induziu tri-metilação da histona H3-K4, marcador associado à ativação do processo transcricional; e di-metilação da histona H3-K9, mecanismo envolvido com a redução do processo transcricional, sugerindo assim, aumento e repressão de genes específicos durante a formação da memória. Outro achado interessante deste estudo foi que os animais tratados com Butirato de Sódio, um inibidor da HDAC, apresentaram elevados níveis hipocampais de tri-metilação da histona H3-K4 e reduzidos níveis de di-metilação da histona H3-K9 após o treino. Estes dados nos

permitem inferir que a metilação de histonas contribui para a formação da memória a longo prazo, e que a acetilação de histonas atua de forma conjunta com a metilação durante este processo.

Também tem sido observado o envolvimento da metilação de histonas, em especial da H3-K27, H3-K4 e H3-K9, em transtornos de comportamento e de humor (Xu e Andreassi, 2011; Sun et al., 2013). Adicionalmente, Hunter e colaboradores (2009) demonstraram alterações significativas nos níveis de metilação destas histonas no giro denteado de animais expostos a um modelo de estresse agudo e crônico, evidenciando o envolvimento deste mecanismo em resposta a exposição ao estresse.

Além de que, um declínio progressivo nos níveis globais de metilação de histonas tem sido observado em oligodendrócitos durante o processo de envelhecimento normal (Shen e Casaccia-Bonnel, 2008). Somado a isso, alterações nos níveis de metilação de histonas tem sido detectadas em diversas doenças neurodegenerativas, como Ataxia de Friedreich, Doença de Huntington e Doença de Alzheimer (Schmucker e Puccio, 2010). Ainda, Walker e colegas (2013) observaram um aumento significativo nos níveis neuronais de metilação da histona H3-K9 em modelo animal de Alzheimer. Apesar destas evidências, a relação entre os níveis de metilação da histona H3-K9 e o processo de envelhecimento cerebral fisiológico tem sido pouco explorada.

1.2.3 Metilação do DNA e Função Cerebral

A influência que os fatores ambientais exercem sobre os níveis de metilação do DNA sobre a função cerebral tem sido observada desde o período pré-natal, o que parece resultar em alterações persistentes na expressão de inúmeros genes na vida adulta. Para exemplificar, podemos citar o interessante estudo de Mueller e colegas (2008), onde camundongos fêmeas prenhas foram expostas ao estresse durante os períodos iniciais da gestação, em que o SNC apresenta maior vulnerabilidade a insultos. Os autores observaram que os filhotes machos (10-16 semanas) apresentaram alterações comportamentais nos testes de nado forçado e suspensão da cauda. Ainda, estes mesmos animais, aos 4 meses de idade, demonstraram hipometilação do DNA no gene promotor do fator liberador de corticotrofina (CRF) e hipermetilação no receptor de glicocorticóide em tecido hipotalâmico. Também foi observada uma hiperresponsividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), um importante regulador homeostático que responde à agentes estressores, e é extremamente sensível ao

impacto de experiências adversas precoces. Cabe destacar que a exposição ao estresse durante o período gestacional tem sido associada ao aumento da incidência de doenças neuropsiquiátricas, como depressão, ansiedade, esquizofrenia e autismo (Koenig et al., 2002; Nestler et al., 2002; Gillott e Standen, 2007). Assim, estes dados sugerem que a modulação da metilação do DNA pode estar envolvida com os efeitos comportamentais induzidos pelas experiências e exposições ambientais durante os estágios iniciais do desenvolvimento.

Também foi demonstrado que este parâmetro epigenético pode ser modificado após o nascimento, uma vez que filhotes de ratos que recebem maior qualidade de cuidados maternos desenvolvem uma maior capacidade de reação comportamental a eventos estressantes. Este achado foi associado a um estado de hipometilação de DNA e maior expressão hipocampal de receptores de glicocorticóides (Weaver et al., 2004). Ainda, ratos que receberam um número reduzido de *groomings*, um componente do cuidado materno, demonstraram prejuízos na memória espacial e aprendizado, o que estava associado com uma alteração nos níveis hipocampais do gene do BDNF (Liu et al., 2000). Para finalizar, algumas evidências tem sugerido que o efeito do cuidado materno sobre a expressão de genes específicos pode ter impacto transgeracional por meio da modulação dos níveis de metilação de DNA (Champagne, 2008).

Estudos também têm elucidado o envolvimento da metilação do DNA nos processos de aprendizado, memória e plasticidade sináptica em roedores adultos. Foi observado que o teste de medo condicionado induziu um aumento na expressão do gene da DNMT3a em hipocampo (Feng et al., 2010). Ainda, o uso de inibidores globais de DNMTs foi capaz de bloquear a indução da LTP, como também alterou os níveis hipocampais de metilação de genes implicados na plasticidade sináptica e memória, como o BDNF, relina e proteína fosfatase do tipo-1 (PP1) (Levenson et al., 2006; Lubin et al., 2008; Miller e Sweatt, 2007). Adicionalmente, a atividade das DNMTs tem sido associada ao processo de maturação e desenvolvimento do SNC (Feng et al., 2005). Especificamente, foi demonstrado que as DNMT1 são altamente expressas no cérebro, e que neurônios deficientes nesta enzima são eliminados nas primeiras 3 semanas de vida pós natal. Ainda, modelos animais nocaute para os genes das enzimas DNMT1 e DNMT3 apresentaram grave anormalidade do desenvolvimento (Dean et al., 2005), sugerindo a importância destas enzimas durante o desenvolvimento embrionário. Somado a isso, estudos sugerem um papel fundamental das DNMT3a e DNMT3b nos estágios tardios e precoces da neurogênese, respectivamente (MacDonald e Roskams, 2009). Outro interessante estudo mostrou que estas enzimas parecem participar de respostas à lesão cerebral, uma vez

que níveis neuronais reduzidos de DNMT1 diminuíram significativamente o tamanho da área isquêmica (Endres et al., 2000).

Alguns autores têm apontado que ocorre um desequilíbrio nos padrões de metilação do DNA durante o processo de envelhecimento, o que pode comprometer a diferenciação e o funcionamento normal das células (DiMauro e David, 2009; Penner et al., 2010; Kaliman et al., 2011). Wilson e colegas (1987) demonstraram uma redução significativa no conteúdo de 5-metil desoxicitidina, um dos produtos resultantes do processo de metilação do DNA, no intestino delgado e fígado de roedores, sugerindo uma tendência à hipometilação global do DNA associado com o processo de envelhecimento. De acordo, outros estudos antigos também observaram uma hipometilação global em tecido cardíaco e linfócitos T de humanos e outros mamíferos (Vanyushin et al., 1970; Golbus et al., 1990). Um aspecto importante a ser descrito neste contexto é que a hipometilação do DNA observada durante o processo de envelhecimento tem sido apontada como um importante fator envolvido com a carcinogênese, diminuindo a expressão de pro-oncogenes específicos (Richardson et al., 2002). Por outro lado, tem sido observado um aumento da metilação de DNA em rins de ratos envelhecidos (Vanyushin et al., 1973), sugerindo que esta modulação possa variar de acordo com o tecido analisado. Apesar destas evidências, o impacto do processo de envelhecimento sobre os níveis de metilação do DNA no encéfalo tem sido pouco estudado, e ainda não há um consenso sobre seu efeito, talvez devido à complexidade destes mecanismos. Siegmund e colegas (2007), em um estudo *post-mortem*, observaram que o envelhecimento induziu hipo e hipermetilação do DNA em regiões promotoras de forma gene-específica em córtex cerebral. No entanto, até o momento, de nosso conhecimento, não existem estudos que avaliem este parâmetro em outras estruturas encefálicas, como por exemplo, o hipocampo. Além de que, ainda não foram elucidados possíveis mecanismos moleculares envolvidos com as alterações nos níveis de metilação do DNA no encéfalo envelhecido, refletindo a necessidade de se analisar aspectos como o conteúdo encefálico das DNMTs.

1.3 Exercício Físico, Epigenética e Função Cerebral

Estudos experimentais têm demonstrado que o exercício físico constitui um importante estímulo ambiental capaz de induzir alterações epigenéticas no encéfalo, o que pode alterar a maquinaria transcricional de genes específicos envolvidos com a função cerebral (Feinberg, 2008; Gomez-Pinilla et al., 2011, Elsner et al., 2011; Lovatell et al., 2013).

O exercício físico tem recebido atenção nas últimas décadas devido ao seu potencial efeito terapêutico relacionado com a melhora da função cognitiva (Cotman e Berchtold, 2002; Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005); redução da ansiedade e depressão (Martinsen, 2008) e a capacidade de proteger o cérebro contra desordens neurodegenerativas (Goodwin et al., 2008; Honea et al., 2009). Dentre os mecanismos envolvidos com o aprimoramento da função cognitiva induzida pelo exercício, pode-se citar o aumento das conexões sinápticas (Pysh e Weiss, 1979), da neurogênese hipocampal (Fabel et al., 2003; Van Praag et al., 1999) e do aumento da expressão de BDNF em regiões encefálicas como hipocampo e córtex (Vaynman et al., 2006; Gomes da Silva et al., 2012; Hopkins et al., 2011).

Há evidências de que a prática regular do exercício melhora a função cerebral tanto em humanos, quanto em animais de experimentação, em diferentes fases do desenvolvimento (Winter et al., 2007; Sibley e Beilock, 2007). Contudo, deve-se considerar que as respostas associadas ao exercício físico dependem de diversos fatores, dentre eles o protocolo de treinamento utilizado, variando conforme a frequência, a duração e a intensidade do esforço e a idade (Narath et al., 2001).

Estudos clínicos demonstram uma relação positiva entre a prática regular de exercício, aprendizado e memória em crianças em idade escolar (Sibley e Etnier, 2003). Inversamente, baixo nível de atividade física em crianças e adolescentes está correlacionado a menores habilidades cognitivas (Archer e Kostrezewa, 2012). Estes achados corroboram resultados de ensaios experimentais. Neste contexto, pode-se citar o estudo de Uysal e colaboradores (2005), onde um protocolo de exercício aeróbico, sessões diárias de corrida em esteira por 30 minutos durante 8 semanas, aprimorou a performance da memória espacial em ratos de 22 dias, avaliado na tarefa do labirinto aquático (*Water Maze*), e também induziu um aumento na neurogênese na região CA1 e CA3 do hipocampo. De acordo com estes achados, animais de 21 dias submetidos a um protocolo de corrida semelhante por um período de 39 dias também apresentaram melhora da memória espacial, o qual foi relacionado ao aumento hipocampal da expressão de BDNF (Gomes da Silva et al., 2012). Apesar destas evidências, o conhecimento sobre o mecanismo de ação pelo qual o exercício altera a expressão deste importante fator neurotrófico tem sido pouco explorado em ratos adolescentes.

Os efeitos benéficos do exercício também têm sido amplamente observados em ratos adultos jovens. Estudos demonstram que diferentes protocolos como corrida em esteira, natação e corrida em roda, podem melhorar o desempenho de roedores em tarefas de memória como labirinto aquático (*Water Maze*), (Berchtold et al 2010; Pietrelli et al., 2012),

reconhecimento de objetos (Hopkins et al., 2011) e esquivas inibitórias (Kim et al., 2010; Radak et al., 2006), respectivamente. Ensaio prévios conduzidos em nosso laboratório demonstraram que a corrida em esteira ergométrica durante 20min/dia por um período de 2 semanas foi capaz de reduzir o dano isquêmico induzido pela privação de oxigênio e glicose (POG) em fatias hipocâmpais de ratos Wistar adultos jovens, sugerindo-o como um protocolo neuroprotetor de exercício físico (Scopel et al., 2006). Considerando que há evidências de que o exercício físico aumenta os níveis de BDNF, e que a expressão deste fator neurotrófico pode ser modulada por mecanismos epigenéticos, um estudo posterior do grupo investigou parâmetros epigenéticos, avaliação das atividades das enzimas HAT e HDAC, em hipocampo de ratos Wistar adultos submetidos ao protocolo de exercício neuroprotetor. Foi demonstrado que a única sessão de exercício, corrida em esteira ergométrica por 20 minutos, induziu um aumento na atividade da HAT em combinação com uma diminuição na atividade da HDAC, um indicativo de hiperacetilação de histonas e aumento da atividade transcricional. Estes dados sugerem o envolvimento deste mecanismo epigenético com os efeitos neuroprotetores do exercício físico em ratos adultos jovens (Elsner et al., 2011). Corroborando este achado, Gomez-Pinilla e colegas (2011) observaram que o exercício aumentou os níveis hipocâmpais de acetilação da histona H3, o que estava relacionado com um aumento na expressão do gene BDNF em ratos da mesma idade. Desta forma, pode-se hipotetizar que os efeitos positivos do exercício sobre a função cognitiva de ratos adultos pode estar relacionada, pelo menos em parte, com o aumento da expressão de genes específicos, como o BDNF, por meio da modulação dos níveis de acetilação de histonas. Assim, avaliar o efeito do exercício físico sobre outros parâmetros epigenéticos, como a metilação de histonas e do DNA, torna-se indispensável para uma melhor compreensão das bases moleculares envolvidas com a alteração da expressão gênica induzida pelo exercício.

Inúmeros são os estudos sugerindo que as alterações induzidas pelo envelhecimento podem ser prevenidas ou revertidas pela prática regular de exercício físico. Em humanos, foi demonstrado que a participação em programas de atividade física parece aprimorar as habilidades mentais em idosos saudáveis (Dustman et al., 1984; Elsayed et al., 1980). Ainda, alguns autores inferem que pessoas fisicamente ativas possuem um processamento cognitivo mais rápido (Chodzko et al., 1994). Dados epidemiológicos apontam que o exercício físico pode reduzir tanto o risco quanto a mortalidade induzida por Acidente Vascular Encefálico (AVE) (Lee e Paffenbarger, 1998), além de diminuir a incidência da Doença de Alzheimer em indivíduos com idade superior a 65 anos (Larson et al., 2006). Tem sido descrito ainda que a aquisição de ganhos importantes para conservar e/ou melhorar a capacidade funcional e

cognitiva de pacientes com doenças neurodegenerativas foi observada após estes indivíduos serem submetidos a diferentes protocolos de exercício físico (Friedman et al., 1991; Heyn, 2003; Arkin, 2007), fatores que podem contribuir para a melhora da qualidade de vida desta população.

Neste contexto, podemos citar o trabalho de Herman e colegas (2009), os quais observaram que um protocolo de corrida em esteira durante 6 semanas foi capaz de aperfeiçoar a performance da marcha em pacientes com Doença de Parkinson, incluindo aspectos como aumento da velocidade, do comprimento da passada e cadência. Ainda, evidências mostraram que diferentes modalidades de atividade física, como a prática de Tai Chi, Boxe e Tango podem trazer benefícios em aspectos como o equilíbrio e marcha. Além disto, é capaz de reduzir os episódios de quedas em pacientes com Doença de Parkinson (Li et al., 2012; Combs et al., 2010; Duncan et al., 2012).

Considerando que a prática regular de exercício físico tem sido vista como uma promissora ferramenta na prevenção do declínio das funções cognitivas e/ou no manejo de doenças neurodegenerativas decorrentes do processo de envelhecimento, o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo é relevante. Recentemente, observamos em nosso laboratório que um protocolo crônico de exercício forçado, corrida em esteira ergométrica 20 minutos por dia durante 2 semanas, reverteu a redução nos níveis hipocâmpais de acetilação da histona H4 e os déficits de memória aversiva observados em ratos Wistar de 20 meses de idade (Lovatell et al., 2013). Estes achados sugerem que a alteração dos níveis de acetilação de histonas induzida pelo envelhecimento em resposta ao exercício físico pode estar envolvida neste processo.

Deve-se considerar que os estudos que reportam os efeitos do exercício físico sobre os níveis de acetilação de histonas, tanto em roedores adultos jovens quanto envelhecidos, são restritos ao hipocampo. Assim, nosso grupo de pesquisa tem avaliado esta modulação em outras estruturas encefálicas. Foi demonstrado que o exercício alterou a atividade das enzimas HAT e HDAC em córtex de ratos Wistar de 3 meses de idade (Spindler et al., 2013). No entanto, até o momento, a modulação de parâmetros epigenéticos induzida pelo exercício em estruturas estriatais não havia sido investigada. Cabe descrever que o estriado é uma região encefálica frequentemente associada com o planejamento e a execução do movimento, além de estar envolvida com o comportamento e a cognição (Kravitz e Kreitzer, 2012; O'Callaghan, 2013). Ainda, foi demonstrado que esta estrutura apresenta alta atividade neuronal durante o

exercício (Vissing et al., 1996). Cabe ressaltar também que sua função está correlacionada com as diferentes fases do desenvolvimento, conforme será descrito abaixo.

Tem sido proposto que a integração e a coordenação entre as regiões encefálicas, incluindo o estriado, tornam-se mais refinadas e eficientes durante a adolescência. (Durston et al., 2006; Hwang et al., 2010; Liston et al., 2006; Stevens et al., 2009). Na fase adulta, o estriado parece exercer papel primordial na integração e no desenvolvimento motor (Kravitz e Kreitzer, 2012). Ainda, tendo em vista a ligação anatômica do estriado com as regiões frontal, temporal, lobos insulares, hipocampo e amígdala, alguns autores tem sugerido um papel do estriado na modulação do comportamento e da cognição durante este período. Especificamente, a parte dorsal do estriado parece contribuir para o desenvolvimento e manutenção da associação estímulo-resposta, o que sugere a influência desta região nos processos de aprendizado (Featherstone e McDonald 2004; O'Callaghan, 2013). Dados atuais também mostram o envolvimento do estriado com o sistema de memória implícita, apresentando juntamente com o hipocampo um importante papel de organizar as memórias recentes em memórias consolidadas (Albouy, 2013). Durante o processo de envelhecimento, o estriado recebe atenção especial em função de seu envolvimento em diversas doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Huntington, as quais são caracterizadas pelo comprometimento do sistema motor (Kravitz e Kreitzer, 2012; Lökk, 2000; Tajiri et al., 2010). Apesar destes achados, do nosso conhecimento, não existem estudos que avaliem o efeito do exercício físico em estriado e sua relação com mecanismos epigenéticos durante as diferentes fases do desenvolvimento.

Outro aspecto relevante a ser considerado é que as respostas associadas ao exercício físico também dependem do tempo decorrido após o treino (Lovatell et al., 2013; Hopkins et al., 2011; Radak et al., 2006). Apesar de alguns achados reportarem que os marcadores epigenéticos tem início de ação rápida (dentro de minutos) e são transitórias (até 24 horas) para regular a atividade da maquinaria transcricional do encéfalo adulto (Miller e Sweatt, 2007), o perfil temporal dos efeitos do exercício sobre a modulação de parâmetros epigenéticos tem sido pouco explorado, refletindo a necessidade de investigá-lo.

Justificativa

O aumento da expectativa de vida tornou-se um fenômeno global, e em comparação com a América Latina, encontramos um dos maiores aumentos da população de idosos no Brasil (Coelho e Ramos, 1999). A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê que até 2025, o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos. Ainda, as estatísticas apontam que em 2020, o Rio Grande do Sul deverá ter cerca de 2 milhões de pessoas com mais de 60 anos (Jardim, 2010). Estes dados são relevantes, uma vez que o processo de envelhecimento é caracterizado pelo comprometimento das funções fisiológicas e bioquímicas, fatores que contribuem para que estes indivíduos se tornem mais suscetíveis a um vasto número de patologias, destacando-se as doenças neurodegenerativas (Souza et al., 2007). Estas constituem um importante problema de saúde pública, pois estão associadas à morbidade neurológica e a deficiências motoras e cognitivas (Pinto, 2007). Assim, torna iminente a necessidade de atenção à população idosa. A realização de pesquisas sobre os mecanismos envolvidos nas alterações da estrutura e da função cerebral pode ser útil para a identificação de novas estratégias neuroprotetoras no intuito de melhorar a qualidade de vida destes indivíduos. Neste contexto, alguns estudos tem demonstrado que o exercício físico, caracterizado pelo baixo custo e fácil acesso, parece ser uma importante ferramenta para a prevenção e manejo de doenças neurodegenerativas (Mattson 2000; Kramer et al., 1999) . No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos com os efeitos centrais de sua prática regular ainda não estão elucidados.

Por outro lado, em função de o foco estar no encéfalo envelhecido, pouca atenção tem sido dada para os efeitos do exercício físico sobre encéfalo jovem, sendo relevante, uma vez que o exercício parece contribuir para o crescimento e maturação encefálico durante o desenvolvimento.

Essas premissas constituíram a principal motivação que nos instigou a avaliar o impacto do exercício físico sobre marcadores epigenéticos em encéfalo de ratos Wistar em diferentes fases do desenvolvimento.

Hipótese de trabalho

Nossa hipótese de trabalho é que o exercício físico altere parâmetros epigenéticos em estriado e hipocampo de ratos em diferentes estágios do desenvolvimento, e que esta modulação possa depender da estrutura e idade avaliadas, bem como do protocolo utilizado e do tempo após o treino.

Objetivos

4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta Tese foi investigar o efeito do exercício físico sobre mecanismos epigenéticos em estriado e hipocampo de ratos Wistar em diferentes fases do desenvolvimento.

4.2 Objetivos específicos:

I. Investigar o impacto do processo de envelhecimento normal sobre parâmetros de metilação, especificamente sobre o conteúdo das enzimas DNMT3b, DNMT1 e sobre os níveis de metilação da histona H3-K9 em hipocampo de ratos Wistar.

II. Avaliar o efeito de diferentes protocolos de exercício físico (sessão única e treinamento crônico) sobre os níveis hipocâmpais de metilação da histona H3-K9 e sobre o conteúdo das enzimas DNMT3b e DNMT1 em ratos Wistar de 3 e 20 meses.

III. Avaliar o efeito de diferentes protocolos de exercício físico (sessão única e treinamento crônico) sobre a modulação da atividade da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar de 25 dias e 20 meses de idade.

IV. Analisar o perfil temporal dos efeitos do exercício físico sobre parâmetros epigenéticos, atividade da HDAC, conteúdo das enzimas DNMT1 e DNMT3b e níveis de metilação da histona H3-K9, em hipocampo e estriado de ratos Wistar em diferentes fase do desenvolvimento.

Materiais e Métodos

5.1 Animais

Para avaliar o efeito do processo de envelhecimento e do exercício sobre parâmetros hipocâmpais de metilação, conteúdo das enzimas DNMT1 e DNMT3b e níveis de metilação da histona H3-K9 (capítulo 1), foram utilizados 128 ratos Wistar machos, sendo 64 adultos jovens (3 meses) e 64 envelhecidos (20 meses).

O segundo capítulo desta Tese consistiu em analisar o efeito do exercício físico sobre a atividade da HDAC em estriado de animais adolescentes, adultos jovens e envelhecidos, onde foram utilizados 64 ratos Wistar machos adolescentes (25 dias) e as amostras dos animais de 20 meses descritos acima. Os dados dos animais adultos jovens (3 meses) fizeram parte da dissertação de mestrado do aluno Christiano Spindler deste PPG. Assim, constam no artigo, mas não constituem o corpo de dados desta Tese.

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas (ICBS) da UFRGS e alocados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia (ICBS, UFRGS). Eles foram mantidos em condições padrão com um ciclo normal claro/escuro de 12 horas (estando as luzes apagadas no período das 19hs as 7hs), com ração padronizada e água "*ad libitum*". Todos foram mantidos em caixas plásticas (390 X 320 X 170 mm³), com assoalho recoberto de serragem (maravalha), sendo que os ratos de 25 dias e 3 meses foram distribuídos com 5 animais/caixa, enquanto que, ratos de 20 meses foram mantidos em 2-3 animais/caixa.

5.2 Treinamento – Protocolos de exercício físico

O treinamento consistiu em sessões de corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos, contendo oito pistas individuais separadas entre si por paredes confeccionadas em acrílico (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brasil, Figura 5), sempre entre 14hs e 17hs. Nenhum choque elétrico foi utilizado neste estudo.

Para determinar a velocidade de corrida durante os treinos foi utilizada a medida de consumo máximo de oxigênio indireta (VO_2 máx) recomendada por Brooks e White (1987). Cada animal correu na esteira a uma velocidade inicial baixa seguida por incrementos de 5m/min a cada 3 min até atingir seu ponto de exaustão (incapacidade do rato em continuar a correr). O tempo de fadiga (em minutos) e a velocidade máxima (em m/min) foram tomados como índice da capacidade de exercício e usados para o teste de esforço máximo.



Figura 5 Esteira ergométrica adaptada para ratos

5.3 Desenho Experimental

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais: exercitados (EXE) e sedentários (SED) e submetidos a dois protocolos, sessão única de exercício ou ao treinamento crônico. No primeiro protocolo, os animais EXE correram na esteira durante 20 minutos, enquanto que o treinamento crônico consistiu em corrida diária na esteira, durante 20 minutos, por duas semanas. Os animais inicialmente selecionados que se recusavam a correr eram encorajados com gentis tapinhas em suas costas. Os que, mesmo assim, se recusavam a correr foram excluídos da amostra (Scopel, et al., 2006). O grupo SED foi transportado para a sala de experimentos e os animais foram manipulados exatamente como os do grupo EXE, pelo mesmo tempo, porém sem realizar a corrida, sendo submetidos à esteira sem movimento durante 5 minutos.

Com o intuito de verificar os efeitos agudos e tardios do exercício sobre os diferentes marcadores epigenéticos, os animais foram decapitados em diferentes tempos: 1 hora (EXE1h, SED1h) e 18 horas (EXE18h, SED 18h) após a sessão única ou o último treino da protocolo crônico (Figura 6).

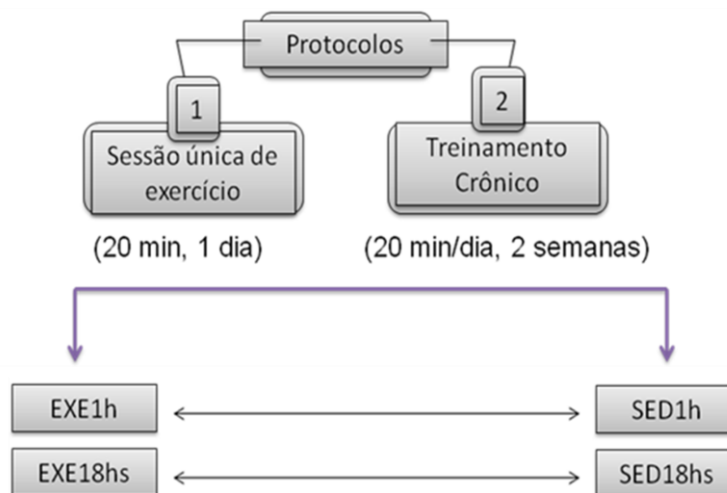


Figura 6 Esquema do desenho experimental

5.4 Dissecção e preparação das amostras

Os animais foram mortos por decapitação e as estruturas encefálicas, hipocampo e estriado, foram rapidamente dissecadas. As amostras foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a realização dos ensaios bioquímicos.

Para a avaliação da atividade das enzimas HDAC e do conteúdo das enzimas DNMT1 e DNMT3b, as estruturas foram homogeneizadas em um volume de 1:3 em tampão de lise gelado contendo 250 mM sacarose; 20 mM Tris-HCl; pH 7,4; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 10 mM KCl; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 0,0001 mM ácido ocadáico. Os lisados foram centrifugados ($16.000\times g$) por 5 minutos a 4°C em um tubo de microcentrifuga e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios.

Para a análise dos níveis de metilação da H3-K9, as amostras foram inicialmente homogeneizadas com tampão de lise específico do kit e após incubação com TCA, HCl e acetona e uma série de centrifugações, o sobrenadante foi removido e pellet foi utilizado nos ensaios.

A concentração de proteína para os ensaios da HDAC foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão; enquanto que, para determinar a concentração de proteína nas amostras dos demais ensaios (conteúdo de DNMT1 e DNMT3b e níveis de metilação da histona H3-K9) utilizou-se o Pierce BCA Protein Assay kit[®].

5.5 Determinação da atividade da enzima HDAC

A atividade da enzima HDAC em estriado foi determinada por meio de um kit-ELISA disponível comercialmente de acordo com as instruções do fabricante (Detecção Fluorimétrica, catálogo #17-372, Upstate Biotechnology). Primeiramente, pipetou-se em cada poço 5µL de tampão, 5µL de amostra e 10µL de substrato e incubou-se a placa por 60min a 30°C. Após, a placa foi incubada por 15min a temperatura ambiente com 10µL de solução ativadora (em cada poço). Finalmente leu-se a placa em um leitor de placas de fluorescência (excitação=360nm, emissão=450nm) durante 60 min e os resultados foram expressos em porcentagem de controle. Cabe destacar novamente que os resultados de ratos adultos jovens estão disponíveis na dissertação de mestrado do aluno Christiano Spindler deste PPG.

5.6 Determinação do conteúdo das enzimas DNMT1 e DNMT3b

O conteúdo de DNMT1 e DNMT3b em hipocampo de ratos Wistar foi determinado por meio de kits disponíveis comercialmente (Detecção Colorimétrica, catálogo #P-3011 e #P-3013 EpiQuik®, respectivamente), realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, as amostras foram incubadas por 120 min com o reagente de captura a 37°C. Após lavagem dos poços, foi pipetado o anticorpo primário e a houve incubação por 60 min, seguida por mais uma série de lavagens e pipetagem do anticorpo secundário. Após incubação de 30min à temperatura ambiente, adicionou-se a solução ativadora. Após 10 min, foi pipetada a solução estabilizadora. O conteúdo das enzimas foi mensurado em um leitor de placas em um comprimento de onda de 450nm e os resultados foram expressos em porcentagem de controle.

5.7 Determinação dos níveis de metilação da histona H3 na lisina 9 (H3-K9)

A metilação da H3-K9 em hipocampo de ratos foi determinada por meio de um kit disponível comercialmente de acordo com as instruções do fabricante (Detecção Colorimétrica, catálogo #P-3018, EpiQuik®).

Inicialmente, as amostras foram incubadas com o tampão de bloqueio por 24 min a 37°, seguido por uma série de lavagens até ser pipetado o anticorpo primário, o qual ficou incubado por um período de 60 min a temperatura ambiente no *orbital shaker* (100rpm).

Depois, cada poço foi lavado para adicionar o anticorpo secundário. Após 30 min, os poços foram novamente lavados e as amostras incubadas com solução ativadora por 10 min. Por fim, pipetou-se solução para estabilizar a reação e a absorbância foi lida em leitor de microplacas em um comprimento de onda de 450nm. Os níveis de metilação da histona H3-K9 foram expressos em porcentagem de controle.

5.8 Estatística

Os dados foram armazenados em planilha (Microsoft Excel). Inicialmente, foi empregado o teste de Kolmogorov-Smirnov, com o intuito de verificar a normalidade dos dados obtidos.

No primeiro capítulo, onde se avaliou o efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre o conteúdo hipocampal das enzimas DNMT1 e DNMT3b e os níveis de metilação da histona H3-K9, os resultados foram expressos em porcentagem de controle (média \pm desvio padrão da média), considerando 100% o grupo SED1h jovem. Os resultados foram analisados utilizando a ANOVA de três vias, onde os fatores considerados foram a idade, o exercício e o tempo da eutanásia após o exercício, seguido pelo *post hoc* de Tukey quando apropriado. O efeito da idade sobre os marcadores epigênicos foi avaliado pelo Teste T de Student.

Na etapa seguinte, para verificar o efeito do exercício sobre a atividade global da enzima HDAC em estriado de ratos adolescentes, adultos jovens e envelhecidos, os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias. Os fatores considerados foram o exercício e o tempo da eutanásia após o exercício, seguido pelo *post hoc* de Tukey quando apropriado. Os dados também foram expressos em porcentagem de controle (média \pm desvio padrão), considerando-se 100% o grupo SED1h de cada idade.

Em todas as etapas, utilizou-se o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Science), versão 16.0, adotando-se nível de significância $p < 0,05$.

5.9 Considerações Éticas

Este trabalho foi apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS, número 21449). O máximo de precaução foi tomado com o intuito de minimizar o sofrimento e de reduzir o número de

animais utilizados, sendo que todos os experimentos estiveram de acordo com os critérios estabelecidos na Lei Arouca (11.794) e no “*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*” (NIH publication No. 80-23, revised 2011).

Resultados

6.1 CAPÍTULO 1

Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters

in rat hippocampus: a preliminary study

Experimental Gerontology, 48: 136–139, 2013.

Doi: 10.1016/j.exger.2012.11.011



Short report

Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: A preliminary study

Viviane Rostirola Elsner^b, Gisele Agustini Lovatel^c, Felipe Moysés^b, Karine Bertoldi^b, Christiano Spindler^b, Laura Reck Cechinel^a, Alysson Renato Muotri^d, Ionara Rodrigues Siqueira^{a,b,*}

^a Departamento de Farmacologia, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d University of California San Diego, School of Medicine, Department of Pediatrics/Rady Children's Hospital San Diego, Department of Cellular & Molecular Medicine, Stem Cell Program, La Jolla, CA 92093, MC 0695, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2012

Received in revised form 21 November 2012

Accepted 22 November 2012

Available online 30 November 2012

Section Editor: Christian Humpel

Keywords:

Aging

Exercise

Rat hippocampus

Epigenetic mechanisms

Methylation markers

ABSTRACT

Regular exercise improves learning and memory, including during aging process. Interestingly, the imbalance of epigenetic mechanisms has been linked to age-related cognitive deficits. However, studies about epigenetic alterations after exercise during the aging process are rare. In this preliminary study we investigated the effect of aging and exercise on DNA methyltransferases (DNMT1 and DNMT3b) and H3-K9 methylation levels in hippocampus from 3 and 20-months aged Wistar rats. The animals were submitted to two exercise protocols: single session or chronic treadmill protocol. DNMT1 and H3-K9 methylation levels were decreased in hippocampus from aged rats. The single exercise session decreased both DNMT3b and DNMT1 levels in young adult rats, without any effect in the aged group. Both exercise protocols reduced H3-K9 methylation levels in young adult rats, while the single session reversed the changes on H3-K9 methylation levels induced by aging. Together, these results suggest that an imbalance on DNMTs and H3-K9 methylation levels might be linked to the brain aging process and that the outcome to exercise seems to vary through lifespan.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Recently, epigenetic mechanisms have been linked to normal aging-related changes in the brain, as well as neuropsychiatric and neurodegenerative diseases (Saha and Pahan, 2006). Epigenetic typically involves modifications in the micro and macrostructure of chromatin, DNA and nuclear proteins, particularly histones, which can modulate the transcriptional machinery and allow long lasting modifications in the genome. DNA and histone methylation, in addition to histone acetylation, are the most extensively studied post-translational modifications, which can influence gene transcription (Kouzarides, 2007).

The histones can be methylated on either lysine (K) or arginine (R)-residues by histone methyltransferases. Site-specific methylation of amino acid residues can condensate or relax the chromatin structure, such as mono-methylation of histone H3 at K9 (H3-K9) is associated to transcriptional activation, whereas transcriptionally silent

regions contain di- and tri-methylation of H3-K9 (Gupta et al., 2010). The impact of aging process and exercise on H3-K9 methylation is poorly exploited. While, DNA methylation is catalyzed by a group of enzymes called DNA methyltransferases (DNMTs), DNMT1, DNMT2, DNMT3a, and DNMT3b that transfer the methyl group from the donor S-adenosylmethionine (SAM) to 5' position of the cytosine pyramidal ring. This process usually represses the gene transcription. DNMT1 is primarily involved in maintenance of DNA methylation after replication, while DNMT3a and DNMT3b are particularly important for *de novo* methylation (Reik et al., 1999). It has been described a genome-wide tendency to DNA hypomethylation in multiple vertebrate organs during aging process (Richardson, 2002; Wilson et al., 1987). In addition, the age-related global hypomethylation is related to DNMT1 deficits in senescent human fibroblasts (Lopatina et al., 2002). However, studies reporting DNMT content in the brain during aging process are lacking.

Interestingly, epigenetic mechanisms have been linked to the age-related cognitive decline, since histone deacetylase (HDAC) inhibitors have been shown to improve memory in aged rodents (Levenson and Sweatt, 2005; Reolon et al., 2011). Accordingly, some evidences demonstrated that exercise ameliorates aging-related cognitive function

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel./fax: +55 51 3308 3121.
E-mail address: ionara@ufrgs.br (I.R. Siqueira).

in rodents (Pietrelli et al., 2012; Radak et al., 2001), in addition, recent findings have demonstrated that the exercise was able to modulate the histone acetylation status, enhancing transcription of genes related to brain function (Elsner et al., 2011; Gomez-Pinilla et al., 2011).

Considering that exercise restores the age-related memory deficits and epigenetic mechanisms which may be related to protective effects of exercise, it is crucial to assess the modulation of exercise on epigenetic parameters in the normal aging process. Therefore, the aim of this investigation was to study the effect of aging and two treadmill exercise protocols, single session of treadmill or chronic treadmill protocol on methylation parameters, specifically, DNA methyltransferases 1 and 3b (DNMT1 and DNMT3b) and histone H3 lysine 9 (H3-K9) methylation levels.

2. Material and methods

2.1. Animals and training

Male Wistar rats of different ages, 3 and 20-months-old were used. The animals were maintained under standard conditions (12-h light/dark, 22 ± 2 °C) with food and water ad libitum. The NIH "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (No. 80-23, revised 1996) was followed in all experiments. The Local Ethics Committee (CEUA/UFGRS) approved all handling and experimental conditions (nr. 21449).

Rats were randomly divided into sedentary (SED) or exercised group (EXE). The exercise training consisted of running sessions in an adapted motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) at 60% of the animals' maximal oxygen uptake (Brooks and White, 1978). Peak oxygen uptake (VO_2) was measured indirectly in all animals before training (Arida et al., 1999; Brooks and White, 1978; Elsner et al., 2011). Two exercise protocols were employed: a single session of treadmill exercise (20 min) and chronic treadmill protocol (20 min running session each day for 2 weeks). SED was handled exactly as the experimental animals and was left on the treadmill for 5 min without any stimulus to run. All the procedures took place between 14:00 and 17:00 h.

2.2. Preparation of samples

In order to verify the acute and delayed effects of exercise, rats were decapitated 1 h and 18 h after a single session or after the last training session of chronic treadmill exercise. The whole hippocampi were quickly dissected out and immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. In the day of the assay, the whole hippocampi were homogenized in 1:3 volumes of specific ice-cold lysis buffer.

2.3. Determination of DNMT1, DNMT3b and methylation of histone H3 lysine 9 (H3-K9) levels

Specific ELISA Assay Kits (Colorimetric Detection, catalog #P-3011, #P-3013, #P-3018, respectively, EpiQuik®) were used. All the procedures were done according to the manufacturer's instructions. The Pierce BCA Protein Assay kit® was used to determine the protein concentration.

2.4. Statistical analysis

All results were expressed as the percent of control (mean \pm S.E.M.). The results were analyzed by Three-Way Analysis of Variance (ANOVA) with age, exercise and time points after the exercise as factors followed by post hoc Tukey's multiple range test when appropriate. The influence of age on epigenetic markers was evaluated by Student's *t*-test. In all tests, $p < 0.05$ was considered.

3. Results

3.1. Aging process reduces epigenetic markers in rat hippocampus

Firstly, we evaluated the effect of the aging process on histone methylation levels. 20-months-old rats hippocampi displayed lower histone H3-K9 methylation levels (about 50%) compared to the young adult group (Fig. 1; $p = 0.0002$). It was also observed that DNMT1 levels were significantly diminished (about 25%) in the aged group (Fig. 1; $p = 0.009$). The level of DNMT3b enzyme was not modified by age.

3.2. Exercise decreased DNMT3b and DNMT1 levels in hippocampi from young adult rats

The DNMT3b levels after single session of exercise are illustrated in Fig. 2A. Three-way ANOVA revealed significant effect of the exercise factor ($F_{(1,39)} = 5.845$; $p = 0.021$), without any effect of age. When measured 1 h after session ended, young adult exercised rats exhibited lower levels of DNMT3b (about 30%) when compared to its sedentary group ($p = 0.042$), while no delayed (18 h) effects of exercise were observed. The DNMT3b levels were not modified by the chronic exercise regimen in all groups (data not shown). Three-way ANOVA showed the effects of both factors, single session of exercise ($F_{(1,39)} = 29.505$; $p < 0.001$) and age ($F_{(1,39)} = 10.073$; $p = 0.003$), on DNMT1 levels (Fig. 2B). In addition, there was a significant interaction between age and exercise factors ($F_{(1,39)} = 7.302$; $p = 0.011$). This exercise protocol diminished acutely DNMT1 levels in hippocampi from 3 months-aged rats (approximately 45%; $p < 0.001$), without any change on this parameter 18 h after exercise. There was no significant effect of chronic exercise protocol on DNMT1 levels in both young adult and aged groups (data not shown).

3.3. Exercise affects differently hippocampal H3-K9 methylation levels in young adult and aged rats

Fig. 3 shows H3-K9 methylation levels in both 3 and 20-months-aged rat hippocampus at different time-points. Three-way ANOVA indicated effect of age ($F_{(1,39)} = 11.818$; $p = 0.002$) and a significant interaction between age and exercise factors (Fig. 3A; $F_{(1,39)} = 42.165$; $p < 0.0001$). This exercise protocol diminished acutely and delayed H3-K9 methylation levels in young adult hippocampi (about 50%, $p = 0.006$ and 60%, $p < 0.0001$, respectively). Differently, hippocampi from 20-months-old rats have higher H3-K9 methylation levels 1 h and 18 h after single exercise session (respectively, about 30 and 100%; $p = 0.024$ and $p < 0.001$).

Additionally, it was observed the effect of both factors, chronic exercise (Fig. 3B; $F_{(1,39)} = 7.431$; $p = 0.011$), and age ($F_{(1,39)} = 10.709$, $p = 0.003$), in addition to an interaction between the factors

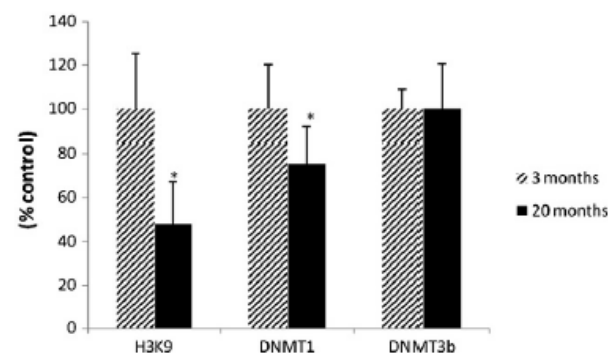


Fig. 1. Effects of aging process on methylation parameters in rat hippocampus. Results are expressed as percentage of young adult group and columns represent mean \pm S.D. ($n = 9-12$). Student *t*-test, * = different as compared to control group.

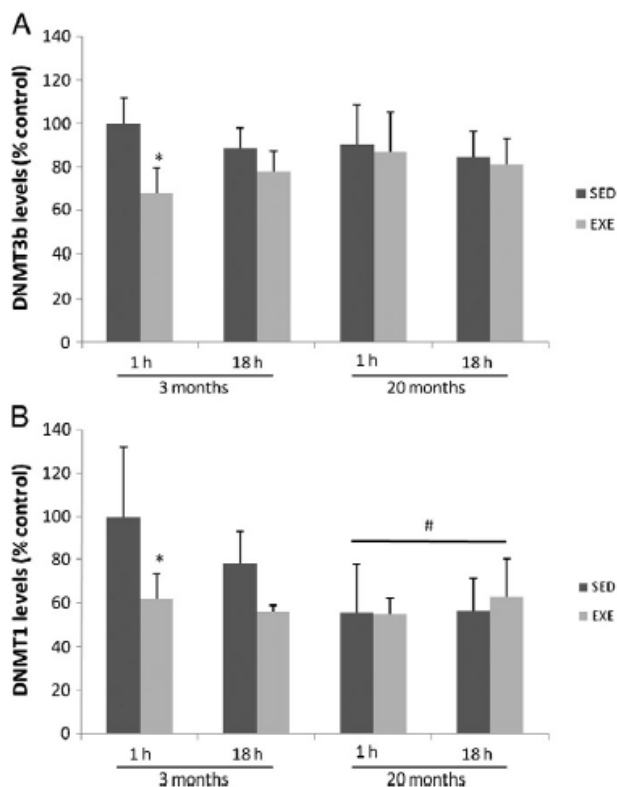


Fig. 2. Effect of single exercise session on DNMT3b (A) and DNMT1 (B) levels in rat hippocampus. Results are expressed as percentage of the young SED group (1 h) and columns represent mean \pm S.D. ($n=5-7$). Three-way ANOVA followed by Tukey's test, * = different from its respective SED control group ($p<0.05$) and # = different from the young adult groups ($p<0.05$).

($F_{(1,39)}=13.072$; $p=0.001$). The chronic exercise induced an acute and delayed decrease (about 70%; $p=0.008$ and 50%, $p=0.015$, respectively) on H3-K9 methylation levels in hippocampi from young adult rats, without any effect on aged group (Fig. 3B).

4. Discussion

We described here that aged hippocampus has diminished DNMT1 and H3-K9 methylation levels. Our data corroborates to those obtained by Lopatina and et al. (2002), demonstrating decreases on DNMT1 activity in senescent human fibroblasts. These findings can be related to genome-wide tendency to DNA hypomethylation during aging process (Richardson, 2002; Wilson et al., 1987). The relevance of our finding is not currently known, although we can suggest that might reflect age-related global patterns of genomic destabilization. Additionally, we could suggest that the age-related folate deficiency (Keyes et al., 2007) might potentiate the dysregulation of DNA methylation levels in the aged brain, since folate exerts the main role in the supply of one-carbon moieties for DNA synthesis and the synthesis of SAM, the most important methyl donor in the DNA methylation process (Selhub, 2002). Furthermore, low folate levels have been linked to neuropsychiatric and neurodegenerative diseases, such as Alzheimer disease (Querfurth and LaFerla, 2010), what could be related to hypomethylation status.

Our result supports the idea that dysregulation of histone methylation is also related to aging process, since aged hippocampi have lower H3-K9 methylation levels. It is known that histone methylation can display opposite effects, resulting in either gene activation or repression, but it is impossible at this moment to establish if aging is able to alter mono-, di- or tri-methylation. We can suggest that the reduced levels of H3-K9 in hippocampi from 20-months aged rats may

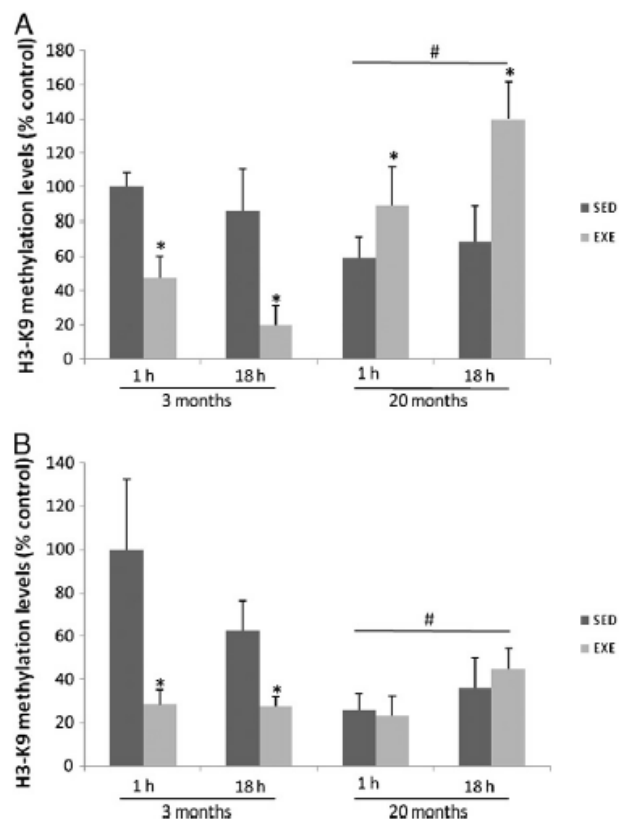


Fig. 3. Effect of single exercise session (A) and chronic protocol (B) on H3-K9 methylation levels in rat hippocampus. Results are expressed as percentage of the young SED group (1 h) and columns represent mean \pm S.D. ($n=5-7$). Three-way ANOVA followed by Tukey's test, * = different from the respective SED control group and # = different from the young adult groups ($p<0.05$).

be related to mono-methylation of H3-K9, contributing to the age-related reduction of gene transcription. Consistent with our finding, the expression of genes with important roles on memory and synaptic plasticity, including *Arc* (activity-regulated cytoskeletal gene), *zif268* (nerve growth factor inducible-A) and BDNF (brain-derived neurotrophic factor) is decreased in normal aging process, as well in many models of memory disorders (Kohman et al., 2011). In accordance, lower levels of global histone H4 acetylation were observed in hippocampi from aged rats (Lovat et al., submitted for publication). Considering that mono-methylation of H3-K9 and histone acetylation are typically associated with transcriptional activation, our findings suggest that both epigenetic markers may be related to aging-associated abnormal brain gene expression patterns.

A major finding that emerged from our study involves a potential interaction between aging and exercise on DNA and histone methylation markers. To our knowledge, we provide here, for the first time, evidence of age-dependent exercise modulation on epigenetic mechanisms. The single exercise session significantly decreased both DNMT1 and DNMT3b levels in young adult rats, which may reduce DNA methylation, affecting gene expression. Our findings are in agreement with those recently obtained by Gomez-Pinilla et al. (2011), where exercise reduced DNA methylation in the BDNF gene promoter IV in the hippocampi of 3 months-aged rats, augmenting BDNF gene expression. Together, these data are consistent with the idea that exercise may increase the transcriptional activity of genes involved in neuronal plasticity and memory formation through the modulation of DNA methylation in hippocampi from young adult rats.

In contrast to the young adult rat group, our exercise protocol did not modify DNMT1 nor DNMT3b levels in hippocampi from 20 months-aged rats, suggesting that exercise might not influence the transcription

activity through DNMT activity in aging brain. The differences between young adult and aged samples are not surprising, since it is well documented that aged animals can respond differently to same stimulus in both behavioral tasks and biochemical assays. Buchanan et al. (2008) observed that a stress model increased hippocampal IL-1 β expression associated with a cognitive impairment in aged mice, without any effect in adult mice. Therefore, these findings demonstrated that exercise can impact methylation parameters in an age-dependent manner.

Another remarkable result is the opposite effects of exercise on H3-K9 methylation levels between young adult and old groups. Both exercise protocols reduced H3-K9 methylation levels in the young group. We might hypothesize that exercise reduced di- and tri-methylation of H3-K9 levels in hippocampus from young rats, which may enhance the expression of specific gene expression involved to neuronal survival, plasticity and cognitive functions, since di- and tri-methylation of histone H3-K9 are associated to transcriptional repression (Gupta et al., 2010). Interestingly, it was observed that the single exercise session reversed the diminished H3-K9 methylation levels in aged group, therefore we could suppose that exercise can impact positively the transcriptional activity through mono-methylation of H3-K9. Taken together, it is plausible to suppose that histone lysines might be methylated in response to exercise with different patterns (mono-, di- or tri-methylation) depending on the age.

The single exercise session had transiently effects on DNMT1 and DNMT3b enzyme levels, reducing acutely their levels (1 h after exercise), without any delayed effect (18 h after). This finding corroborates our previous results, since the same exercise protocol modulates HAT and HDAC in rat hippocampus, enzymes involved in the acetylation status, immediately and 1 h after exercise, but had no delayed effects (Elsner et al., 2011). Similarly, Chandramohan et al. (2008) demonstrated that forced swimming increased phosphoacetylation histone levels in rat dentate gyrus up to 4 h, but not 24 h after training. These findings led us to hypothesize that exercise can alter enzymatic activity/levels up to the first hours after training, without any delayed influence. Although it is impossible to establish at this moment why exercise-induced acetylation and methylation changes did not persist after training, we might suggest this short-lived effect as a protective mechanism to maintain the homeostasis of the transcriptional machinery, avoiding maladaptive conditions.

5. Conclusions

The present findings bring new insights into the effects of aging process and exercise on epigenetic modulation in rat hippocampus. Summarizing, our results support the hypothesis that an imbalance on epigenetic mechanisms, specifically DNMTs and H3-K9 methylation levels, are linked to brain aging process that might ultimately lead to age-related dysfunctions. Furthermore, exercise induced age-dependent changes on methylation markers, providing evidence that the epigenetic mechanisms in response to exercise might vary through lifespan. Additional work will be required to investigate the molecular mechanism behind this phenomenon. Further studies are necessary to support our preliminary findings. (1) We will use specific antibodies to distinguish between the three types of H3K9 methylation (H3K9me1, H3K9me2 and H3K9me3), (2) we need to evaluate the roles played by H3K9 methyl-transferases (G9a, GLP, etc.) and (3) we will evaluate the effects of exercise in the DNA methylation levels itself.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Dr. I.R. Siqueira; V.R. Elsner; C.F. Spindler); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (K. Bertoldi; G.A. Lovatel; F. Moysés); Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica-PIBIC CNPq-UFRGS (L.R. Cechinel). Dr. A.R. Muotri was supported from the National Institutes of Health through the NIH Director's New Innovator Award Program, 1-DP2-OD006495-01 and R01 MH094753-02.

References

- 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 Res.* 37, 45–52.
- Brooks, G.A., White, T.P., 1978. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol.* 45, 1009–1015.
- Buchanan, J.B., Sparkman, N.L., Chen, J., Johnson, R.W., 2008. Cognitive and neuroinflammatory consequences of mild repeated stress are exacerbated in aged mice. *Psychoneuroendocrinology* 33, 755–765.
- Chandramohan, Y., Droste, S.K., Arthur, J.S., Reul, J.M., 2008. The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2701–2713.
- Elsner, V.R., Lovatel, G.A., Bertoldi, K., Vanzella, C., Santos, F.M., Spindler, C., de Almeida, E.F., Nardin, P., Siqueira, I.R., 2011. Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neuroscience* 29, 580–587.
- 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, 383–390.
- Gupta, S., Kim, S.Y., Artis, S., Molfese, D.L., Schumacher, A., Sweatt, J.D., et al., 2010. Histone methylation regulates memory formation. *J. Neurosci.* 30, 3589–3599.
- Keyes, M.K., Jang, H., Mason, J.B., Liu, Z., Crott, J.W., Smith, D.E., Friso, S., Choi, S.W., 2007. Older age and dietary folate are determinants of genomic and p16-specific DNA methylation in mouse colon. *J. Nutr.* 137, 1713–1717.
- Kohman, R.A., Rodríguez-Zas, S.L., Southey, B.R., Kelley, K.W., Dantzer, R., Rhodes, J.S., 2011. Voluntary wheel running reverses age-induced changes in hippocampal gene expression. *PLoS One* 6, 8.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 4, 693–705.
- Levenson, J.M., Sweatt, J., 2005. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 108–118.
- Lopatina, N., Haskell, J.F., Andrews, L.G., Poole, J.C., Saldanha, S., Tollefsbol, T., 2002. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J. Cell Biochem.* 84, 324–334.
- Lovatel, G., Elsner, V., Bertoldi, K., Vanzella, C., Moysés, F., Vizuete, A., Spindler, C., Cechinel, L., Netto, C.A., Muotri, A., Siqueira, I.R., submitted for publication. Treadmill exercise induces age-related changes on aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic parameters in rat hippocampus. Submitted to *Neurobiology of Learning and Memory* (NLM-12–201).
- Pietrelli, A., Lopez-Costa, J., Goni, R., Brusco, A., Basso, N., 2012. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. *Neuroscience* 202, 252–266.
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's disease. *NEJM* 362, 329–344.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucsek, J., Sasvari, M., Nyakas, C., Goto, S., 2001. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem. Int.* 38, 17–23.
- Reik, W., Kelsey, G., Walter, J., 1999. Dissecting de novo methylation. *Nat. Genet.* 23, 380–382.
- Reolon, G.K., Maurmann, N., Werenicz, A., Garcia, V.A., Schröder, N., Wood, M.A., Roesler, R., 2011. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behav. Brain Res.* 221, 329–332.
- Richardson, B.C., 2002. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. *J. Nutr.* 132, 2405S–2405S.
- Saha, R.N., Pahan, K., 2006. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ.* 13, 539–550.
- Selhub, J., 2002. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. *J. Nutr. Health Aging* 6, 39–42.
- Wilson, V.L., Smith, R.A., Ma, S., Cutler, R.G., 1987. Genomic 5-methyl-deoxycytidine decreases with age. *J. Biol. Chem.* 262, 9948–9951.

6.2 CAPÍTULO 2

**Treadmill exercise impacts histone deacetylase activity in striatum
from adolescent Wistar rats**

Submetido para o International Journal of Development Neuroscience

From: regino.perez-polo@utmb.edu
To: ionarasiqueira@hotmail.com
Date: Tue, 10 Dec 2013 15:03:27 +0000
Subject: A manuscript number has been assigned

Ms. Ref. No.: DN-D-13-00136
Title: Treadmill exercise impacts histone deacetylase activity in striatum from adolescent Wistar rats
International Journal of Developmental Neuroscience

Dear Dr. Ionara Siqueira,

Your submission entitled "Treadmill exercise impacts histone deacetylase activity in striatum from adolescent Wistar rats" has been assigned the following manuscript number: DN-D-13-00136.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/dn/>.

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/dn/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

J. Regino Perez-Polo, PhD
Editor-in-Chief
International Journal of Developmental Neuroscience

Treadmill exercise impacts histone deacetylase activity in striatum from adolescent Wistar rats

Viviane Rostirola Elsner^a, Carla Basso^b, Christiano Spindler^a, Felipe Moysés^a, Karine Bertoldi^a,
Louisiana Carolina Ferreira de Meireles^c, Laura Reck Cechinel^b, Arthiese Korb^c, Gisele Lovatel^d,
Ionara Rodrigues Siqueira^{*a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, ^bDepartamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul; ^cPrograma de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, ^dCurso de Graduação em Fisioterapia, Campus da Universidade Federal de Santa Catarina na cidade de Araranguá, Santa Catarina.

*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

Studies reporting the exercise effects on epigenetic parameters have been focused in mature hippocampus. It was demonstrated that different protocols might alter histone acetylation status, which is regulated by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). Our aim was to evaluate the effect exercise on HDAC activity in striatum from Wistar rats at different stages of development. Male Wistar rats aged 25 days postnatal (adolescents), 3 months (young adults) and 20 months (aged) were used. The animals were submitted to two different exercise protocols, a single session of treadmill and chronic exercise (running daily for 20 min for 2 weeks). The single session induced persistent effect on global HDAC activity in the adolescent group, given that exercised rats showed decreased HDAC activity 1 h and 18 h after training, without any effect on mature groups. We can propose that striatum might be more vulnerable to exercise-induced epigenetic marks during adolescent period compared to mature brain, suggesting that epigenetic mechanisms in response to exercise vary through lifespan.

Keywords: Wistar rats; forced exercise; histone deacetylases; striatum; stage of development.

1. Introduction

Several evidences have pointed out that environmental stimulus, such as stress, nutrition, social interactions, exercise and environment enrichment may induce epigenetic modifications in brain, which can alter the transcriptional machinery of specific genes involved to neural function (Feinberg, 2008; Foley et al., 2009; Handel et al., 2010). In this context, emerging findings demonstrated that exercise was able to modulate the histone acetylation status, the most extensively studied epigenetic modification, in hippocampus from young adult and aged rats. This epigenetic process is controlled by histone acetyltransferases (HATs) and histone desacetylases (HDACs) enzymes, which respectively add and remove acetyl groups to amino-terminal tails of histones (Strahl and Allis, 2000; Wade, 2001; McKinsey et al., 2001).

It is important to note that the studies reporting the exercise effects on acetylation parameters have been focused in mature hippocampus. A single exercise session of treadmill exercise alters the HAT and HDAC activities, specifically, reducing HDAC activity in combination to an increase in HAT activity in hippocampus from 3 months-aged rats (Elsner et al., 2011). In addition, Collins and colleagues (2009) demonstrated that voluntary exercise increased the hippocampal histone H3 phospho-acetylation levels in adult young rats. According to that, Gomez-Pinilla and colleagues (2011) showed that a voluntary exercise paradigm induced acetylation of histone H3 in the brain derived neurotrophic factor (BDNF) promoter IV in hippocampus from 3 months-aged rats, a crucial gene for synaptic plasticity, learning and long-term memory (Cotman, 2002). These data support the hypothesis that exercise effects may be related, at least in part, to the histone hyperacetylation status, since histone acetylation is associated with enhanced transcriptional activity (Kimura et al., 2005; Choi and Howe, 2009).

Interestingly, histone hypoacetylation and high levels of HDAC, what are usually associated with transcriptional repression, have been linked to the normal aging process, as well during neurodegenerative conditions (Lovatell et al., 2013; Saha e Pakan, 2006; Kouzarides, 2007; Kimura et al., 2005; Choi and Howe, 2009). It was reported that a chronic exercise protocol

was also able to reverse aging-related histone H4 hypoacetylation levels in hippocampus and memory declines of 20-months-old aged rats (Lovatell et al., 2013).

Exercise seems to induce several neurochemical and structural plasticity in various brain areas, including striatum (MacRae et al., 1987). Besides, it is relevant to consider that the striatum has a crucial role for learning and implicit memory process (McDonald and White 1993; Squire and Zola, 1996); indeed, an interaction between the hippocampal and striatal systems during the learning and consolidation processes of motor sequence memory have been recently suggested (Albouy et al., 2013). Taken together, these findings indicate that the exercise modulation on epigenetic parameters in striatum must be better explored.

A key role of epigenetic markers in effects of early-life experiences, such as maternal care, on gene expression, synaptic transmission and the consequent behavior has been widely accepted (Fagiolini, 2009). Although studies investigating the involvement of epigenetic modifications in response to exercise in rat brain through the adolescent period of life are rare.

In view of these observations, our aim was to investigate the effect of two exercise protocols: single session or chronic treadmill protocol on HDAC activity in striatum from rats at different stages of development. Moreover, we also evaluated the time course of the exercise outcomes, specifically, 1 h and 18 h after the last session of training.

2. Material and methods

2.1 Animals

Male Wistar rats at different stages of development, adolescents (25 days postnatal), young adults (3 months) and aged (20 months) were used. The animals were maintained under standard conditions (12h light/dark cycle, 22± 2°C) with food and water *ad libitum*. The NIH "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (No. 80-23, revised 2011) was followed in

all experiments. The Local Committee (CEUA/UFRGS) approved all handling and experimental conditions (nr.21449).

2.2 Training

Rats were randomly divided into sedentary group (SED) or exercised (EXE). The exercise training consisted of running sessions on an adapted motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil), with individual Plexiglas lanes, at 60% of the animals' maximal oxygen uptake (Brooks and White, 1978). Peak oxygen uptake (VO_2) was measured indirectly in all animals before training. Each rat ran on a treadmill at a low initial speed with the speed being increased by 5 m/min every 3 min 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 taken as indexes of exercise capacity, which was in turn taken as VO_2 max (Brooks and White, 1978; Elsner et al., 2011). Two exercise protocols were employed: a single session of treadmill exercise (20 min) and chronic treadmill protocol (20 min running session each day for 2 weeks). SED was handled exactly as the experimental animals and left on the treadmill for 5 min without any stimulus to run.

Adolescent rats (25-days-old) were adapted to the treadmill by running, in the first two sessions, at 4.7 m/min for the first 2 min, 5.8 m/min for the next 4 min, 7 m/min for 8 min, 5.8 m/min for 4 min and 4.7 m/min for the last 2 min. Thereafter, animals ran at 4.7 m/min for the first 4 min, 7 m/min for 12 min and 4.7 m/min for the last 4 min. Rats aged 3-months-old were adapted to the treadmill by running, in the first two sessions, at 6.7 m/min for the first 2 min, 10 m/min for the next 4 min, 15 m/min for 8 min, 10 m/min for 4 min and 6.7 m/min for the last 2 min. Thereafter, animals ran at 6.7 m/min for the first 4 min, 15 m/min for 12 min and 6.7 m/min for the last 4 min. Finally, the 20-months aged rats were adapted to the treadmill by running, in the first two sessions, at 4.5 m/min for the first 2 min, 5.6 m/min for the next 4 min, 6.8 m/min for 8 min, 5.6 m/min for 4 min and 4.5 m/min for the last 2 min. Thereafter,

animals ran at 4.5 m/min for the first 4 min, 8 m/min for 12 min and 4.5 m/min for the last 4 min. Any animals that initially refused to run were encouraged by gently tapping their backs. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study. All the procedures took place between 14:00 and 17:00 h.

2.3 Preparation of samples

To investigate both acute and long-term effects of the exercise protocols, rats were decapitated 1 h and 18 h after a single session or after the last session of chronic treadmill exercise; then the animals were killed at different time of day, in afternoon and early morning, respectively. The striatum were quickly dissected out, immediately snap-frozen in liquid nitrogen and store at -80°C . On the day of the assay, the striatum was homogenized in 1:3 volumes of ice-cold lysis buffer pH 7.4 containing (in mM): 250 sucrose; 20 Tris-HCl; 1 EDTA; 1 EGTA; 10 KCl; 1 DTT; 0.1 PMSF; 0.0001 okadaic acid). The lysates were subjected to centrifugation ($16,000 \times g$ for 5 min) at 4°C in a microcentrifuge tube, and the supernatant was removed for analysis.

2.4 Determination of global HDAC enzyme activity

The effect of exercise on global HDAC enzyme activity was determined using an HDAC Assay Kit (Fluorometric Detection catalog # 17-372, Upstate Biotechnology, Temecula, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the samples were incubated with the HDAC assay substrate at 30°C for 45 min before addition of the activator solution. The mixtures were incubated for an additional 10 min at room temperature, and HDAC enzyme activity was measured on a microplate reader (excitation = 360 nm, emission= 450 nm) and expressed as pmoles HDAC per mg protein. The protein concentration of each sample was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

2.5 Statistical Analysis

The SED 1h groups were taken as 100%. Data were expressed by mean \pm standard deviation. The results were analyzed by two-way Analysis of Variance (ANOVA) with exercise and time point after exercise as independent variables, followed by post hoc Tukey's multiple range tests when appropriate. In all tests, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

We investigated the global HDAC activity in striatum from rats at different stages of development submitted to a single session of treadmill exercise or a chronic treadmill protocol 1 h and 18 h after training.

The effects of the single session of treadmill exercise are illustrated in Fig. 1. Two-way ANOVA showed a significant effect of both factors, exercise and time point after exercise (respectively, $F_{(1, 19)} = 23.141$, $p < 0.001$; $F_{(1, 19)} = 4.168$; $p = 0.047$) in the adolescent group. It was observed that the single session induced short and long-term effects on global HDAC activity in the adolescent group, given that exercised rats showed a decrease on HDAC activity 1 h (about 30%, $p < 0.01$) and 18 h (about 20%, $p < 0.01$) compared to its sedentary groups (Fig 1A). Moreover, it was observed a clear temporal pattern on HDAC activity, since this parameter was reduced in sedentary and exercised groups in the early morning (18 h groups) compared to the afternoon (1 h groups). Two-way ANOVA did not show a significant interaction between both factors, exercise and time point after exercise. The single session of treadmill exercise did not alter global HDAC activity in striatum of young adult and aged groups in both evaluated time-points, 1 h and 18 h (Fig. 1B and C). Besides, the chronic exercise regimen did not modify this parameter in any groups ($p > 0.05$; Fig. 2). Two-way ANOVA showed the effect of day time ($F_{(1, 16)} = 8.421$, $p = 0.012$) also only in the adolescent group, since HDAC activity was

significantly diminished in the early morning, in accordance with findings obtained with single session of treadmill exercise groups.

4. Discussion

This study provides important insights about exercise-induced epigenetic modifications in the early stages of development, since striatal HDAC activity in response to exercise is remarkably different in adolescent rats compared to the young adult and aged group.

It was observed that adolescent rats submitted to a single exercise session presented lower levels of HDAC activity in striatum, an indicative of hyperacetylation status and enhanced transcriptional activity. It is important to consider that striatum and hippocampus are functionally related and seem to act in concert during the learning and consolidation processes of motor sequence memory (Albouy et al., 2013). In accordance, it was recently demonstrated a down-regulation in the expression of several HDAC genes in combination to an increase on H3 acetylation levels in hippocampi from adolescent mice after 1 week of a voluntary exercise paradigm. Moreover, this hyperacetylation status induced by training was associated with increased levels of genes linked to synaptic plasticity and memory process, such as BDNF (Abel et al., 2013). BDNF expression is known to exert a pivotal role during brain maturation and development, in fact, learning deficits were observed in restricted BDNF mutant mice (Gorski et al., 2003; Bernd, 2008).

These data can be related to those obtained by Cetinkaya and colleagues (2013) using adolescent rats. The authors demonstrated that both exercise protocols, voluntary and forced, were able to improve learning and memory performance. This data was associated to increased hippocampal activity and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) levels, a neuroprotective agent involved in brain development and neuron survival (Aksu et al., 2012).

In addition, clinical studies also observed a positive correlation between serum IGF-1 levels and IQ in children (Gunnell et al., 2005). Together, these findings raise the possibility that the improvement on cognitive functions following exercise in adolescent rats may be related to the enhancement of specific genes involved to the brain function through epigenetic mechanism, specifically, with HDAC activity modulation.

The relationship between acetylation levels and memory improvement, as well increased BDNF levels in cortex and hippocampus from adult and aged rats have been widely described (Lovatel et al., 2013; Cassilhas et al., 2012; Vayman et al., 2004; Sui et al., 2012). Surprisingly, the present study showed that exercise did not alter HDAC activity in striatum from 3 and 20-months aged rats.

We can suggest a structure-dependent effect of exercise on epigenetic mechanism modulation, since a single exercise session augmented HAT and reduced HDAC activities immediately and 1 h after training in hippocampi (Elsner et al., 2011), while this protocol showed an enhancement on HAT activity immediately after training. In addition, the chronic protocol was able to reduce the HDAC activity in frontal cortices from young adult rats (Spindler et al., 2013, submitted). Moreover, a chronic exercise protocol increased H4 acetylation levels in hippocampi from 20-months aged rats (Lovatel et al., 2013). Despite of different profile, these data suggest a hyperacetylation status in investigated brain areas.

The age-dependent exercise outcomes on HDAC modulation here observed are not surprising, since it was described in previous work that the environment stimulus effects on brain function, such as physical activity exposure, may vary according to animal stage of development (de Almeida et al., 2013; Kim et al., 2004). In agreement, recent findings showed that exercise could impact methylation parameters in rat hippocampus in an age-dependent manner. It was observed that the single exercise session is capable to decrease DNA Methyltransferases 3b and 1 (DNMT3b and DNMT1, respectively) contents in hippocampi from

young adult rats, enzymes involved in DNA methylation process, without any effect in the aged group. Besides, the single exercise session and chronic exercise protocols reduced significantly the methylation levels of histone H3 at lysine 9 (H3-K9) in young adult rats. On the other hand, only the single session diminished this parameter in the 20-months aged ones (Elsner et al., 2013). All these data led us to hypothesize that epigenetic changes induced by exercise are linked to specific periods of development, as well to different brain regions.

Interestingly, striatal HDAC activity was modulated by the circadian rhythm, given that this epigenetic mark was reduced in the early morning (18 h) only in the adolescent group, without any effect in young adult and aged groups. Therefore, we may postulate that its modulation seems to have a structure and age-dependent profile, since the influence of the time of the day on HDAC activity in hippocampi from young adult Wistar rats was previously described, where this parameter is increased in early morning (Elsner et al., 2011). In addition, it was also reported higher HDAC activity in hippocampus from aged rats in the early morning (Sant' Anna et al., 2013).

It was initially recognized that epigenetic modifications would be permanent through the life, however, finding obtained in recent works suggest that these modifications can occur rapidly (minutes) and transiently (less than 24 h) (Miller and Sweatt, 2007). Accordantly, authors have been suggested that the epigenetic modifications observed after exercise are short-lived. Chandramohan et al. (2008) demonstrated that forced swimming increased hippocampal phosphoacetylation histone levels up to 4 h, but not 24 h after training. Similarly, our data about exercise effects in adult hippocampus indicates a modulation in HAT and HDAC activities immediately and 1 h, without any alteration 18 h after training (Elsner et al., 2011). Furthermore, a forced exercise protocol also induced transiently increase on H4 acetylation levels in hippocampi from 20-months-aged rats (Lovatell et al., 2013). Conversely from these findings observed in adult and aged rats, we showed here that the diminished HDAC activity

induced by exercise in striatum from adolescent rats persists at least for 18 h, suggesting that this effect is more persistent than in other brain structures. In addition, this result may be related, at least in part, to the fact that the striatum could be more susceptible to exercise effects during restricted temporal windows of postnatal development compared to other ages (Fagiolini et al., 2009). To our knowledge, we describe here, for the first time, the temporal profile of exercise outcomes on epigenetic parameters during the adolescent period.

5. Concluding remarks

The present study shows that exercise is an environmental stimulus able to induce epigenetic modification in striatum from adolescent rats, which may mediate the modulation of specific genes expression involved to the brain function and behavioral phenotypes. Further studies are necessary to establish the pathway through which region-specific modifications can be achieved and to better understand the route by which epigenetic mechanisms in response to exercise vary through lifespan.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Dr. I.R. Siqueira; V.R. Elsner; C. Spindler); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (K. Bertoldi; G.A. Lovatel; F. Moysés; L.C. Meireles); Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC CNPq-UFRGS (L.R. Cechinel; C.Basso).

Reference List

Abel, J.L., Rissman, E.F., 2013. Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain. *Int J Dev Neurosci.* 31(6):382-90. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2012.11.002.

- Aksu, I., Baykara, B., Ozbal, S., Cetin, F., Sisman, A.R., Dayi, A., Gencoglu, C., Tas, A., Büyük, E., Gonenc-Arda, S., Uysal, N., 2012. Maternal treadmill exercise during pregnancy decreases anxiety and increases prefrontal cortex VEGF and BDNF levels of rat pups in early and late periods of life. *Neurosci Lett.* 516(2):221-5. doi: 10.1016/j.neulet.2012.03.091.
- Albouy, G., Sterpenich, V., Vandewalle, G., Darsaud, A., Gais, S., Rauchs, G., Desseilles, M., Boly, M., Dang-Vu, T., Balteau, E., Degueldre, C., Phillips, C., Luxen, A., Maquet, P. 2013. Interaction between hippocampal and striatal systems predicts subsequent consolidation of motor sequence memory. *PLoS One.* 8(3):e59490. doi: 10.1371/journal.pone.0059490.
- de Almeida, A.A., Gomes da Silva, S., Fernandes, J., Peixinho-Pena, L.F., Scorza, F.A., Cavalheiro, E.A., Arida, R.M., 2013. Differential effects of exercise intensities in hippocampal BDNF, inflammatory cytokines and cell proliferation in rats during the postnatal brain development. *Neurosci Lett.* 553:1-6. doi: 10.1016/j.neulet.2013.08.015.
- Bernd, P., 2008. The role of neurotrophins during early development. *Gene Expr.* 14(4):241-50.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:218–254.
- Brooks, G.A., White, T.P., 1978. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J App Physiol.* 45:1009–1015.
- Cassilhas, R.C., Lee, K.S., Fernandes, J., Oliveira, M.G., Tufik, S., Meeusen, R., de Mello, M.T., 2012. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. *Neuroscience.* 202:309-17. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.029.
- Cetinkaya, C., Sisman, A.R., Kiray, M., Camsari, U.M., Gencoglu, C., Baykara, B., Aksu, I., Uysal, N., 2013. Positive effects of aerobic exercise on learning and memory functioning, which correlate with hippocampal IGF-1 increase in adolescent rats. *Neurosci Lett.* 549:177-81. doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.012.
- Chandramohan, Y., Droste, S.K., Arthur, J.S., Reul, J.M., 2008. The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction

in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *Eur J Neurosci.* 27(10):2701-13. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06230.x.

Choi, J.K., Howe, L.J., 2009. Histone acetylation: truth of consequences?. *Biochem Cell Biol.* 87(1):139-50. doi: 10.1139/O08-112.

Collins, A., Hill, L.E., Chandramohan, Y., Whitcomb, D., Droste, S.K., Reul, J.M., 2009. Exercise improves cognitive responses to psychological stress through enhancement of epigenetic mechanisms and gene expression in the dentate gyrus. *PLoS One.* 4(1):e4330. doi: 10.1371/journal.pone.0004330.

Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25: 295–30.

Elsner, V.R., Lovatel, G.A., Bertoldi, K., Vanzella, C., Santos, F.M., Spindler, C., de Almeida, E.F., Nardin, P., Siqueira, I.R., 2011. Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neuroscience.* 192:580-7. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.066.

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. *Exp Gerontol.* 48(2):136-9. doi: 10.1016/j.exger.2012.11.011.

Fagiolini, M., Catherine, L., Jensen and Frances, A., Champagne. 2009. Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Neurobiology.* 19:1–6.

Feinberg, A.P., 2008. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA.* 299:1345-50.

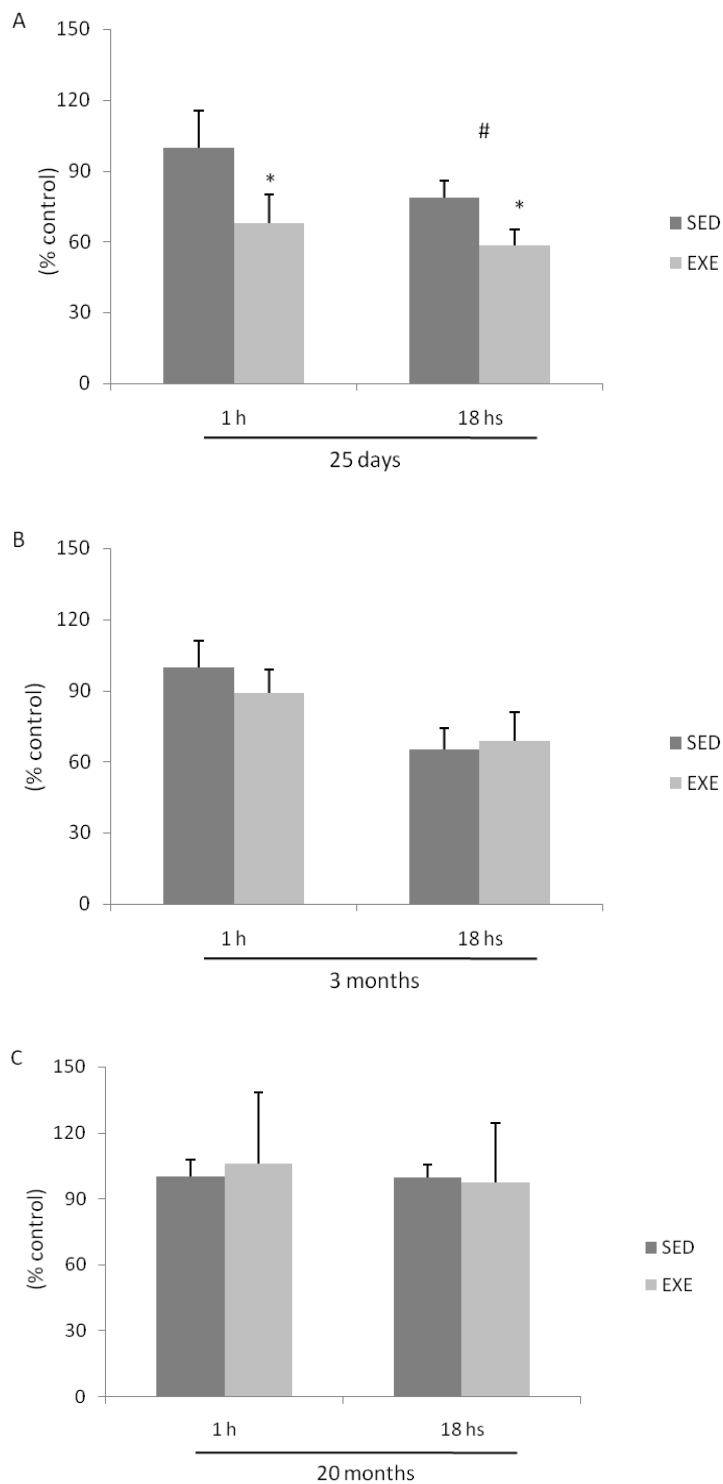
Foley, D.L., Craig, J.M., Morley, R., Olsson, C.A., Dwyer, T., Smith, K., Saffery, R., 2009. Prospects for epigenetic epidemiology. *Am J Epidemiol.* 169:389–400.

- 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):383-90.
- Gorski, J.A., Balogh, S.A., Wehner, J.M., Jones, K.R., 2003. Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Neurosci.* 121(2):341-54.
- Gunnell, D., Miller, L.L., Rogers, I., Holly, J.M., 2005. Association of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein-3 with intelligence quotient among 8- to 9-year-old children in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Pediatrics.* 116(5):e681-6.
- Handel, A.E., Ebers, G.C., Ramagopalan, S.V., 2010. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol Med.* 16:7–16.
- Kim, Y.P., Kim, H., Shin, M.S., Chang, H.K., Jang, M.H., Shin, M.C., Lee, S.J., Lee, H.H., Yoon, J.H., Jeong, I.G., Kim, C.J., 2004. Age-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Neurosci Lett.* 355(1-2):152-4.
- Kimura, A., Matsubara, K., Horikoshi, M.J., 2005. A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes *Biochem.* 138(6):647-62.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 4:693–705.
- Lovatel, G.A., Elsner, V.R., Bertoldi, K., Vanzella, C., Moysés Fdos, 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. *Neurobiol Learn Mem.* 101:94-102. doi: 10.1016/j.nlm.2013.01.007.
- McDonald, R.J., White, N.M., 1993. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci.* 107(1):3-22.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Olson, E.N., 2001. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev.* 11(5):497-504.
- Saha, R.N., Pahan, K., 2006. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ.* 13(4):539-50.

- Squire, L.R., Zola, S.M., 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(24):13515-22.
- Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403:41–45.
- Sui, L., Wang, Y., Ju, L.H., Chen, M., 2012. Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem.* 425-40. doi: 10.1016/j.nlm.2012.03.007.
- Vaynman, S., Ying, Z., Yin, D., Gomez-Pinilla, F., 2006. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res.* 1070:124-130.
- Wade, P.A., 2001. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet.* 10(7):693-8.

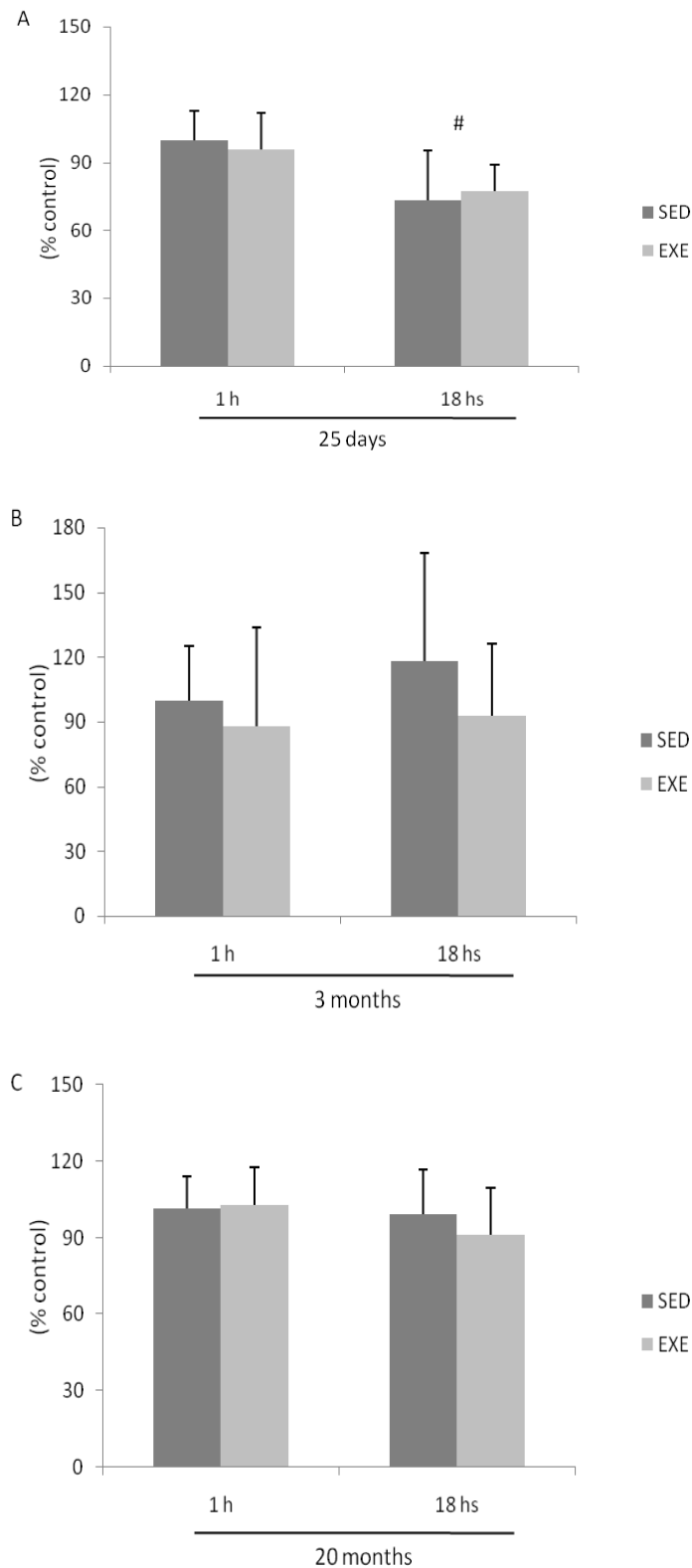
Figures

Figure 1



Effects of the single exercise session (20 min) on global HDAC activity in striatum from adolescent (Panel A), young adult (Panel B) and aged (Panel C) Wistar rats. Results are expressed as percentage of the SED 1h group and columns represent mean \pm S.D. (n=5-8). * Values significantly different from its respective SED control group; # Values significantly different from 1h, as determined by ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

Figure 2



Effects of the chronic treadmill protocol (2 weeks, 20 min daily) on global HDAC activity in striatum from adolescent (Panel A), young adult (Panel B) and aged (Panel C) Wistar rats. Results are expressed as percentage of the SED 1h group and columns represent mean \pm S.D. (n=5-8). # Values significantly different from 1h, as determined by ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

Discussão

Nossos dados demonstram que o processo de envelhecimento altera parâmetros de metilação de histonas e DNA em hipocampos de ratos Wistar, o que pode modificar a expressão de genes envolvidos com a função cerebral. Um dos resultados de maior relevância que emergiu deste estudo envolve uma potencial interação entre o exercício físico e a fase do desenvolvimento sobre parâmetros epigenéticos. Foi demonstrado pela primeira vez que a modulação do exercício sobre estes marcadores ocorre de forma idade-dependente e varia de acordo com a estrutura encefálica analisada e o protocolo de treinamento utilizado.

No primeiro capítulo desta Tese, demonstramos que os hipocampos de ratos Wistar de 20 meses apresentaram uma redução no conteúdo da enzima DNMT1 quando comparado ao grupo adulto jovem (3 meses), sugerindo uma redução nos níveis de metilação do DNA. Nossos achados podem estar relacionados com aqueles obtidos por Lopatina e colegas (2002), os quais descreveram uma diminuição na atividade da DNMT1 em fibroblastos humanos senescentes. Estes dados sugerem que modificações nos níveis de metilação do DNA durante o processo de envelhecimento podem ser decorrentes de alterações no conteúdo e na atividade das enzimas DNMTs.

É importante salientar que os mecanismos epigenéticos não agem independentemente, e sim são interligados, sendo que a metilação do DNA atua de forma conjunta com as modificações em histonas (Gupta et al., 2010). Neste sentido, observamos também uma diminuição nos níveis hipocampais de metilação da histona H3-K9 em ratos envelhecidos. Funcionalmente, pode-se descrever que a metilação da histona H3-K9 está relacionada com o recrutamento das DNMTs, bem como a metilação do DNA pode recrutar enzimas HMTs (Fuks et al., 2005). Assim, podemos sugerir que a interação destes eventos pode induzir um efeito sinérgico sobre a maquinaria transcricional, sendo que a redução na metilação da histona H3-K9 causa hipometilação do DNA e vice-versa, de modo que este perfil de hipometilação de DNA e histonas possa se perpetuar. De forma geral, estes achados sustentam a hipótese de que há uma tendência à hipometilação global durante o processo de envelhecimento (Wilson e Jones, 1987; Richardson, 2002). Este perfil pode refletir em padrões globais de instabilidade genômica relacionados ao envelhecimento cerebral (Tra et al., 2002).

Deve-se considerar que a metilação da histona H3-K9 pode exercer efeitos opostos sobre a transcrição gênica, resultando em sua ativação ou repressão, dependendo da histona, do sítio e do grau de metilação. Sabendo-se que a mono-metilação da histona H3-K9 é considerada um ativador da atividade transcricional, sugerimos que os níveis hipocampais reduzidos de metilação da histona H3-K9 observados no grupo envelhecido estejam associados com este grau de metilação, estando assim relacionado com a redução da expressão gênica característica do processo de envelhecimento. No intuito de melhor compreender os

mecanismos epigenéticos envolvidos com o processo de envelhecimento, ensaios paralelos em nosso laboratório demonstraram uma hipoacetilação global da histona H4 em hipocampus de ratos Wistar de 20 meses, o qual foi relacionado a um déficit da memória aversiva, avaliado por meio da tarefa da esQUIVA inibitória (Lovatel et al., 2013). Ainda, observou-se que ratos Wistar de 18 meses de idade apresentam um aumento da atividade hipocampal da enzima HDAC, um indicativo de hipoacetilação de histonas (Sant' Anna et al., 2013). Estes achados são consistentes com a idéia de que há uma alteração da atividade da maquinaria transcricional a favor da repressão gênica durante o processo de envelhecimento.

Estes achados corroboram estudos que demonstram uma redução na expressão hipocampal de importantes genes envolvidos na plasticidade sináptica e na memória de roedores envelhecidos (Kohman et al., 2011; Adlard et al., 2005). Isto sugere que o desequilíbrio destes marcadores biológicos, conteúdo da DNMT1 e níveis de metilação da histona H3-K9, estejam envolvidos, pelo menos em parte, com os déficits cognitivos associados ao processo de envelhecimento.

Além do impacto do processo de envelhecimento normal, também foi avaliado o efeito da exposição ao exercício físico sobre marcadores de metilação em hipocampus de ratos Wistar adultos jovens (3 meses) e envelhecidos (20 meses). Observamos que uma sessão de exercício reverteu a hipometilação da histona H3-K9 induzida pelo envelhecimento, enquanto que este marcador não foi alterado pela exposição ao protocolo crônico neste grupo. Considerando evidências que demonstram que o exercício aumenta a expressão de genes específicos no encéfalo de roedores envelhecidos (Adlard et al., 2005), nossos dados sugerem que esta modulação pode ocorrer, pelo menos em parte, via mono-metilação da histona H3-K9. Por outro lado, ambos os protocolos, sessão única e treinamento crônico, reduziram este parâmetro no grupo adulto jovem. Nossa hipótese é que esta redução esteja relacionada com a di e tri-metilação da histona H3-K9, o que pode aumentar a expressão de genes envolvidos com funções cognitivas, uma vez que estas alterações induzem repressão transcricional (Gupta et al., 2010). Podemos ainda propor que as lisinas de histonas são metiladas em resposta ao exercício com diferentes padrões (mono, di ou tri- metilação) de forma idade-dependente.

Demonstramos ainda que a sessão única de exercício diminuiu o conteúdo das enzimas DNMT1 e DNMT3b em hipocampo de ratos adultos jovens, o que pode reduzir os níveis de metilação do DNA e assim, aumentar a expressão gênica. Esse achado corrobora o estudo de Gomez-Pinilla e colegas (2011), onde ratos jovens exercitados apresentaram diminuição dos níveis de metilação do DNA no promotor IV do gene BDNF. Com base nisto, estes dados nos permitem inferir que o exercício pode aumentar a expressão de genes envolvidos com a plasticidade neuronal e formação de memória por meio da modulação dos níveis de metilação

do DNA e da histona H3-K9 em hipocampo de ratos adultos jovens. Por outro lado, nenhum dos dois protocolos utilizados foi capaz de alterar os níveis de DNMT1 e DNMT3b em ratos de 20 meses de idade. Este achado sugere que o exercício não influencia a maquinaria transcricional por meio da modulação do conteúdo hipocampal das DNMTs durante o processo de envelhecimento cerebral.

Estudos experimentais sugerem que os níveis séricos de fatores neurotróficos como o BDNF possam refletir a concentração desta molécula no SNC (Trajkovska et al., 2007; Sartorius et al., 2009; Klein et al., 2010). E, apesar do nome “derivado do encéfalo”, a síntese e liberação do BDNF foram observadas na periferia por células musculares, vasculares, epiteliais e leucócitos (Gielen et al., 2003; Nakahashi et al., 2000; Cattaneo et al., 2010). Assim, os achados bioquímicos aqui expostos podem estar relacionados a evidências clínicas, que no entanto, não reportem a modulação central da expressão gênica em resposta ao exercício. Porém, demonstram alterações transcricionais induzidas tanto pelo exercício agudo quanto crônico em células sanguíneas periféricas ou biópsia de músculo esquelético, e sua relação com a melhora de aspectos cognitivos em indivíduos adultos e idosos (Kaliman et al., 2011).

Para exemplificar, Ferris e colegas (2007) observaram que a única sessão em cicloergômetro melhorou a performance no Teste de *Stroop*, o qual avalia parâmetros de atenção seletiva e a resistência a estímulos distratores. Adicionalmente, foi observado um aumento nos níveis séricos de BDNF em adultos saudáveis, sugerindo que a melhora na função cognitiva induzida pelo exercício agudo ocorre via incremento desta molécula. Outros estudos também demonstraram que a sessão única de exercício, tanto em cicloergômetro quanto em esteira ergométrica, melhorou a função cognitiva de idosos saudáveis submetidos a diferentes testes (Hogan et al., 2013; Vasques et al., 2011).

Alguns estudos conduzidos com humanos também sugerem que a prática de exercício físico durante a adolescência parece exercer impacto positivo sobre a função cognitiva (Buck et al., 2008; Hillman et al., 2009). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo têm sido pouco explorados. Sabe-se que os períodos iniciais do desenvolvimento parecem ser extremamente influenciados por estímulos ambientais, o que pode impactar a função cerebral e o comportamento (Fagiolini et al., 2009). Assim, consideramos relevante investigar a modulação do exercício físico sobre parâmetros epigenéticos em ratos adolescentes.

Cabe destacar que estruturas encefálicas distintas respondem diferentemente aos estímulos provenientes do exercício (McCloskey et al., 2001; Abel et al., 2013). Contudo, até o momento, a maioria dos estudos envolvendo os efeitos do exercício físico e sua relação com mecanismos epigenéticos, tanto em roedores adultos jovens quanto envelhecidos, se restringe

ao hipocampo (Elsner et al., 2011; Elsner et al., 2013; Gomez-Pinilla et al., 2011; Lovatell et al., 2013). Assim, é de interesse avaliar diferentes estruturas encefálicas, como o estriado, estrutura associada com a função cognitiva, além de exercer papel crucial no controle motor. Com base nisso, o segundo capítulo desta Tese avaliou o efeito dos protocolos de exercício descritos acima sobre a modulação da atividade da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar de 25 dias (adolescentes) e 20 meses de idade (envelhecidos).

Demonstramos que os estriados de ratos adolescentes exercitados apresentaram uma redução significativa na atividade da HDAC quando comparado ao grupo sedentário, um indicativo de hiperacetilação de histonas e aumento da atividade transcricional. Este achado corrobora resultados da literatura obtidos em hipocampo, que descrevem uma redução na expressão do gene da HDAC em camundongos adolescentes após serem submetidos a um protocolo de exercício voluntário em roda de corridas durante uma semana (Abel et al., 2013). É interessante citar que esta redução estava associada a um aumento na expressão hipocampal de diversos genes envolvidos com a plasticidade sináptica e memória, como o BDNF. Este achado é interessante, uma vez que esta molécula exerce um papel crucial na maturação e no desenvolvimento cerebral, além de que, déficits de aprendizado foram observados em camundongos nocautes para o gene do BDNF (Gorski et al., 2003; Bernd, 2008). Complementarmente, Cetinkaya e colegas (2013) recentemente demonstraram que o exercício físico, tanto voluntário quanto forçado, pode aprimorar a função cognitiva. Os autores observaram uma melhora em parâmetros de memória e aprendizado em ratos adolescentes por meio de um aumento dos níveis hipocampais do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), um agente neuroprotetor envolvido com o desenvolvimento cerebral e sobrevivência neuronal (Aksu et al., 2012).

Estes achados podem estar relacionados com estudos clínicos que reportaram uma correlação positiva entre os níveis séricos de IGF-1 e o quociente de inteligência em crianças (Gunnel et al., 2005). Ainda, baixos níveis de atividade física em crianças e adolescentes estão correlacionados com habilidades cognitivas pobres, enquanto que uma única sessão de exercício é capaz de melhorar a função executiva e aliviar os sintomas em crianças com déficit de atenção e hiperatividade (Archer e Kostrewa, 2012; Chang et al., 2012). A parte de todas estas especulações, o presente resultado implica a possibilidade de que a melhora das funções cognitivas em adolescentes observadas após o exercício físico esteja relacionada com o aumento da expressão de genes específicos por meio da regulação de mecanismos epigenéticos, como por exemplo, a modulação da atividade da HDAC.

Por outro lado, Titterness e colegas (2011) demonstraram que o exercício foi capaz de aumentar a LTP em ratos adolescentes machos, sem exercer nenhum efeito em fêmeas,

indicando que adolescentes machos e fêmeas são diferentemente sensíveis aos efeitos do exercício. Ainda, tem sido recentemente sugerido que a modulação epigenética difere entre os gêneros, fatores que podem contribuir para modificações comportamentais a longo prazo, além de estar associados com a susceptibilidade a doenças neurológicas e psiquiátricas (Qureshi e Mehler, 2010). Neste contexto, nos questionamos se a modulação do exercício físico sobre mecanismos epigenéticos poderia variar em estruturas encefálicas de ratos adolescentes machos e fêmeas. Este tema que pode ser futuramente investigado.

Conforme já mencionado, a relação entre os níveis de acetilação de histonas e a melhora do desempenho em testes de memória e o aumento nos níveis de BDNF em hipocampo de ratos adultos e envelhecidos tem sido amplamente descritos (Lovatel et al., 2013; Vayman et al., 2004). No entanto, nenhum dos protocolos de exercício aqui utilizados foram capazes de alterar a atividade da HDAC em estriado de ratos Wistar de 3 e 20 meses de idade. Isto sugere que os efeitos do exercício sobre a modulação dos níveis de acetilação de histonas e sua relação com a função cognitiva nestes animais seja restrito a alterações hipocampais. Neste contexto, Lovatel e colaboradores (2013) demonstraram que o nosso protocolo de exercício crônico reverteu a hipoacetilação da histona H4 induzida pelo envelhecimento em hipocampo de ratos Wistar. Ainda, destacamos a participação de outros mecanismos epigenéticos ativadores da transcrição gênica induzidas pela exposição ao exercício nas diferentes fases do desenvolvimento, como a metilação da histona H3-K9 em hipocampus de ratos adultos jovens e envelhecidos, aqui observados. Podemos sugerir também que o exercício físico altera os níveis estriatais de acetilação de histonas nestes animais por meio da modulação de outra enzima, a HAT.

Devemos considerar que as amostras utilizadas neste estudo foram de ratos durante o processo de envelhecimento fisiológico, e assim, não podemos descartar a possibilidade de que em estriado de modelos animais de doenças neurodegenerativas o exercício possa modular a atividade da HDAC. Esse raciocínio pode ser explicado pelo fato de que o exercício induziu uma melhora da função motora, o que foi relacionado com a preservação do sistema dopaminérgico nigroestriatal, por meio de um aumento na expressão gênica de BDNF e GDNF em modelo animal de Doença de Parkinson (Tajiri et al., 2010). Corroborando estes achados, outro estudo observou que um protocolo de 18 semanas de corrida também melhorou aspectos motores e induziu um aumento nos níveis de BDNF e GDNF na substância negra e estriado de modelos animais com Doença de Parkinson moderada (Lauet al., 2011). Assim, analisar o impacto do exercício físico sobre os níveis de HDAC e outras variáveis epigenéticas em modelo animal de doenças neurodegenerativas pode ser importante para melhor

compreender os mecanismos pelos quais a expressão destes fatores neurotróficos é modulada após o treino.

De uma forma geral, nossos dados evidenciam pontuais diferenças em relação ao efeito do exercício físico sobre a modulação epigenética em encéfalo de ratos adolescentes, adultos jovens e envelhecidos nos dois capítulos desta Tese. Este perfil está de acordo os achados da literatura mostrando que vários fatores, como espécie, idade e gênero, podem influenciar a resposta a um mesmo estímulo, tanto em testes comportamentais, quanto em ensaios bioquímicos. Por exemplo, Buchanan e colegas (2008) observaram que a exposição ao modelo de estresse por imobilização, tanto agudo quanto crônico, aumentou os níveis hipocampais da interleucina-1 beta associado ao déficit cognitivo em ratos velhos, mas não teve nenhum efeito nos ratos jovens. Ainda, foi demonstrado que a administração de butirato de sódio, um inibidor da HDAC, é capaz de melhorar os déficits de memória relacionados ao envelhecimento nas fases iniciais de formação de memória. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado em ratos jovens, os quais não apresentam prejuízo de memória (Reolon et al., 2011). Especificamente em relação aos efeitos do exercício, Hopkins e colegas (2011) reportaram efeitos diferentes do treino sobre os níveis hipocampais de BDNF e memória para o reconhecimento de objetivos em animais adolescentes e adultos jovens. Adicionalmente, uma recente investigação demonstrou que a modulação de parâmetros bioquímicos em resposta ao exercício físico também varia em ratos durante os estágios iniciais do desenvolvimento pós-natal. Os autores observaram que o treino induziu um aumento nos níveis hipocampais de BDNF nos animais com idade entre 41 e 50 dias, sem nenhum efeito nos grupos mais jovens (21 e 31 dias) (de Almeida et al., 2013). Com base nisso, podemos supor que semelhante a outros estímulos externos, o exercício também pode induzir alterações sobre parâmetros epigenéticos de forma idade-dependente.

É digno de nota que o grau de neuroplasticidade varia com a idade do indivíduo, sendo maior durante os estágios iniciais do desenvolvimento (Cheung e Broman, 2000; Fontaine, 2000). Esta inferência corrobora nossos achados, os quais demonstraram que o exercício alterou a atividade da HDAC em estriado de ratos adolescentes, sem modificar este parâmetro no grupo adulto jovem e envelhecido. Neste contexto, também foi reportado por alguns autores que a exposição de roedores a um ambiente enriquecido durante a adolescência aprimorou a memória espacial e parâmetros de aprendizado, sendo que este mesmo efeito não foi observado em animais durante a vida adulta (Williams et al. 2011; Lores-Arnaiz et al., 2007). Cabe destacar que a melhora da memória induzida pelo enriquecimento ambiental durante a adolescência foi associada com a hiperacetilação de histonas em córtex pré-frontal

de ratos. Ainda, o tratamento crônico com butirato de sódio, um inibidor da HDAC, mimetizou os efeitos do ambiente enriquecido nestes animais (Koseki et al., 2012). Coletivamente, estes dados sugerem que o encéfalo de adolescentes parece ser mais sensível a alterações epigenéticas relacionadas com o estado de acetilação de histonas quando expostos a estímulos externos em comparação a ratos enquadrados em estágios mais tardios do desenvolvimento.

Além disso, mostramos que a ação do exercício sobre a modulação epigenética também depende do protocolo de exercício utilizado. A sessão única de exercício reduziu o conteúdo hipocampal das enzimas DNMT1 e DNMT3b no grupo adulto jovem, as quais não foram modificadas pelo protocolo crônico. Corroborando estes achados, resultados prévios conduzidos em nosso laboratório demonstraram que o protocolo crônico não alterou a atividade das enzimas HAT e HDAC em hipocampo de roedores da mesma idade, enquanto que a sessão única aumentou a atividade HAT e diminuiu a atividade da HDAC (Elsner et al., 2011). Nossos achados podem estar relacionados a outros estudos que demonstram que o exercício crônico induz adaptações em muitos sistemas fisiológicos, tais como cardiovascular, muscular e endócrino (Meeusen et al., 1997; Gresch et al., 1994; Dluzen et al., 1995). Ainda, McGee e Hargreaves (2011) sugerem uma estreita relação entre as adaptações a exposição ao exercício crônico e a modificação de histonas no músculo esquelético de humanos. Todas estas evidências sustentam a hipótese de que, assim como acontece em outros sistemas fisiológicos, o exercício crônico também parece causar uma adaptação na maquinaria transcricional, especificamente, na atividade e no conteúdo das enzimas responsáveis pela metilação do DNA e acetilação de histonas.

Outro aspecto a ser enfatizado refere-se à duração dos efeitos do exercício após o treino sobre os parâmetros analisados. Observamos que a sessão única teve efeitos transitórios sobre o conteúdo das enzimas DNMT1 e DNMT3b, diminuindo agudamente seus níveis (1 hora após o treino), sem exercer efeito tardio (18 horas após). Isto também foi observado quando avaliamos a atividade das enzimas HAT e HDAC em hipocampo de ratos Wistar adultos jovens (Elsner et al., 2011). Contudo, este perfil temporal não foi observado em ratos adolescentes, onde os níveis estriatais da atividade da HDAC foram reduzidos em ambos os tempos observados, 1 e 18 horas após os animais serem submetidos à sessão única de exercício. Este achado está de acordo com dados da literatura, os quais demonstram que a manipulação comportamental e neurobiológica durante os estágios críticos do desenvolvimento pode repercutir em efeitos a longo prazo, diferente do que ocorre quando executada em fases mais tardias (Nithianantharajah e Hannan, 2009; Haperin e Healey, 2011). De acordo com nossos achados, Hoppinks e colaboradores (2011) demonstraram que quando

realizado durante a adolescência, o exercício exerce um impacto persistente sobre a memória e aprendizado em ratos quando comparado ao treino durante a fase adulta, que apresenta efeitos transitórios sobre estes parâmetros. Ainda, os achados de Adldar e colegas (2005) demonstraram que um protocolo voluntário em roda de corrida aumentou os níveis de BDNF em hipocampo de roedores de diferentes idades (2, 15 e 24 meses), sendo que estes retornaram aos níveis basais após 4 semanas, sendo mantido apenas nos animais mais jovens. Também foi observado que a realização de exercício aeróbico durante a adolescência tem efeitos persistentes, uma vez que é capaz de aprimorar a memória espacial associado a um aumento nos níveis hipocampais de BDNF na vida adulta dos ratos (da Silva et al., 2010). Com base nestes achados, podemos sugerir que a prática do exercício durante a adolescência pode potencializar o pico de plasticidade neural característica deste estágio de desenvolvimento, induzindo efeitos mais duradouros sobre a maquinaria transcricional no estriado de roedores quando comparado ao treino realizado durante a vida adulta.

Estes dados podem ter importantes implicações para a saúde humana, sugerindo que o exercício interage nas fases iniciais do desenvolvimento no intuito de alterar de forma persistente alguns circuitos neurais, especificamente por meio da modulação de marcadores epigenéticos, o que pode modificar a expressão de genes específicos envolvidos na função cerebral. Neste contexto, dados de pesquisas conduzidas com crianças e adolescentes também demonstram efeitos duradouros do exercício físico sobre a memória espacial, visual e discriminativa, assim como a consolidação da informação a longo prazo, o que estava associado com alterações no volume hipocampal (Fedewa e Ahn, 2011; Herting e Nagel, 2012).

Por outro lado, observamos que o exercício foi capaz de induzir alterações persistentes nos níveis hipocampais de metilação da histona H3-K9 em ratos adultos jovens e envelhecidos, modificando este parâmetro 1 e 18 horas após a sessão única. Estes dados sugerem que o exercício modula de forma persistente a atividade da enzima HDAC em estriado de ratos adolescentes, podendo alterar os níveis de acetilação de histonas. Enquanto que, o encéfalo maduro é mais suscetível a alterações persistentes nos níveis de metilação de histonas em resposta a exposição ao exercício físico. Assim, podemos inferir que além de variar conforme o estágio do desenvolvimento, a duração dos efeitos do exercício sobre parâmetros epigenéticos também depende do marcador analisado. Neste momento, é impossível estabelecer o impacto desta heterogeneidade sobre a maquinaria transcricional.

Para finalizar, há evidências contundentes de que o ritmo circadiano altera várias funções fisiológicas, sugerindo que os indivíduos podem responder diferentemente à mesma situação conforme o período do dia. Ainda, tem sido descrito que a hora do dia pode influenciar na eficácia e toxicidade de fármacos, inclusive de inibidores de HDAC (Ohdo, 2003; Debon et al., 2004). Além de que, a expressão de alguns genes do relógio biológico de mamíferos pode ser modulada por alterações estruturais da cromatina (Cecon et al., 2010). Nossos achados podem estar relacionados a estas inferências, uma vez que uma redução na atividade estriatal da enzima HDAC no período da manhã (18h após a exposição ao exercício) foi verificada no grupo adolescente, o que não foi observado nos grupos adultos jovens e envelhecidos. É interessante destacar que foi previamente demonstrado uma redução neste parâmetro em hipocampo de animais adultos jovens no período da manhã (Elsner et al., 2011), sugerindo que a modulação do ritmo circadiano sobre os mecanismos epigenéticos, especificamente sobre a atividade da HDAC, tem um perfil idade e estrutura-dependente. Consistente com esta hipótese, também foi observado que a hora do dia influenciou a atividade desta enzima em hipocampo de ratos Wistar de 18 meses de idade, a qual foi maior no período da manhã (Sant' Anna et al., 2013).

Com base no que foi exposto até aqui, sugerimos que o desequilíbrio de marcadores de metilação de histonas e DNA em hipocampo esteja envolvido com o processo de envelhecimento cerebral, e possivelmente com os déficits cognitivos observados na população idosa. Embora os modelos animais não mimetizem com total fidedignidade todos os eventos fisiológicos que ocorrem em seres humanos e não possam ter seus resultados extrapolados para a prática clínica de forma direta, estes mostram-se interessantes para testar alguns paradigmas neurobiológicos. Assim, acreditamos que nossos resultados abrem novas direções não somente para a descoberta de novas ferramentas para o diagnóstico, como também para a busca de estratégias terapêuticas e preventivas relacionadas ao processo de envelhecimento.

Ainda, fica evidenciado que o exercício físico em esteira ergométrica é um potente estímulo ambiental capaz de induzir alterações epigenéticas em encéfalo de roedores em diferentes estágios do desenvolvimento. É interessante descrever que esta modulação é específica, ocorrendo de forma tempo, idade e estrutura-dependente, sendo também influenciada pelo protocolo de exercício utilizado. Outros estudos são necessários para elucidar as vias pelas quais essas modificações ocorrem e melhor compreender os mecanismos pelos quais estes marcadores variam conforme a idade e sua heterogeneidade com relação às estruturas encefálicas em resposta à exposição ao exercício físico.

Conclusões

Os resultados apresentados nesta tese nos permitem concluir que:

- O desequilíbrio de mecanismos epigenéticos está envolvido, pelo menos em parte, com o processo de envelhecimento cerebral, uma vez que os níveis de metilação da H3-K9 e o conteúdo da DNMT1 encontraram-se reduzidos no hipocampo de ratos Wistar de 20 meses de idade;

- O exercício físico moderado em esteira ergométrica foi capaz de induzir alterações epigenéticas relacionadas com a metilação de histonas, metilação de DNA e acetilação de histonas em hipocampo e estriado de ratos Wistar em diferentes fases do desenvolvimento;

- A modulação dos mecanismos epigenéticos em resposta ao exercício depende do tipo de protocolo utilizado, uma vez que a sessão única e o treinamento crônico (20 minutos por dia durante 2 semanas) apresentaram diferentes efeitos nas estruturas encefálicas analisadas;

- Uma sessão de exercício reverteu 1 e 18 horas após o treino a redução nos níveis hipocampais de metilação da H3-K9 observada inicialmente em ratos envelhecidos;

- Ambos os protocolos de exercício promoveram uma diminuição 1 e 18 horas após o treino nos níveis de metilação da H3-K9 em hipocampo de ratos adultos jovens (3 meses);

- O conteúdo hipocampal das enzimas DNMT1 e DNMT3b não foi alterado em resposta ao exercício em ratos envelhecidos, enquanto que, a sessão única reduziu agudamente (1 h) estes parâmetros em ratos adultos jovens;

- A sessão única de exercício induziu uma redução persistente (1 e 18 horas após o treino) na atividade da HDAC em estriado de ratos adolescentes (25 dias);

- O estriado de ratos adolescentes é mais suscetível à modulação da atividade da HDAC mediada pelo exercício físico, uma vez que não observamos alteração na atividade desta enzima nos animais adultos jovens e envelhecidos;

Em suma, estes resultados corroboram a hipótese de haver uma tendência a hipometilação global durante o processo de envelhecimento cerebral. Também demonstram que a modulação induzida pela exposição ao exercício físico sobre diferentes marcadores epigenéticos em encéfalo de roedores ocorre de forma idade, tempo, protocolo e estrutura-dependente.

Perspectivas

A partir dos resultados obtidos nesta Tese, pretende-se investigar outros aspectos. Dentre as propostas, pode-se destacar:

- Avaliação do efeito do processo de envelhecimento e do exercício físico sobre a atividade das enzimas HAT, HDAC, DNMT1 e DNMT3b, além dos níveis de metilação da H3-K9 em córtex de ratos Wistar;

-Determinação dos níveis de metilação da região promotora de diferentes genes em estruturas encefálicas (hipocampo, córtex, estriado e cerebelo) de ratos Wistar de 20 meses exercitados;

-Análise da atividade da enzima HDAC em diferentes estruturas encefálicas (hipocampo, córtex e cerebelo) de ratos adolescentes submetidos à sessão única e ao protocolo crônico de exercício físico;

Referências

- Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW (2005), The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiol Aging* 26:511–520.
- Albouy G, Sterpenich V, Vandewalle G, Darsaud A, Gais S, Rauchs G, Desseilles M, Boly M, Dang-Vu T, Balteau E, Degueldre C, Phillips C, Luxen A, Maquet P (2013), Interaction between hippocampal and striatal systems predicts subsequent consolidation of motor sequence memory. *PLoS One* 8(3):e59490.
- Archer T, Kostrzewa RM (2012), Physical exercise alleviates ADHD symptoms: regional deficits and development trajectory. *Neurotox Res* 21:195–209.
- Arkin S (2007), Language - enriched plus socialization slows cognitive decline in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 22:62-77.
- Berchtold NC, Castello N, Cotman CW (2010), Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neurosci* 167: 588-97.
- Bernd P (2008), The role of neurotrophins during early development. *Gene Expr* 14:241-50.
- Bird A (2007), Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396–398.
- Blalock EM, Chen KC, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW (2003), Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci* 23: 3807–3819.
- Bousiges O, Neidl R, Majchrzak M, Muller M-A, Barbelivien A (2013), 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(3): e57816.
- Bradford MM (1976), A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:218–254.
- Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M (2007), Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem* 14:268-276.
- Brooks GA, White TP (1978), Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 45:1009–1015.
- Buchanan JB, Sparkman NL, Chen J, Johnson RW (2008), Cognitive and neuroinflammatory consequences of mild repeated stress are exacerbated in aged mice. *Psychoneuroendocrinol* 33: 755–765.
- Buck SM, Hillman CH, Castelli DM (2008), The relation of aerobic fitness to stroop task performance in preadolescent children. *Med Sci Sports Exerc* 40:166-72.
- Carro E, Trejo JL, Busiguiana S, Torres-Aleman I (2001), Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21:5678–5684.
- Castellano JF, Fletcher BR, Kelley-Bell B, Kim DH, Gallagher M, Rapp PR (2012), Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. *PLoS One* 7:e33249.

- Cattaneo A, Bocchio-Chiavetto L, Zanardini R, Milanese E, Placentino A, Gennarelli M (2010), Reduced peripheral brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are normalized by antidepressant treatment. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:103-8.
- Cecon E, Flores DEFL (2010) Regulação da expressão gênica nas engrenagens do relógio circadiano de mamíferos. *Rev Biol* 4:28–33.
- Cetinkaya C, Sisman AR, Kiray M, Camsari UM, Gencoglu C, Baykara B, Aksu I, Uysal N (2013), Positive effects of aerobic exercise on learning and memory functioning, which correlate with hippocampal IGF-1 increase in adolescent rats. *Neurosci Lett* 549:177-81.
- Champagne FA (2008), Epigenetic mechanism and the transgenerational effects of maternal care. *Front Neuroendocrinol* 29:386:391.
- Chang YK, Liu S, Yu HH, Lee YH (2012), Effect of acute exercise on executive function in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Arch Clin Neuropsychol* 27:225-37.
- Chodzko-Zajko WJ, Moore KA (1994), Physical fitness and cognitive functioning in aging. *Exerc Sport Sci Rev* 22:195-220.
- Coelho FJM, Ramos LR (1999), Epidemiologia do envelhecimento no Nordeste do Brasil: resultados de inquérito domiciliar. *Rev Saúde Pública* 33:445-453.
- Combs SA, Diehl MD, Staples WH (2010), Boxing Training for Patients With Parkinson Disease: A Case Series. *PhysTher* 91:132–42.
- Cotman CW, Berchtold NC (2002), Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25:295-301.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA (2007), Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 30: 464–472.
- de Almeida AA, Gomes da Silva S, Fernandes J, Peixinho-Pena LF, Scorza FA, Cavalheiro EA, Arida RM (2013), Differential effects of exercise intensities in hippocampal BDNF, inflammatory cytokines and cell proliferation in rats during the postnatal brain development. *Neurosci Lett* 11:553:1-6.
- Dean W, Lucifero D, Santos F (2005), DNA methylation in Mammalian Development and Disease. *Birth Defects Res* 75:98-111.
- Debon R, Boselli E, Guyot R, Allaouchiche B, Lemmer B, Chassard D (2004), Chronopharmacology of intrathecal sufentanil for labor analgesia: daily variations in duration of action. *Anesthesiol* 101:978–982.
- Dimauro T, David G (2009), Chromatin modifications: the driving force of senescence and aging? *Aging (Albany NY)* 2:182–190.
- Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton R, Fleshner M, Gandevia S, Gomez-Pinilla F, Greenwood BN, Hillman CH (2006), Neurobiology of Exercise. *Obesity* 14:345–356
- Dluzen D, Liu B, Chen C, DiCarlo S (1995), Daily spontaneous running alters behavioral and neurochemical indexes of nigrostriatal function. *J Appl Physiol* 78:1219-1224.
- Duncan RP, Earhart GM (2012). Randomized controlled trial of community-based dancing to modify disease progression in Parkinson disease. *Neurorehabil Neural Repair* 26:132Y43.

- Durston S, Mulder M, Casey BJ, Ziermans T, van Engeland H (2006), Activation in ventral prefrontal cortex is sensitive to genetic vulnerability for attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 60:1062-70.
- Dustman RE, Ruhling RO, Russell EM, Shearer DE, Bonekat HW, Shigeoka JW, Wood JS, Bradford DC (1984), Aerobic exercise training and improved neuropsychological function of older adults. *Neurobiol Aging* 35-42.
- Elsayed M, Ismail AH, Young RJ (1980), Intellectual differences of adult men related to age and physical fitness before and after an exercise program. *J Gerontol* 35:383-7.
- Elsner VR, Lovatel GA, Bertoldi K, Vanzella C, Santos FM, Spindler C, de Almeida E, Siqueira IR (2011), Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neurosci* 29: 580–587.
- Endres M, Meisel A, Biniskiewicz D, Namura S, Prass K, Ruscher K, Lipski A, Jaenisch R, Moskowitz MA, Dirnagl U (2000), DNA methyltransferase contributes to delayed ischemia brain injury. *J Neurosci* 20:3175–3181.
- Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmon SN, Kuo CJ, Palmer TD (2003), VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18: 2803–2812.
- Fagiolini M, Catherine L, Jensen and Frances A, Champagne (2009), Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Neurobiol* 19:1–6.
- Featherstone RE, McDonald RJ (2005), Lesions of the dorsolateral striatum impair the acquisition of a simplified stimulus-response dependent conditional discrimination task. *Neurosci* 136:387-95.
- Fedewa AL, Ahn S (2011), The effects of physical activity and physical fitness on children's achievement and cognitive outcomes: a meta-analysis. *Res Q Exerc Sport*. 82:521-35.
- Feinberg AP (2008), Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA* 299:1345-50.
- Feng J, Chang H, Li E, Fan G (2005), Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res* 79:734-46.
- Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt DJ, Silva AJ, Fan G (2010), Dnmt1 and Dnmt3a are required for the maintenance of DNA methylation and synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 13: 423–430.
- Ferris LT, Williams JS, Shen CL (2007), The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. *Med Sci Sports Exerc* 39:728-34.
- Fontán-Lozano A, Romero-Granados R, Troncoso J, Múnera A, Delgado-García JM, Carrión AM (2008), Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Mol Cell Neurosci* 39:193–201.
- Friedman R, Tappen RM (1991), The effect of planned walking on communication in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 39:650-4.
- Fuks F (2005), DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Gene Dev* 15, 490–495.

- Gielen A, Khademi M, Muhallab S, Olsson T, Piehl F (2003), Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Scandinavian J Immunol* 57:493–497.
- Gillott A, Standen PJ (2007), Levels of anxiety and sources of stress in adults with autism. *J Intellect Disabil* 11:359–370.
- Golbus J, Palella TD, Richardson BC (1990), Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing. *Eur J Immunol* 20:1869-1872.
- Gomes da Silva S, Unsain N, Mascó DH, Toscano-Silva M, de Amorim HA, Silva Araújo BH, Simões PS, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Mortara RA, Scorza FA, Cavalheiro EA, Arida RM (2010), Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. *Hippocampus* 22:347-58.
- 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* 33:383–390.
- Goodwin VA, Richards SH, Taylor RS, Taylor AH, Campbell JL (2008), The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 15:631-40.
- Gorski JA, Balogh SA, Wehner JM, Jones KR (2003), Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Neurosci* 121:341-54.
- Gräff J, Mansuy IM (2008), Epigenetic codes in cognition and behavior. *Behav Brain Res* 70:87.
- Gresch P, Sved A, Zigmond M, Finlay J (1994), Stress-induced sensitization of dopamine and norepinephrine in medial prefrontal cortex of the rat. *J Neurochem* 63:575-583.
- Gomes da Silva S, Unsain N, Mascó DH, Toscano-Silva M, de Amorim HA, Silva Araújo BH, Simões PS, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Mortara RA, Scorza FA, Cavalheiro EA, Arida RM (2012), Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. *Hippocampus* 22:347-58.
- Gupta S, Kim, SY, Artis S, Molfese DL, Schumacher A, Sweatt JD. (2010), Histone methylation regulates memory formation. *J Neurosci* 30:3589–3599.
- Halperin JM, Healey DM (2011), The influences of environmental enrichment, cognitive enhancement, and physical exercise on brain development: can we alter the developmental trajectory of ADHD? *Neurosci Biobehav Rev* 35:621–634.
- Herman T, Giladi N, Hausdorff JM (2009), Treadmill training for the treatment of gait disturbances in people with Parkinson's disease: a mini-review. *J Neural Transm* 116:307–18.
- Herting MM, Nagel BJ (2012), Aerobic fitness relates to learning on a virtual Morris Water Task and hippocampal volume in adolescents. *Behav Brain Res* 233:517-25.
- Heyn P (2003), The effect of a multisensory exercise program on engagement, behavior, nd selected physiological indexes in persons with dementia. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 18:247-51.

- Hillman CH, Pontifex MB, Raine LB, Castelli DM, Hall EE, Kramer AF (2009), The effect of acute treadmill walking on cognitive control and academic achievement in preadolescent children. *Neurosci* 159:1044-54
- Hogan CL, Mata J, Carstensen LL (2013), Exercise holds immediate benefits for affect and cognition in younger and older adults. *Psychol Aging* 28:587-94.
- Honea RA, Thomas GP, Harsha A, Anderson HS, Donnelly JE, Brooks WM, Burns JM (2009), Cardiorespiratory fitness and preserved medial temporal lobe volume in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 23:188-97.
- Hopkins ME, Nitecki R, Bucci DJ (2011), Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. *Neurosci* 194, 84-94.
- Hwang K, Velanova K, Luna B (2010), Strengthening of top-down frontal cognitive control networks underlying the development of inhibitory control: a functional magnetic resonance imaging effective connectivity study. *J Neurosci* 30:15535-45.
- Hunter RG, McCarthy KJ, Milne TA, Pfaff DW, McEwen BS (2009), Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20912–20917.
- Jardim, Mde LT (2010), Tendências demográficas e perspectivas futuras da população gaúcha. In: Conceição, OAC, Grando MZ, Teruchkin SU, Faria LAE (Org.). A evolução social. Porto Alegre: FEE.
- Jingwen L, Yongjuan X, Wenhao Z, Zilong Q (2013), The Epigenetic Switches for Neural Development and Psychiatric Disorders. *J Genet Genomics* 40:339-346.
- Kaliman P, Párrizas M, Lalanza JF, Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M (2011), Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process. *Ageing Res Rev* 10:475-86.
- Khan O, La Thangue NB (2008), Drug Insight: histone deacetylase inhibitor-based therapies for cutaneous T-cell lymphomas. *Nat clin pract* 5:714–726.
- Kim DH, Kim TW, Kim SE, Shin MS, Kim KM, Baek SS (2010), Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury-induced hippocampal apoptosis. *Physiol Behav* 101:660-5.
- Klein AB, Williamson R, Santini MA (2010), Blood BDNF concentrations reflect Brain-derived neurotrophic factor-5-brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol* 4: 1–7.
- Koenig JI, Kirkpatrick B, Lee P (2002), Glucocorticoid hormones and early brain development in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* 27:309–318.
- Kohman RA, Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Kelley KW, Dantzer R, Rhodes JS (2011), Voluntary wheel running reverses age-induced changes in hippocampal gene expression. *PLoS One* 6:22654.
- Koseki T, Mouri A, Mamiya T, Aoyama Y, Toriumi K, Suzuki S, Nakajima A, Yamada T, Nagai T, Nabeshima T (2012), Exposure to enriched environments during adolescence prevents abnormal behaviours associated with histone deacetylation in phencyclidine-treated mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:1489-501.
- Kouzarides T (2007), Chromatin modifications and their function. *Cell* 4:693–705.

- Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ (2008), Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum *Neuron* 48:303–314.
- Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A (1999), Ageing, Fitness and neurocognitive function. *Nature* 400: 418-419.
- Kravitz AV, Kreitzer AC (2012), Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. *Physiol (Bethesda)* 27:167-77.
- Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P, Kukull W (2006), Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med* 144:73-81.
- Lau YS, Patki G, Das-Panja K (2011), Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur J Neurosci* 33:1264-74.
- Lee IM, Paffenbarger RS (1998), Physical activity and stroke incidence: the Harvard Alumni Health Study. *Stroke* 29:2049-54.
- Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E (1996), De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Develop* 122: 3195-3205.
- Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD (2004), Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279:40545–40559.
- Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, Sweatt JD (2006), Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 281: 15763-15773.
- Li F, Harmer P, Fitzgerald (2012), Tai chi and postural stability in patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 366:511–9.
- Lim DA, Huang YC, Swigut T, Mirick AL, Garcia-Verdugo JM, Wysocka J, Ernst P, Alvarez-Buylla A (2009), Chromatin remodeling factor Mll1 is essential for neurogenesis from postnatal neural stem cells. *Nature* 458:529–533 (2009).
- Liston C, Watts R, Tottenham N, Davidson MC, Niogi S, Ulug AM, Casey BJ (2006), Frontostriatal microstructure modulates efficient recruitment of cognitive control. *Cereb Cortex* 16:553-60.
- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ (2000), Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* 3:799–806.
- Löck J (2000), The effects of mountain exercise in Parkinsonian persons - a preliminary study. *Arch Gerontol Geriatr* 31:19-25.
- Lubin FD, Sweatt JD (2007), The I κ B kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. *Neuron* 55:942–957.
- Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2008), Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 28:10576-86.

- Lopatina N, Haskell JF, Andrews LG, Poole JC, Saldanha S, Tollefsbol T (2002), Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J Cell Biochem* 84, 324-334.
- Lovatel G, Elsner V, Bertoldi K, Vanzella C, Moysés F, Vizuete A, Spindler C, Cechinel L, Netto CA, Muotri A, Siqueira IR (2013), Treadmill exercise induces age-related changes on aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic parameters in rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 101:94-102.
- MacDonald JL, Roskams AJ (2009), Epigenetic regulation of nervous system development by DNA methylation and histone deacetylation. *Prog Neurobiol* 88: 170–183.
- MacRae PG, Spirduso WW, Walters TJ, Farrar RP, Wilcox RE (1987), Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolites in presenescent older rats. *Psychopharmacol* 92:236-40.
- Martinsen EW (2008), Physical activity in the prevention and treatment of anxiety and depression. *Nord J Psychiatry* 47:25-9.
- Mattson MP (2000), Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res* 886: 47-53.
- Mattson MP, Magnus T (2006), Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7:278-94.
- McCloskey DP, Adamo DS, Andersons BJ (2001), Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus. *Brain Res* 891:168-175.
- McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M (2009), Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *J Physiol* 587:5951-8.
- Meeusen R, Smolders I, Sarre IS, Meirleir K de, Keizer H, Serneels M, Ebinger G, Y. Michotte (1997), Endurance training effects on neurotransmitter release in rat striatum: an in vivo microdialysis study, *Acta Physiol Scand* 159:335–341.
- Miller CA, Sweatt JD (2007), Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53: 857–869.
- Mueller BR, Bale TL (2008), Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci* 28:9055-65.
- Nakahashi T, Fujimura H, Altaretal CA (2000), Vascularendothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 470:113–117.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN (1998), Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386–389.
- Narath E, Skalicky M, Viidik A (2001), Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Exp Gerontol* 36:1699 –1711.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002), Neurobiology depression. *Neuron* 34:13–25.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2011), Mechanisms mediating brain and cognitive reserve: experience dependent neuroprotection and functional compensation in animal models of neurodegenerative diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:331–339.

- O'Callaghan C, Hornberger M (2013), Screening for impulse control symptoms in patients with de novo Parkinson disease: a case-control study. *Neurol* 81:694-5.
- Ohdo S (2003), Changes in toxicity and effectiveness with timing of drug administration: implications for drug safety. *Drug Saf* 26:999-1010.
- Pascual M, Do Couto BR, Alfonso-Loeches S, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Guerri C (2012), Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. *Neuropharmacol* 62:2309-19.
- Patel SR, Kim D, Levitan I, Dressler GR (2007), The BRCT-domain containing protein PTIP links PAX2 to a histone H3, lysine 4 methyltransferase complex. *Dev Cell* 13:580-592.
- Pietrelli A, Lopez-Costa J, Goni R, Brusco A, Bass N (2012), Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. *Neurosci* 202: 252-66.
- Penner MR, Roth TL, Barnes CA, Sweatt JD (2010), An epigenetic hypothesis of aging-related cognitive dysfunction. *Front Aging Neurosci* 12:2-9.
- Pinto RBR (2007), Abordagem das pesquisas em epidemiologia aplicada à gerontologia no Brasil: revisão da literatura em periódicos, entre 1995 e 2005. *Rev Bras Epidemiol* 10: 361-369.
- Prendergast GC, Ziff EB (1991), Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 252:186-9.
- Pysh JJ, Weiss GM (1979), Exercise during development induces and increases in Purkinje cell dendritic tree size. *Science* 206:230-231.
- McQuown SC, Wood MA (2010), Epigenetic regulation in substance use disorders *Curr Psychiatry Rep* 12: 145-153.
- Qureshi IA, Mehler MF (2010), Genetic and epigenetic underpinnings of sex differences in the brain and in neurological and psychiatric disease susceptibility. *Prog Brain Res* 186:77-95.
- Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S (2006), The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neuroch* 49:387-92.
- Reik W, Kelsey G, Walter J (1999), Dissecting de novo methylation. *Nat Genet* 23: 380-382.
- Renthal W, Nestler EJ (2008), Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med* 14: 341-350.
- Reolon GK, Maurmann N, Werenicz A, Garcia VA, Schroder N, Wood MA, Roesler, R (2011), Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behav Brain Res* 221: 329-332.
- Richardson BC (2002), Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. *J Nutr* 132: 2401S-2405S.
- Rouaux C, Loeffler JP, Boutillier AL (2004), Targeting CREB-binding protein (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders, *Biochem Pharmacol* 68:1157-1164.
- Rowe WB, Blalock EM, Chen KC, Kadish I, Wang D, Barrett JE, Thibault O, Porter NM, Rose GM, Landfield PW (2007), Hippocampal expression analyses reveal selective association of

- immediate-early, neuroenergetic, and myelinogenic pathways with cognitive impairment in aged rats. *J Neurosci* 27:3098–3110.
- Saha RN, Pahan K (2006), HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ* 13:539–550.
- Sant' Anna G, Elsner VR, Moysés F, L RC, G AL, Siqueira IR (2013), Histone deacetylase activity is altered in brain areas from aged rats. *Neurosci Lett* 556:152-4.
- Sartorius A, Hellweg R, Litzke J (2009), Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. *Pharmacop* 42:270–276.
- Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Belló-Klein A, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR (2006), Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 71:155–159.
- Sen N, Snyder SH (2011), Neurotrophin-mediated degradation of histone methyltransferase by S-nitrosylation cascade regulates neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 50:20178-83.
- Shen S, Casaccia-Bonnel P (2008), Post-translational modifications of nucleosomal histones in oligodendrocyte lineage cells in development and disease. *J Mol Neurosci* 35:13–22.
- Sibley BA, Beilock SL (2007), Exercise and working memory: An individual differences investigation. *J Sport & Exerc Psychol* 29:783-791.
- Sibley BA, Etnier JL (2003), The relationship between physical activity and cognition in children: a meta analysis. *Pediatr Exerc Sci* 15:243-256.
- Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkiwicz D, Jaenisch R, Laird PW, Akbarian S (2007), DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS ONE* 2: e895.
- Schmucker S, Puccio H (2010) Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum Mol Genet* 19:R103–110.
- Souza RF de, Skubs T, Bretas ACP (2007), Envelhecimento e família: uma nova perspectiva para o cuidado de enfermagem. *Rev Bras Enf* 60:263-7.
- Spindler de Figueiredo C. Efeito do exercício físico moderado em esteira sobre parâmetros epigenéticos em estruturas cerebrais de ratos. 26 de outubro de 2012. 38 páginas. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA (2009), Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:9447–9452.
- Stevens MC, Pearlson GD, Calhoun VD (2009), Changes in the interaction of resting-state neural networks from adolescence to adulthood. *Hum Brain Mapp* 30:2356-66.
- Strahl BD, Allis CD (2000), The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41–45.
- Sun H, Kennedy PJ, Nestler EJ (2013), Epigenetics of the depressed brain: role of histone acetylation and methylation. *Neuropsychopharmacol* 38:124-37.

- Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T (2010), Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain Res* 1310:200Y7.
- Titterness AK, Wiebe E, Kwasnica A, Keyes G, Christie BR (2011), Voluntary exercise does not enhance long-term potentiation in the adolescent female dentate gyrus. *Neurosci* 183:25-31.
- Tra J, Kondo T, Lu Q, Kuick R, Hanash S, Richardson B (2002), Infrequent occurrence of age dependent changes in CpG island methylation as detected by restriction landmark genome scanning. *Mech Ageing Dev* 123:1487–1503.
- Trajkovska V, Marcussen AB, Vinberg M, Hartvig P, Aznar S, Knudsen GM (2007), Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data. *Brain Res Bull* 15:143-9.
- Uysal N, Tugyan K, Kayatekin BM, Acikgoz O, Bagriyanik HA, Gonenc S, et al (2005), The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci Lett* 5:241–5.
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999), Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266–270.
- Vanyushin BF, Nemirovsky LE, Klimenko VV, Vasiliev VK, Belozersky AN (1973), The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents. *Gerontol* 19:138-152.
- Vasquez PE, Moraes H, Silveira H, Deslandes AC, Laks J (2011), Acute exercise improves cognition in the depressed elderly: the effect of dual-tasks. *Clinics* 66:1553-1557.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004), Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 20:2580–2590.
- Vaynman S, Gomez-Pinilla F (2006), Revenge of the sit: How lifestyle impacts neuronal and cognitive health through molecular systems that interface energy metabolism with neuronal plasticity. *J Neurosci Res* 84: 699-715.
- Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T (2007), Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 27:6128–6140.
- Vissing J, Andersen M, Diemer NH (1996), Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:729-36.
- Walker MP, Laferla FM, Oddo SS, Brewer, GJ (2013), Reversible epigenetic histone modifications and Bdnf expression in neurons with aging and from a mouse model of Alzheimer's disease. *Age (Dordr)* 35(3):519-31.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR (2004), Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7:847-54.
- Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG (1987), Genomic 5-methyl-deoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* 262:9948–9951.
- Winter B, Breitenstein C, Mooren FC, Voelker K, Fobker M, Lechtermann A, Krueger K, Fromme A, Korsukewitz C, Floel A, Knecht S (2007), High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem* 4:597-609.

Xu J, Andreassi M (2011), Reversible histone methylation regulates brain gene expression and behavior. *Horm Behav* 59:383-92.

Zovkic IB, Guzman-Karlsson MC, Sweatt JD (2013), Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn Mem* 15:61-74.