

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CARLA GIOVANA BASSO

**MODULAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO
SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA HISTONA
DESACETILASE EM ESTRIADOS DE RATOS WISTAR
EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO.**

Porto Alegre

Dezembro/2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CARLA GIOVANA BASSO

**MODULAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO
SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA HISTONA
DESACETILASE EM ESTRIADOS DE RATOS WISTAR
EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel (a) em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Co-Orientadora: Msc. Viviane Elsner

Porto Alegre

Dezembro/2013

Agradecimento

Agradeço a todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, em especial a Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira e a Msc. Viviane Elsner por me guiarem durante todo o trabalho. À minha família, meu eterno obrigada, vocês são o início de todas as minhas conquistas.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	5
Lista de figuras	6
Resumo	7
Introdução.....	9
Justificativa.....	18
Hipótese.....	18
Objetivo Geral.....	19
Objetivo Específico.....	19
Trabalho Experimental	20
Abstract.....	21
Introduction.....	22
Material and Methods	23
Results	26
Discussion.....	26
Concluding remarks.....	29
References.....	30
Lista de Legendas.....	33
Figuras	34
Conclusão	35
Perspectivas	36
Referências adicionais.....	37

Lista de abreviaturas

BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
DP	Doença de Parkinson
EXE	Grupo exercitado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etileno glicol tetra-acético
DTT	Ditiotreitol
HAT	Histona Acetiltransferase
HDAC	Histona Desacetilase
IGF-1	Fator-1 de crescimento tipo insulina
IQ	Quociente de inteligência
KCl	Cloreto de potássio
PMSF	Fenilmetanosulfonil fluorido
SED	Grupo sedentário
VO ₂	Capacidade máxima de oxigênio

Lista de Figuras

Figura 1 (A) - Estrutura da cromatina, formada por histonas envolvidas por duas moléculas de DNA.....	9
Figura 1 (B) - Octâmero central do nucleossomo, formado por quatro pares de histonas.....	9
Figura 2 - Reação de metilação do DNA.....	10
Figura 3 - Modificações epigenéticas em histonas.....	10
Figura 4 - Acetilação e desacetilação de histonas, pela ação das HAT e da HDAC.....	11

Figuras Artigo

Figura 1 (A) - Gráfico expressando a atividade da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar de 21 dias após sessão única de exercício físico.....	33
Figura 1 (B) – Gráfico expressando a atividade da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar de 3 meses após sessão única de exercício físico.....	33
Figura 1 (C) - Gráfico expressando a atividade da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar de 20 meses após sessão única de exercício físico.....	33
Figura 2 (A) – Gráfico expressando a atividade da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar de 21 dias após protocolo crônico de exercício físico.....	34
Figura 2 (B) – Gráfico expressando a atividade da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar de 3 meses após protocolo crônico de exercício físico.....	34
Figura 2 (C) – Gráfico expressando a atividade da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar de 20 meses após protocolo crônico de exercício físico.....	34

Resumo

Pesquisas experimentais recentes têm sugerido que fatores ambientais como a alimentação, a poluição, o cuidado materno e a exposição ao exercício físico desempenham um papel crucial no desenvolvimento e na plasticidade da função cerebral de animais em diferentes fases do desenvolvimento através da modulação epigenética. Os mecanismos epigenéticos são capazes de modular o processo de transcrição de genes específicos através de alterações no estado dinâmico da cromatina, os quais podem ocorrer tanto na molécula de DNA, quanto nas histonas. Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que corrida em esteira ergométrica durante 20 minutos, aumentou a atividade da enzima Histona Acetiltransferase (HAT) em combinação com uma diminuição na atividade da enzima Histona Desacetilase (HDAC) em hipocampo de ratos Wistar adultos jovens. Esse estado de hiperacetilação de histonas pode estar relacionado com um aumento da atividade transcricional. Ainda, observamos que tanto a sessão única quanto o protocolo crônico de exercício foram capazes de alterar parâmetros de metilação de histonas e de DNA em hipocampus de ratos Wistar adultos jovens e envelhecidos. Apesar destas evidências os estudos são focados principalmente em hipocampo de animais jovens e envelhecidos, indicando a necessidade de se avaliar os efeitos do exercício físico sobre a modulação epigenética em estágios iniciais do desenvolvimento e em outras estruturas cerebrais de ratos. A fim de expandir nossos achados, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes protocolos de exercício físico moderado em esteira ergométrica, sessão única (20 minutos) e treinamento crônico (20 minutos por dia durante 2 semanas), sobre a atividade da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar em diferentes estágios do desenvolvimento, 21 dias pós-natal (adolescentes), 3 meses (adultos jovens) e 20 meses (envelhecidos). No intuito de verificar os efeitos agudos e tardios do exercício, os animais foram decapitados, 1 hora e 18 horas após a última sessão de treino. A sessão única de exercício induziu efeitos persistentes na atividade global da enzima HDAC no grupo de animais adolescentes, uma vez que se observou diminuição da atividade da enzima 1 hora e 18 horas após o treino. Não

foram observadas alterações na atividade da HDAC em estriado de animais adultos jovens e envelhecidos submetidos a ambos os protocolos. Estes achados nos permitem inferir que o estriado seja mais susceptível às alterações epigenéticas induzidas pelo exercício físico durante o período da adolescência quando comparado a estágios mais avançados do desenvolvimento. Além disso, podemos sugerir que a modulação do exercício físico sobre os mecanismos epigenéticos depende da estrutura avaliada e da fase de desenvolvimento. Outros estudos são necessários para melhor elucidar as vias pelas quais essas modificações ocorrem e compreender os mecanismos pelos quais os marcadores epigenéticos variam conforme a idade em resposta à exposição ao exercício físico.

Introdução

A epigenética, expressão que significa “acima do genoma”, consiste no estudo das alterações na expressão gênica que independem de mudanças na sequência primária do DNA, e sim, envolvem modificações estruturais na cromatina decorrentes da interação do mesmo com o ambiente (Kalliman, 2011). Esta área de estudo tem recebido crescente atenção na medicina do século 21, pois, segundo Kaliman e colegas (2011), ela representa a ponte para o entendimento da relação entre o *background* genético de cada indivíduo com o ambiente, estilo de vida, doenças e envelhecimento.

Os mecanismos epigenéticos são capazes de modular o processo de transcrição gênica alterando a maquinaria transcricional de genes específicos de forma estável, durável e reversível, através de alterações no estado dinâmico da cromatina (Murrell et al., 2005; 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 proteínas chamadas histonas: H2A, H2B, H3 e H4, conforme observado na Figura 1 (Kouzarides, 2007; Strahl e Allis, 2000).

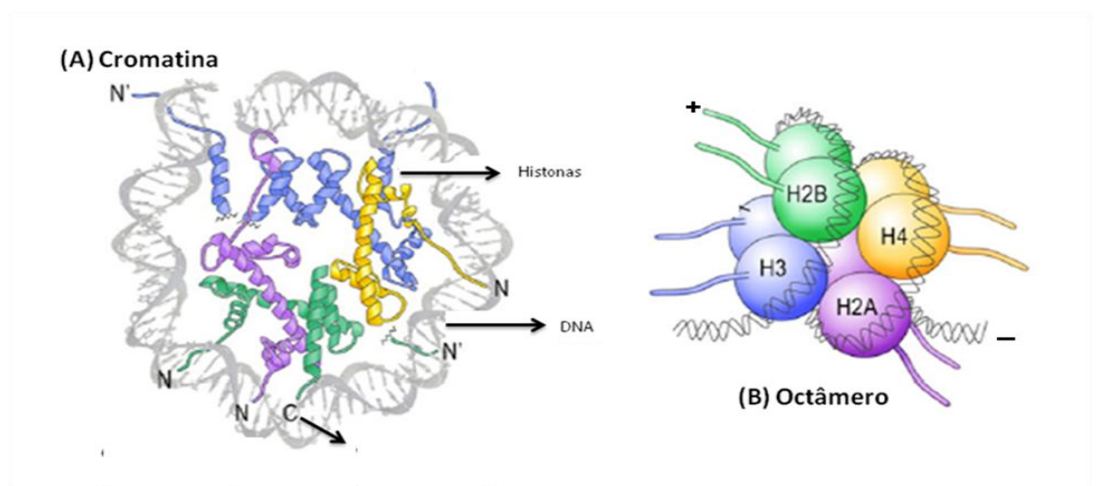


Figura 1 (A) Estrutura da cromatina, formada por histonas envolvidas por duas moléculas de DNA; **(B)** Octâmero central do nucleossomo, formado por quatro pares de histonas (Adaptada de Gräff e Mansuy, 2008).

Assim, os mecanismos epigenéticos englobam modificações tanto na molécula de DNA, quanto nas 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 para a posição 5' do anel pirimidínico da citosina (Figura 2) (Reik et al., 1999), o que está relacionado com a diminuição da atividade transcricional, contribuindo desta forma, para o silenciamento de genes específicos (Gupta et al., 2010).

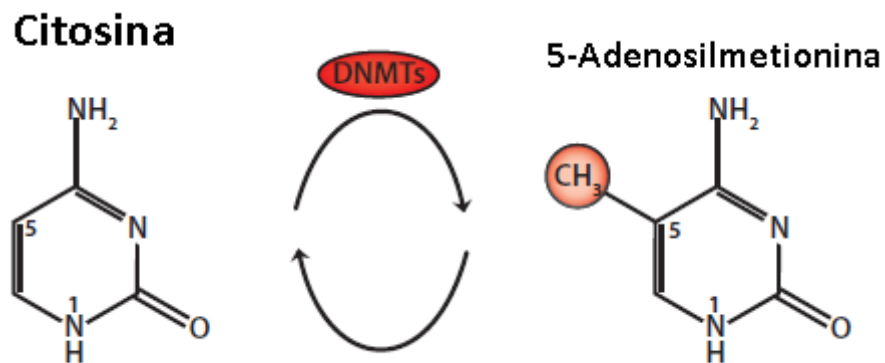


Figura 2- Reação de metilação do DNA (Adaptado, Zovick 2013).

Por outro lado, as histonas podem sofrer diversas modificações em sua cauda N-terminal, incluindo acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação (Figura 3). Estas alterações induzem modificações na expressão gênica conhecida como “o código das histonas”, (Kouzarides, 2007, Moniot et al., 2012).

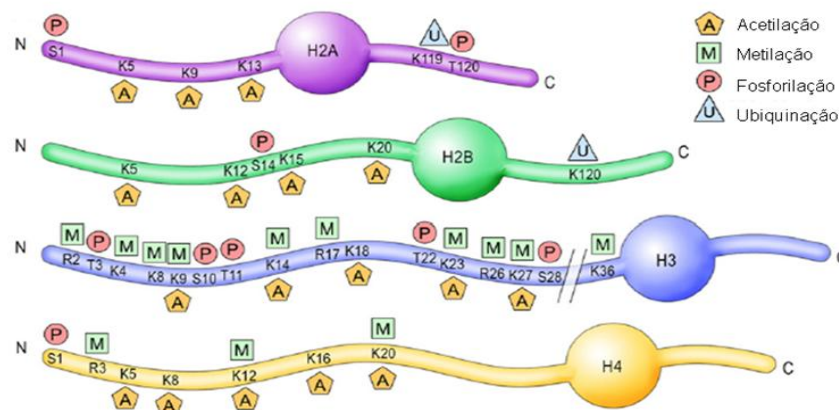


Figura 3 Modificações epigenéticas em histonas (Adaptada de Gräff e Mansuy, 2008).

Dentre estas modificações, destaca-se a acetilação de histonas, a qual facilita o processo de transcrição gênica através do relaxamento da cromatina (Waggoner, 2007; Yoo e Jones, 2006). Inversamente, a desacetilação de histonas torna a estrutura da cromatina mais compacta, o que atenua o processo de transcrição e contribui para o silenciamento gênico (Strahl e Allis, 2000; Turner, 2002).

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) em lisinas da cauda N-terminal das histonas, o que neutraliza a carga positiva das extremidades destas proteínas, enfraquecendo as interações eletrostáticas com o DNA, carregado negativamente. Inversamente, as HDACs promovem a desacetilação das histonas, ou seja, a remoção do grupo acetil destas proteínas contrabalanceando o papel das HATs, conforme podemos observar na Figura 4 (Strahl e Allis, 2000; Turner, 2002; Waggoner, 2007; Yoo e Jones, 2006). Em função de sua ação, as HATs são consideradas coativadoras da transcrição, enquanto as HDACs são consideradas co-repressoras da transcrição (Rountree et al., 2001). Assim, estas duas enzimas desempenham um papel chave na modificação da estrutura da cromatina e conseqüentemente, na regulação da expressão gênica (Khan and La Thangue, 2008).

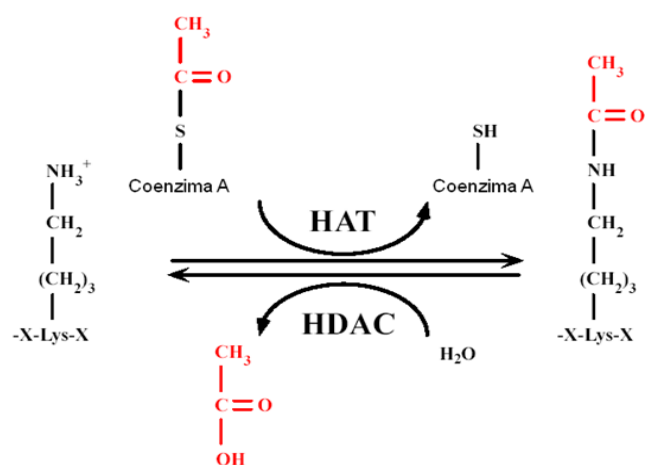


Figura 4 Acetilação e desacetilação de histonas, pela ação da HAT e da HDAC.

Evidências recentes sugerem que as modificações na cromatina derivadas de mecanismos epigenéticos são importantes fatores reguladores no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, no aprendizado e nos processos de memória (Jingwen et al., 2013).

Foi demonstrado que a consolidação da memória está ligada a acetilação da histona H3 em hipocampo de camundongos fêmeas jovens (Frick, 2013). Bousiges e colegas (2013) também observaram que ratos machos adultos jovens submetidos ao teste de medo condicionado apresentaram um aumento nos níveis de acetilação hipocampais das histonas H3, H4 e H2B, sugerindo o envolvimento da modulação epigenética na consolidação da memória. Dados obtidos recentemente em nosso laboratório mostraram uma redução nos níveis de acetilação da histona H4 em hipocampus de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento normal, o que estava associado a um déficit de memória aversiva (Lovatel et al., 2013). Corroborando estes achados, foi observado que ratos de 24 meses submetidos ao teste de *Morris water maze* apresentaram déficit de memória quando comparados com ratos adultos jovens (6 meses), o que estava associado a menores níveis hipocampais de acetilação de histonas, especificamente nas histonas H3 e H4 (Castellano, 2012). É interessante citar que o mesmo estudo também demonstrou que o aprendizado da tarefa comportamental leva a aumento da acetilação em ambas as idades.

Neste contexto, outros estudos demonstraram que inibidores de HDAC também podem melhorar o desempenho em tarefas de memória. Fontán-Lozano e colaboradores (2008) observaram que a inibição da HDAC não somente induziu a acetilação da histona H3 em hipocampo de camundongos adulto jovens, como também facilitou a formação da memória no teste de reconhecimento de objetos. Ainda, foi demonstrado que a administração de butirato de sódio, um inibidor da HDAC, pode melhorar os déficits de memória relacionados ao processo de envelhecimento. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado em ratos jovens, os quais não apresentam prejuízo de memória (Reolon, 2010).

Além desta relação positiva entre acetilação de histonas e memória, tem sido proposto 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 está relacionada com o processo de morte neuronal (Saha e Pahan, 2006). Cabe destacar 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 a desordens neurodegenerativas (Saha e Pahan, 2006).

Apesar das evidências demonstrarem o efeito central da acetilação de histonas em animais adultos jovens e envelhecidos, a modulação dos mecanismos epigenéticos sobre a função cerebral de ratos nas fases iniciais do desenvolvimento tem sido pouco explorada.

Pesquisas experimentais recentes têm sugerido que fatores ambientais como a alimentação, a poluição, o cuidado materno e a exposição ao enriquecimento ambiental e ao exercício físico desempenham papel crucial no desenvolvimento e na plasticidade da função cerebral através da modulação epigenética em diferentes fases do desenvolvimento (Feinberg, 2008; Foley et al., 2009; Handel et al., 2010; Elsner et al., 2011; Fagiolini et al., 2013).

Deve-se considerar que o grau de neuroplasticidade varia com a idade do indivíduo, sendo maior durante o chamado período crítico, e menos eficaz com o processo de envelhecimento (Cheung e Broman, 2000; Fontaine, 2000). Ainda, o período crítico tem sido considerado como uma fase na qual o cérebro é especialmente sensível a experiências do ambiente, sendo que os fatores ambientais podem modular sua função e influenciar sua integridade ao longo da vida (Andersen, 2003; Hillman et al., 2011). Neste contexto, foi descrito que o enriquecimento ambiental, o qual melhora a capacidade de aprendizado e consolidação da memória em ratos recém-nascidos (Champagne 2008), está associado ao aumento dos níveis hipocámpais de acetilação de histonas (Fischer; 2007). Ainda, foi observado que uma dieta rica em grupos metil em camundongos fêmeas grávidas

induziu um aumento na neurogenese de seus filhotes, o que estava correlacionado com modificações na metilação do DNA (Zeisel, 2009). Além disso, Roth e colegas (2009) encontraram um aumento nos níveis de metilação do éxon IV do gene promotor do BDNF e a consequente diminuição nos níveis de RNAm do mesmo em córtex pré-frontal de ratos expostos a cuidado materno excessivo. No entanto, não existem estudos que avaliem o impacto de fatores ambientais sobre a atividade das enzimas HAT e HDAC em cérebro de roedores nas fases iniciais do desenvolvimento.

Gomez-Pinilla e colegas (2011) demonstraram que animais exercitados adultos jovens apresentaram maiores níveis hipocampais de acetilação da histona H3 quando comparados ao grupo controle, o que estava relacionado ao aumento na expressão do gene do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Sabe-se que a ativação deste está correlacionada com o aumento de espinhos dendríticos e plasticidade sináptica, sendo um importante componente envolvido na memória e no aprendizado (Mendelsohn & Larrick, 2012). Corroborando estes achados, foi observado que um protocolo neuroprotetor de exercício físico induziu um aumento na atividade da HAT em combinação com uma diminuição na atividade da HDAC em hipocampo de ratos adultos jovens, sugerindo que o exercício pode modular os níveis hipocampais de acetilação de histonas através da atividade destas enzimas (Elsner et al., 2011). Também observamos recentemente em nosso laboratório que o exercício físico em esteira ergométrica é capaz de reverter os níveis reduzidos de acetilação da histona H4 em hipocampus de ratos Wistar de 20 meses de idade (Lovatell et al., 2013).

Apesar das evidências de que o exercício físico é capaz de modular os níveis de acetilação de histonas, e assim influenciar a maquinaria transcricional, os estudos são focados principalmente em cérebro de roedores adultos jovens e envelhecidos.

Considerando que o exercício físico é capaz de aumentar os níveis hipocampais de BDNF e a densidade axonal das células granulosas do giro

denteado, além de melhorar parâmetros de memória e aprendizado em roedores adolescentes, e que estes animais são suscetíveis a alterações epigenéticas induzidas por fatores ambientais (Titterness et al., 2011; Gomes da Silva et al., 2012), é relevante investigar os efeitos do exercício físico sobre parâmetros epigenéticos em animais no período crítico do desenvolvimento.

Cabe descrever que a maioria dos estudos que investigam a relação entre os efeitos do exercício físico e a modulação epigenética citados acima se restringe ao hipocampo. Trabalhos anteriores do grupo observaram que o exercício também é capaz de alterar os níveis das atividades das enzimas HAT e HDAC em córtex de ratos Wistar de 3 meses. Assim, podemos sugerir que outras áreas cerebrais também sejam suscetíveis a alterações epigenéticas induzidas pelo exercício.

Entre as diferentes estruturas cerebrais, o estriado destaca-se por ser uma região frequentemente associada ao planejamento e execução do movimento, além de estar envolvido na modulação do comportamento e cognição (Alexxai V, 2012, O'Callaghan C, 2013). Além disso, o estriado apresenta alta atividade neuronal durante o exercício (Vissing et al., 1996) e sua função está correlacionada com as diferentes fases do desenvolvimento.

Tem sido descrito que a integração e coordenação entre as regiões cerebrais, incluindo o estriado, tornam-se mais refinadas e eficientes durante a adolescência, sugerindo um papel de amadurecimento da função das estruturas durante esse período (Durston et al., 2006, Fair et al., 2009, Hwang et al., 2010, Liston et al., 2006 and Stevens et al., 2009). Além disso, estudos sugerem que o estriado também apresenta papel crucial no processo de recompensa e motivação. Fladung (2013) mostrou um aumento da sinalização nesta região em adolescentes com distúrbios alimentares (Fladung, 2013). Corroborando com estes dados, estudos experimentais também demonstram que roedores com atividade condicionada ao sistema estriatal apresentam aumento da auto-privação de alimentos (Kim, 2012).

Na fase adulta, o estriado parece exercer papel primordial na integração e no desenvolvimento motor (Alexxai V, 2012). Ainda, tendo em

vista a ligação anatômica do estriado com as regiões frontal, temporal e lobos insulares, assim como, com hipocampo e amígdala, sugere-se um papel do estriado na modulação do comportamento e cognição durante a fase adulta (O'Callaghan C,2013). 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 aprendizagem (Featherstone and McDonald 2004; Featherstone and McDonald 2005). 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 papel em diversas doenças neurodegenerativas, como Doença de Parkinson (DP) e Huntington, as quais são caracterizadas pelo comprometimento no comportamento motor (Alexxai V., 2012). Na Doença de Parkinson, por exemplo, observa-se um quadro clínico de hipocinesia, bradicinesia e distúrbios da marcha (Lökk, 2000), sendo o paciente inicialmente acometido por progressiva degeneração de neurônios da região Nigro-estriatal e conseqüentemente perda da transmissão dopaminérgica (Lau, 2011).

É relevante descrever que os mecanismos epigenéticos têm sido recentemente associados com a patogênese da Doença de Parkinson. Com base nisso, estudos pré-clínicos tem investigado o efeito do uso de inibidores de HDAC, tais como o Butirato de Sódio, Valproato e a Tricostatina nas desordens neurodegenerativas, inclusive na DP (Harrison e Dexter, 2013). Foi descrito que a Tricostatina é capaz não só de proteger neurônios dopaminérgicos em co-cultura de neurônios e células gliais, como também induz um aumento na expressão de BDNF e GDNF em modelo animal de DP (Wu et al., 2008). Ainda, outro estudo demonstrou que o Valproato protegeu parcialmente a morte celular de neurônios dopaminérgicos em um modelo animal de DP, além de aumentar a acetilação da histona H3 (Kidd e Schneider, 2011). Estudos clínicos mostram que a implementação de exercício físico contínuo em indivíduos nos estágios precoces da Doença de Parkinson resulta em melhora das

atividades diárias, da atividade motora e da deambulação (Lau, 2011). No entanto, estudos que avaliem o efeito do exercício físico sobre parâmetros epigenéticos em estriado durante o processo de envelhecimento cerebral normal são raros.

É digno de nota que as respostas associadas ao exercício físico dependem do protocolo de treinamento utilizado, variando conforme a frequência, a duração e a intensidade do esforço (Narath et al., 2001). Ainda, estudos têm demonstrado que os efeitos do exercício também são influenciados pelo tempo decorrido após o término da última sessão de treino. Recentemente foi observado que marcadores epigenéticos relacionados com os níveis hipocampais de acetilação de histonas podem sofrer mudança rápida e transiente em ratos Wistar adultos jovens e envelhecidos (Elsner et al., 2011; Lovatell et al., 2013), contrariando estudos anteriores que sugeriam que as mudanças ocasionadas eram permanentes (Miller and Sweatt, 2007). Desta forma, a duração dos efeitos do exercício sobre a modulação de mecanismos epigenéticos relacionados com a função cerebral devem ser melhor exploradas.

Com base nestes achados, o objetivo deste estudo consiste em investigar os efeitos agudos e tardios do exercício físico sobre a atividade da enzima HDAC em estriado de ratos em diferentes fases do desenvolvimento.

Justificativa e Hipótese

Estudos demonstram que o grau de neuroplasticidade varia de acordo com a idade, sendo maior durante o período crítico, que compreende as fases iniciais do desenvolvimento. Considerando que os estudos prévios de nosso laboratório investigaram o impacto do exercício físico sobre parâmetros epigenéticos em cérebro de roedores adultos jovens, maduros e envelhecidos, torna-se relevante analisar essa modulação em animais durante estágios precoces do desenvolvimento, uma vez que o cérebro parece ser mais susceptível às modulações ocasionadas pela experiência do ambiente nestes estágios.

Ainda, a maioria dos estudos envolvendo os efeitos do exercício físico e sua relação com mecanismos epigenéticos se restringe ao hipocampo. Desta forma, é interessante investigar a modulação do exercício físico sobre os mecanismos epigenéticos no estriado, o qual está associado à função cognitiva e ao controle motor.

Tendo em vista o exposto até o presente, nossas hipóteses de trabalho estão baseadas na possibilidade de que a exposição ao exercício físico diminua a atividade da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar. Sugerindo assim um aumento na atividade transcricional e consequentemente da transcrição gênica. Além disso, esperamos que a modulação da atividade da HDAC pelo exercício possa variar conforme a fase do desenvolvimento.

Objetivo geral

- Avaliar o efeito do exercício físico moderado em esteira ergométrica sobre a atividade global da enzima HDAC em estriado de ratos Wistar em diferentes fases do desenvolvimento.

Objetivos específicos

1- Analisar a influência da fase do desenvolvimento na modulação da atividade global da enzima HDAC;

2- Investigar o efeito do tempo após o treino sobre a atividade da enzima HDAC

As amostras utilizadas para o trabalho são objetos da tese de doutorado em execução pela doutoranda Viviane Elsner, intitulado como “MODULAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS EM ENCÉFALOS DE RATOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO” e da dissertação de mestrado do Msc. Christiano Spindler intitulado “EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO EM ESTEIRA SOBRE PARÂMETROS EPIGENÉTICOS EM ESTRUTURAS”. Os projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFRGS, sob o número 21449 e pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 09-123, respectivamente.

TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

International Journal of Developmental Neuroscience

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

Carla Basso^b, Viviane Rostirola Elsner^a, Christiano Spindler^a, Felipe Moysés^a, Karine Bertoldi^a, Louisiana Carolina Ferreira de Meireles^c, Laura Reck Cechinel^b, Arthiese Korb^c, 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,

*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 Sarmento 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 exercise effect on HDAC activity in striatum from Wistar rats at different stages of development. Male Wistar rats aged 21 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 young adult and aged rats. This epigenetic process is regulated 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 mediating the effects of early-life experiences, such as maternal care, on gene expression, synaptic transmission and the consequent behavior has been widely accept (Fagiolini, 2009). Although findings obtained by de Almeida and colleagues (2013) suggesting that exercise outcomes may vary through the developmental stages, 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 (21 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 1996) 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. The striatum were quickly dissected out, immediately snap-frozen in liquid nitrogen and store at -80°C. On the day of the assay, whole 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 x *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 and analyzed by Student's t test to compare the difference between EXE and SED groups. In all tests, $p < 0.05$ was considered significant.

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. It was observed that the training induced short and long-term effects on global HDAC activity in the adolescent group, given that exercised rats showed decreased HDAC activity 1 h (about 30%, $p < 0.01$) and 18 h (about 20%, $p < 0.01$) after training compared to its sedentary groups (Fig 1A). However, no significant difference was found in the young adult and aged groups in the evaluated time-points, 1 h and 18 h (Fig. 1B and C). The chronic exercise regimen did not modify the global HDAC activity in any groups ($p > 0.05$; Fig. 2).

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 levels 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, 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, where both exercise protocols, voluntary and forced, were able to improve learning and memory performance, with concomitantly 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 involved 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, given that 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 enhanced HAT activity immediately after training, as well as, 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, but 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.

Firstly, it was 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). Accordingly, 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 (Lovatelli 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., 2013). 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.

5- References

- 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.
- 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.
- Albouy, G., Sterpenich, V., Vandewalle, G., Darsaud, A., Gais, S., Rauchs, G., Deseilles, 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Chandramohan, Y., Droste, S.K., Arthur, J.S., Reul, J.M., 2008. The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phosphorylation 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.

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

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.

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.

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.

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. *Neuroscience*. 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.

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.

MacRae, P.G., Spirduso, W.W., Walters, T.J., Farrar, R.P., Wilcox, R.E., 1987. Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolites in presenescent older rats. *Psychopharmacology*. 92(2):236-40.

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.

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.

List of Legends

Figure 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. Results are expressed as percentage of the SED1h group and columns represent mean±S.D. (n=5-8). Student t-Test,* = significantly different from its respective SED control group (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±S.D. (n=5-8). Student t-Test,* = significantly different from its respective SED control group (p<0.05).

Figure 1

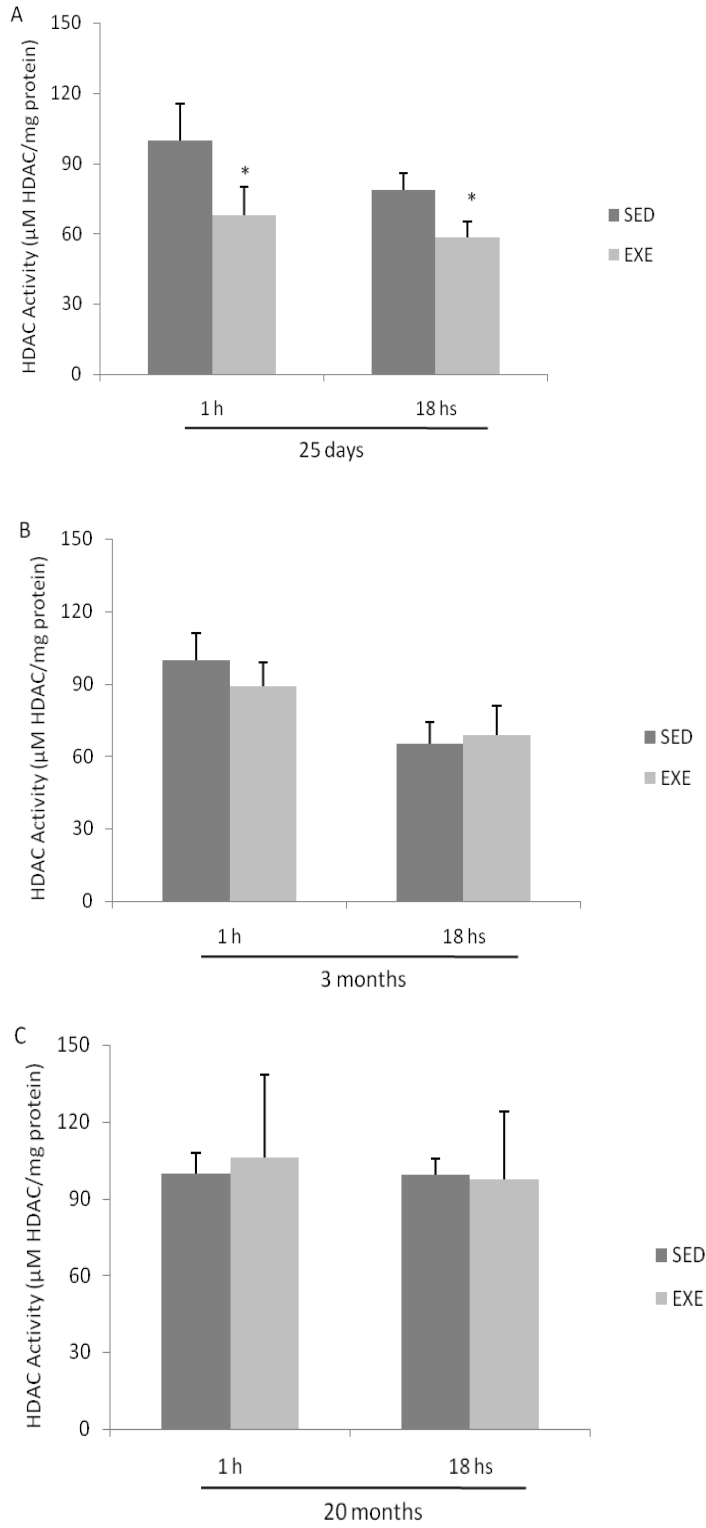
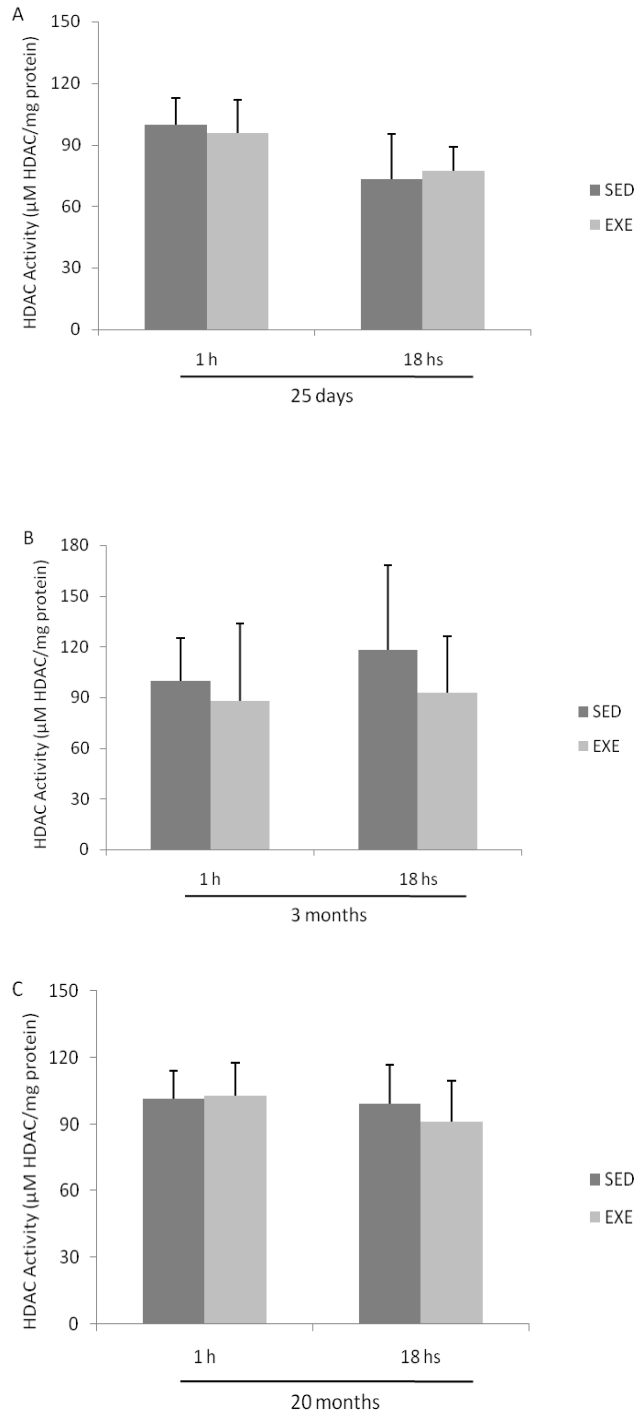


Figure 2



Conclusão

O presente trabalho demonstrou que o exercício físico é capaz de induzir alterações epigenéticas em estriado de ratos adolescentes, as quais podem estar relacionadas com a transcrição e expressão de genes específicos envolvidos na função cerebral. Ainda, podemos inferir que o estriado de ratos adolescentes é mais susceptível a modulação de parâmetros epigenéticos mediada pelo exercício físico, uma vez que não observamos essa alteração nos animais adultos jovens e envelhecidos. Outros estudos são necessários para melhor elucidar as vias pelas quais essas modificações ocorrem e melhor compreender os mecanismos pelos quais os marcadores epigenéticos variam conforme a idade em resposta à exposição ao exercício físico.

Perspectivas

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

- Investigar o efeito destes protocolos de exercício físico sobre a atividade da enzima HAT em hipocampo, córtex, cerebelo e estriado de ratos adolescentes e envelhecidos;

- Quantificar os níveis de acetilação global de histonas nestas estruturas encefálicas;

- Analisar a modulação do exercício físico sobre parâmetros de metilação, tais como, os níveis de metilação global de DNA em estruturas encefálicas (hipocampo, córtex, estriado e cerebelo) de ratos adolescentes, adultos jovens e envelhecidos;

Referências adicionais

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.

Andersen UB, Olsen MH, Dige-Petersen H, Ibsen H. 2003. Exercise blood pressure is related to insulin resistance in subjects with two hypertensive parents. *Blood Press.* 12(5-6):314-8.

Bird A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396–398

Bousiges O, Neidl R, Majchrzak M, Muller MA, Barbelivien A, Pereira de Vasconcelos A, Schneider A, Loeffler JP, Cassel JC, Boutillier AL. 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

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(3):e33249

Champagne FA. 2008. Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Front Neuroendocrinol*29(3):386-97

Cheung ME, Broman SH (2000), Adaptive learning interventions for verbal and motor deficits. *Neurorehab Neural Repair* 14:159-69.

Durstun 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(10):1062-70

Featherstone RE, McDonald RJ, 2004. Dorsal striatum and stimulus-response learning: lesions of the dorsolateral, but not dorsomedial, striatum impair acquisition of a simple discrimination task. *Behav Brain Res*150(1-2):15-23.

Featherstone RE, McDonald RJ, 2005. Lesions of the dorsolateral striatum impair the acquisition of a simplified stimulus-response dependent conditional discrimination task. *Neuroscience*136(2):387-95

Fladung AK, Schulze UM, Schöll F, Bauer K, Grön G. 2013. Role of the ventral striatum in developing anorexia nervosa. *Transl Psychiatry*3:e315

Fontaine R (2000), *Psicologia do Envelhecimento*. 1ª Edição, Lisboa: Climepsi Editores.

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* 193-201

Frick KM. 2013 Epigenetics, estradiol, and hippocampal memory consolidation. *J Neuroendocrinol*. doi: 10.1111/jne.12106

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. 2012 Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. *Hippocampus* 22(2):347-58

Gupta R, Nagarajan A, Wajapeyee N. 2010 Advances in genome-wide DNA methylation analysis. *Biotechniques* 49(4):iii-xi

Hillman CH, Kamijo K, Scudder M. 2011 A review of chronic and acute physical activity participation on neuroelectric measures of brain health and cognition during childhood. *Prev Med* 52 Suppl 1:S21-8.

Harrison IF, Dexter DT. 2013 Epigenetic targeting of histone deacetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease? *Pharmacol Ther* 140(1):34-52.

Hwang IK, Yi SS, Song W, Won MH, Yoon YS, Seong JK. 2010 Effects of age and treadmill exercise in chronic diabetic stages on neuroblast differentiation in a rat model of type 2 diabetes. *Brain Res* 1341:63-71

Kidd SK, Schneider JS. 2011 Protective effects of valproic acid on the nigrostriatal dopamine system in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 194:189-94.

Khan O, La Thangue NB. 2008 Drug Insight: histone deacetylase inhibitor-based therapies for cutaneous T-cell lymphomas. *Nat Clin Pract Oncol*. 5(12):714-26

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(4):475-86

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(4):553-60

- Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO. 2011. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur J Neurosci* 33(7):1264-74.
- Lökk J. 2000. The effects of mountain exercise in Parkinsonian persons - a preliminary study. *Arch Gerontol Geriatr* 31(1):19-25
- Moniot S, Weyand M, Steegborn C. 2012. Structures, substrates, and regulators of Mammalian sirtuins - opportunities and challenges for drug development. *Front Pharmacol.* 3:16
- Mendelsohn AR, Larrick JW. 2012. Epigenetic-mediated decline in synaptic plasticity during aging. *Rejuvenation Res.* 15(1):98-101
- Miller CA, Sweatt JD. 2007. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron.* 53(6):857-69
- 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(10):1699-711
- O'Callaghan C, Hornberger M. 2013. Screening for impulse control symptoms in patients with de novo Parkinson disease: a case-control study. *Neurology.* 81(7):694-5
- Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, Boutillier AL. 2003. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO* 22(24):6537-49. J
- Reik W, Kelsey G, Walter J. 1999. Dissecting de novo methylation. *Nat Genet* 23(4):380-2
- Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. 2001. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene.* 20(24):3156-65
- Roth TL, Lubin FD, Funk AJ, Sweatt JD. 2009. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry* 65(9):760-9
- Stevens MC, Kiehl KA, Pearlson GD, Calhoun VD. 2009. Brain network dynamics during error commission. *Hum Brain Mapp.* 30(1):24-37.
- 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. *Neuroscience* 183:25-31
- Turner DL, Sumners DP. 2002. Associative conditioning of the exercise ventilatory response in humans. *Respir Physiol Neurobiol* 132(2):159-68.
- Vissing J, Andersen M, Diemer NH. 1996. Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(4):729-36.

