

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Efeito do extrato etanólico de *Curcuma longa* sobre a atividade da enzima histona desacetilase no processo de envelhecimento cerebral

Gabriela dos Santos Sant'Anna

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, dezembro de 2012

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra Ionara Rodrigues Siqueira pela confiança inicialmente depositada em mim. Pela presença e orientação constantes ao longo da realização deste projeto, e pelos bons exemplos que me fizeram amadurecer como aluna. Especialmente, pela compreensão e paciência nos momentos finais.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, por terem me proporcionado uma excelente experiência de estudo.

Aos colegas de laboratório (Gi, Vivi, Kaki, Felipe, Chris, Arthi, Laura) pela imensurável e indispensável ajuda técnica.

Agradeço à Silvia Maria Zanette Guimarães, Ilma Brum da Silva e Vanderlei Biolchi pelo auxílio em várias etapas deste projeto, por estarem sempre disponíveis para qualquer ajuda, e também pela amizade nas horas difíceis.

Aos meus amigos, que estiveram presentes durante essa jornada.

A toda minha família, por todo apoio e incentivo aos estudos. Por terem sido sempre exemplos de amor, trabalho e dedicação a tudo que fazem. E o mais importante, por terem compreendido e apoiado minhas escolhas.

“O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se”

(Voltaire)

## RESUMO

Com o aumento da expectativa de vida, estima-se um aumento na incidência de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (DA). Vários processos fisiopatológicos interligados estão envolvidos tanto no processo do envelhecimento, quanto na etiologia das desordens neurodegenerativas, como por exemplo, o estresse oxidativo e a neuroinflamação. Têm sido descrito que mecanismos epigenéticos podem estar relacionados com o processo de envelhecimento, ocasionando modificações na expressão gênica em diferentes regiões do cérebro, como por exemplo, a acetilação de histonas que é responsável em parte, pela transcrição gênica, sendo esse processo controlado por duas enzimas, a histona acetiltransferase (HAT) e a histona desacetilase (HDAC). A HAT é responsável por ocasionar um relaxamento da cromatina e com isso uma maior acessibilidade para o processo de transcrição gênica enquanto que a HDAC causa uma maior compactação da cromatina, resultando uma supressão na transcrição gênica. Considerando o papel da acetilação de histonas no processo de envelhecimento, em especial em doenças neurodegenerativas, tem sido sugerido o uso de estratégias que aumentem a acetilação com finalidade neuroprotetora como, por exemplo, o uso de inibidores de HDAC. Diversos estudos demonstram que os inibidores da HDAC são capazes de melhorar as funções cognitivas e a formação de memória. Nesse contexto, a curcumina, um composto polifenólico encontrado no açafrão (*Curcuma longa*) tem demonstrado ser capaz de atuar sobre os mecanismos epigenéticos, sendo sugerido como um potente inibidor da HDAC. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar o tratamento agudo com extrato etanólico de *Curcuma longa* sobre a atividade da enzima histona desacetilase em estruturas cerebrais, hipocampo e córtex frontal, de ratos Wistar. Ratos Wistar machos adultos (3 e 20 meses de idade) foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos: salina, veículo (DMSO), extrato etanólico de *Curcuma longa* 10mg/Kg e 50mg/Kg. A atividade da histona desacetilase (HDAC) foi mensurada após 2 e 18 horas da administração, utilizando kit de ELISA específico. A ANOVA de três vias indicou um efeito do tempo ( $F_{(1,71)}=4.238, p=0.044$ ) após a administração do extrato etanólico de *Curcuma*

*longa* e um efeito da idade em hipocampos ( $F_{(1,71)}=10.430$ ,  $p=0.002$ ), ou seja, animais com 20 meses apresentaram atividade maior da HDAC quando comparados com os animais de 3 meses de idade. Em córtex frontal, a ANOVA de três vias indicou um efeito da idade ( $F_{(1,75)}=4.438$ ,  $p=0.039$ ) e uma interação entre idade e tempo ( $F_{(1,75)}=1.765$ ,  $p=0.001$ ). Em ambas as estruturas analisadas, não houve efeito da administração com extrato de *Curcuma longa*. Nossos resultados demonstram que a atividade da histona desacetilase foi aumentada em ambas as estruturas testadas de ratos com 20 meses de idade, sugerindo que no processo de envelhecimento cerebral ocorra uma redução na acetilação de histonas, o que pode reduzir a transcrição gênica. Além disso, a atividade da HDAC parece ser influenciada pelo ritmo circadiano, uma vez que houve um efeito do tempo nos níveis da atividade da HDAC em ambas as estruturas analisadas. A atividade da HDAC foi maior no tempo de 18 horas (correspondendo ao período da manhã) quando comparado ao tempo de 2 horas, que corresponde ao turno da tarde, este dado pode estar relacionado à cronobiologia, onde a organização circadiana permite que o organismo mantenha a homeostase em resposta a variações diárias decorrentes do ambiente externo e do próprio organismo. Cabe descrever que os ratos Wistar são notívagos, onde o período da manhã é o início do período de sono; assim poderíamos sugerir uma redução da acetilação e conseqüentemente uma redução na expressão gênica nesse período.

**Palavras-chave:** envelhecimento, *Curcuma longa*, atividade da histona desacetilase, ratos Wistar, hipocampos, córtex frontal.

## ABSTRACT

With the increase of life expectancy, an increase in the incidence of neurodegenerative diseases, for example, the Alzheimer's disease (AD), is estimated. Several interconnected pathophysiological processes are involved both in the aging process and neurodegenerative diseases, oxidative stress and neuroinflammation. It has been described that epigenetic alterations may be related to the aging process, causing changes in gene expression in different regions of the brain, such as, histone acetylation (HAT), and histones deacetylases (HDAT). The HAT is responsible for causing a relaxation of chromatin and, thus, a better accessibility to the process of gene transcription, while HDAC causes further compactation of chromatin, resulting in gene transcription suppression. Considering the role of histone acetylation in the aging process, especially in neurodegenerative diseases, it has been suggested the use of strategies to increase the acetylation with neuroprotective purposes, such as, for example, the use of HDAC inhibitors. Several studies have shown that HDAC inhibitors are capable of improving the cognitive functions and memory formation. In this context, curcumin, a polyphenolic compound found in turmeric (*Curcuma longa*) has been shown to be capable of acting on epigenetic mechanisms, being suggested as potent inhibitor of HDAC. The aim of this work was to investigate the effect of acute treatment with ethanol extract of *Curcuma longa* on the activity of histone deacetylases enzymes in brain structures, hippocampus and frontal cortex of Wistar rats. Male Wistar rats (3 and 20 months old) were randomly distributed into four groups: saline, vehicle (DMSO), *Curcuma longa* ethanol extract (10mg/kg and 50mg/Kg.) The histone deacetylase (HDAC) activity was measured 2 and 18 hours after administration, using specific ELISA kit. The three-way ANOVA showed a time effect ( $F_{(1,71)}=4.238, p=0.044$ ) after the administration of *Curcuma longa* ethanol extract and an age effect in hippocampus ( $F_{(1,71)}=10.430, p=0.002$ ), that is, 20-months Wistar rats presented a higher HDAC activity when compared to 3-months Wistar rats. In frontal cortex, the three-way ANOVA showed an age effect ( $F_{(1,75)}=4.438, p=0.039$ ) and an interaction between age and time ( $F_{(1,75)}=1.765, p=0.001$ ). In both structures, there was no effect of *Curcuma longa* extract administration. Our results show that the activity of histone deacetylase was increased in both structures of 20-months Wistar rats, suggesting that in the brain

aging process it occurs a reduction in histone acetylation, which can reduce gene transcription. Furthermore, as there was a time effect on the levels of HDAC activity in both analyzed structures, the HDAC activity may be influenced by the circadian rhythm. The HDAC activity was higher in 18 – hour period (corresponding to the morning period) as compared to 2 - hour period (corresponding to the afternoon period). This finding may be related to chronobiology, in which the circadian organization allows the body to maintain homeostasis in response to daily changes arising from the external environment and the body itself. It is important to highlight that Wistar rats are nocturnal creatures, having the morning as the beginning of the sleep period. So, they can present a reduction in acetylation and a consequent reduction in gene expression during this period.

**Key Words:** aging, *Curcuma longa*, histone deacetylase activity, Wistar rats, hippocampus, frontal cortex

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estrutura do nucleossomo, unidade estrutural de um cromossomo eucariótico que possui uma dupla fita de DNA enroladas em um octâmero de histonas (página 16).

**Figura 2.** Grau de compactação da cromatina. **(A)** Eucromatina, a cromatina apresenta-se mais acessível para o processo transcricional; **(B)** Heterocromatina, a cromatina está mais condensada, ocorre uma diminuição da transcrição gênica (página 17).

**Figura 3.** Diagrama do nucleossomo formado por octâmero de histonas envolto de dupla fita de DNA. As caudas N-terminais das histonas mostram uma variedade de modificações pós-translacionais (página 18).

**Figura 4.** **(A)** Acetilação de histonas demonstrando a ação das enzimas histonas acetiltransferases (HAT), permitindo maior acessibilidade para o processo de transcrição gênica; **(B)** Acetilação de histonas pela ação das histonas desacetilases (HDAC), ocasionado uma maior compactação da cromatina e com isso levando a uma diminuição da transcrição gênica (página 19).

**Figura 5.** **(A)** Espécie *Curcuma longa*. **(B)** Rizomas da espécie *Curcuma longa* (página 22).



**Figura 6.** Estrutura química dos três compostos polifenólicos majoritários de *Curcuma longa* (página 24).

### Lista de Abreviaturas e Siglas

- AMPc** Monofosfato Cíclico de Adenosina
- BDNF** Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- CREB** Proteína Ligadora ao Elemento Responsivo ao AMPc
- DA** Doença de Alzheimer
- DNA** Ácido desoxirribonucleico
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- e.p.m** erro padrão médio
- EO** Estresse Oxidativo
- HAT** Histona Acetiltransferase
- HDAC** Histona Desacetilase
- IBGE** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- NAD<sup>+</sup>** Dinucleotídeo Adenina Nicotinamida

## Sumário

1.Introdução.....	11
2. Revisão da literatura.....	13
2.1 Envelhecimento.....	13
2.2 Epigenética.....	15
2.2.1 Definição e perspectiva histórica.....	15
2.2.2 DNA,histonas e cromatina.....	15
2.2.3 Mecanismos epigenéticos.....	16
2.2.4 Acetilação de histonas.....	18
2.3 Envelhecimento e mecanismos epigenéticos.....	20
2.4 Curcumina e mecanismos epigenéticos.....	21
2.5 Caracterização da <i>Curcuma longa</i> .....	22
2.5.1 Efeito protetor da <i>Curcuma longa</i> .....	24
3. Objetivos.....	26
3.1 Objetivo principal.....	26
3.2 Objetivos secundários.....	26
4.Referências bibliográficas.....	27
5. Artigo em inglês.....	39
6. Considerações finais.....	58

## 1. Introdução

No Brasil, em 2008, os idosos representavam 9,5% da população, de forma que, sugere-se que, no ano de 2050, esta fatia populacional representará aproximadamente 30% da população brasileira. Nosso País apresentará uma pirâmide populacional semelhante àquelas dos países europeus na atualidade, assim, o Brasil será um dos países com o maior número de idosos do mundo (IBGE, 2008).

Com o aumento da expectativa de vida há um conseqüente aumento na incidência de doenças neurodegenerativas, o que torna imprescindível a procura de novas estratégias de tratamento e prevenção destas desordens (Aprahamian *et al.*, 2009).

As plantas têm sido consideradas interessantes fontes de compostos com atividades relevantes, como atividade antioxidante, no processo de envelhecimento. As plantas medicinais são amplamente exploradas para a produção de fármacos, tanto como fitoterápicos, quanto como fonte de novos compostos-protótipos para a indústria farmacêutica (Elisabetsky & Shanley, 1994, Shinomol *et al.*, 2011). Recentemente, tem-se introduzido uma nova visão quanto à função das plantas na alimentação, com fortes evidências de achados experimentais e epidemiológicos, sugerindo que certos alimentos, além de nutrientes clássicos, como proteínas, lipídios e carboidratos, contêm compostos bioativos, representados por inúmeras classes de compostos que parece ser excelentes coadjuvantes na prevenção e/ou tratamento de várias doenças crônico-degenerativas (Vanamala *et al.*, 2012).

Compostos oriundos de determinadas plantas parecem possuir um papel importante na prevenção e no tratamento de diversas doenças neurodegenerativas, entre elas a Doença de Alzheimer (Rossi *et al.*, 2008; Kumar & Kanum, 2012).

Os compostos polifenólicos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e possuem, entre outras, alta atividade antioxidante, ou seja, são capazes de sequestrar radicais livres protegendo as células do dano oxidativo. Há várias evidências de que a dieta pode interferir no processo de envelhecimento. Uma dieta rica em compostos polifenólicos parece trazer benefícios à saúde e proporciona

longevidade reduzindo o estresse oxidativo, regulando sinais de transdução e a expressão gênica (Rossi *et al.*, 2008, Reuter *et al.*, 2011).

A planta *Curcuma longa* pertence à família Zingiberaceae, conhecida popularmente como açafrão-da-terra, cúrcuma, turmérico, açafrão-da-índia e gengibre amarelo. É uma planta originária da Índia e cultivada em todo o mundo para uso condimentar e medicinal (Pereira & Moreira, 2009; Hamaguchi *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2012). É amplamente utilizada na Medicina Ayurvédica, sistema medicinal originário da Índia que utiliza plantas no tratamento de diversas doenças (Ringmann *et al.*, 2005).

Esta espécie possui três curcuminóides predominantes, a curcumina, a demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina, além de compostos voláteis (tumerona, atlantona e zingiberona), açúcares, proteínas e resinas (Jurenka, 2009; Hamaguchi *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado que os compostos polifenólicos derivados da *Curcuma longa* possuem ação neuroprotetora, sendo um forte candidato para o tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas relacionadas ao envelhecimento, como a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Acidente Cerebral Vascular (Rossi *et al.*, 2008; Gomez-Pinilla, 2011; Huang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012).

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 Envelhecimento

O envelhecimento é caracterizado por ser um processo multifatorial, afetando as funções fisiológicas e bioquímicas da maioria dos órgãos, levando a um aumento na susceptibilidade a várias doenças associadas à idade (Rodríguez-Rodero *et al.*, 2011). Estudos mostram que o envelhecimento cerebral é caracterizado pelo declínio gradual das funções cognitivas e deterioração das funções sinápticas em regiões específicas do cérebro, como por exemplo, o hipocampo e córtex pré-frontal (Lynch *et al.*, 2006).

Diversos estudos têm sido propostos a fim de investigar os mecanismos moleculares e celulares que possam estar envolvidos no processo de envelhecimento (Menárd & Quirio, 2012). Cabe lembrar que várias linhas de evidências apóiam a hipótese de que os radicais livres e o estresse oxidativo (EO) estão envolvidos nesse processo (Tuder *et al.*, 2012; Barone *et al.*, 2012). Foi demonstrado que ocorre um aumento significativo na produção de radicais superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogênio em mitocôndrias, e no conteúdo de dano oxidativo em macromoléculas em tecidos de várias espécies (Beckman & Ames 1998; Kirkinezos *et al.*, 2005). Estudos comparativos relatam que a produção mitocondrial de radicais livres é menor em espécies com longa expectativa de vida (Barja *et al.*, 1994, Floyd *et al.*, 2001). Tem-se demonstrado que a administração de seqüestradores de radicais livres recupera o prejuízo da memória espacial e diminuem o dano em proteínas cerebrais de ratos e gerbilos (Carney *et al.*, 1991), sugerindo que a modificação oxidativa de biomoléculas pode ter um importante papel no processo do envelhecimento.

Resultados obtidos no nosso laboratório corroboram os estudos que sugerem que o EO pode estar envolvido no envelhecimento cerebral, já que vários marcadores de EO se apresentaram alterados em regiões cerebrais. Ratos Wistar senescentes (20 meses de idade) apresentaram um aumento na geração de radicais livres em hipocampo, estriado e cerebelo, sendo que o aumento no hipocampo

ocorreu já na idade madura (6 meses de idade), quando comparados a ratos jovens (2 meses de idade). Foi encontrada uma diminuição significativa da reatividade antioxidante total em todas as estruturas cerebrais (cerca de 40%) (Siqueira *et al.*, 2005). Conforme Lissi e colaboradores (1995) uma redução neste parâmetro pode ser responsável pela maior susceptibilidade a eventos oxidativos, logo, a diminuição na capacidade antioxidante no processo de envelhecimento cerebral pode estar, pelo menos em parte, relacionado à grande susceptibilidade a eventos oxidativos (Siqueira *et al.*, 2005).

Cabe descrever que, com o aumento da expectativa de vida detectou-se um consequente aumento na incidência de doenças neurodegenerativas, como a Doenças de Alzheimer, o que torna imprescindível a procura de estratégias de tratamento e prevenção destas desordens, além de alternativas que auxiliem na prevenção das alterações fisiológicas e comportamentais relacionadas ao envelhecimento normal (Aprahamian *et al.*, 2009).

A Doença de Alzheimer (DA) é responsável por 50-60% do número total de casos de demência entre pessoas acima dos 65 anos. Esta afeta aproximadamente 1,5% da população com idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 anos e 39% acima dos 90 anos, acometendo cerca de 15 milhões de pessoas em todo o mundo (Viegas *et al.*, 2004). Isso revela a magnitude do problema no Brasil, onde vivem em torno de 15 milhões de pessoas com mais de 60 anos (Forlenza, 2005).

Várias evidências experimentais demonstram que a suplementação baseada em extratos de plantas com propriedades antioxidantes retardam déficits neuronais relacionados à idade em roedores (Bickford *et al.*, 2000; Villeponteau *et al.*, 2000; Willis *et al.*, 2009).

## 2.2 Epigenética

### 2.2.1 Definição e perspectiva histórica

O termo Epigenética foi primeiramente descrito, em 1942, pelo biólogo Conrad H. Waddington que definiu como sendo um ramo da Biologia que estuda as interações causais entre os genes e seus produtos, sendo responsáveis pela produção do fenótipo. A definição, proposta por Verdone *et al.* (2006), a descreve como “toda modificação que ocorre na cromatina que não envolva modificações na sequência do DNA”.

Pesquisas recentes têm demonstrado que o ambiente é capaz de induzir modificações epigenéticas e conseqüentemente modular a expressão de genes específicos. A maioria destes estudos utiliza modelos animais e demonstram que essas modificações afetam diferentes estruturas celulares, podendo influenciar no desenvolvimento de diversas doenças (Mastroeni *et al.*, 2011; Foley *et al.*, 2009; Handel *et al.*, 2010). Entre os fatores que podem induzir as modificações epigenéticas, os mais citados incluem a alimentação, poluição, drogas e o exercício físico (Hardy & Tollefsbol, 2011).

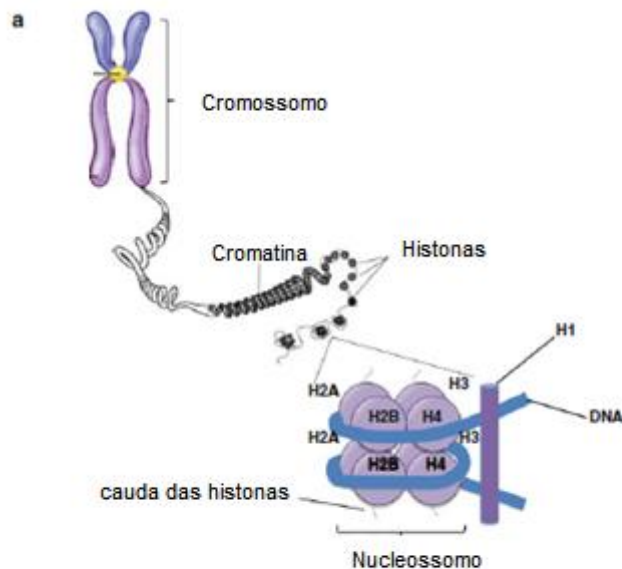
### 2.2.2 DNA, Histonas e Cromatina

Em células eucarióticas, o DNA genômico é envolto por proteínas denominadas histonas, originando a cromatina (Shiv *et al.*, 2007). Nucleossomo é a unidade estrutural de um cromossomo eucariótico que consiste numa unidade de DNA dividida em duas espirais, que se encontram enroladas em um octâmero protéico (Fig.1), constituído por quatro pares de proteínas chamadas histonas, H2A, H2B, H3 e H4 (Verdone *et al.*, 2006; Kouzarides, 2007; Gonzalo, 2010). A histona H1 auxilia na estabilização da cromatina (Verdone *et al.*, 2006).

As histonas são proteínas que possuem alta proporção dos resíduos de aminoácidos, lisina e arginina, os quais são carregados positivamente, resultando em alta afinidade ao DNA, que tem um alto conteúdo de carga negativa. Cada uma das histonas presentes no nucleossomo apresenta uma sequência amino-terminal



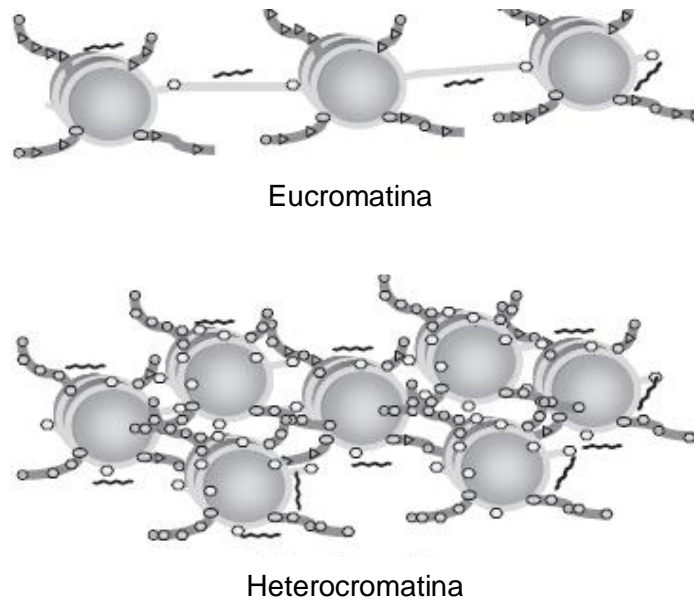
(N-terminal) flexível de 11 a 37 aminoácidos. Estas regiões são conhecidas como “caudas das histonas” (Kouzarides, 2007).



**Figura 1.** Estrutura do nucleossomo, unidade estrutural de um cromossomo eucariótico que possui uma dupla fita de DNA enroladas em um octâmero de histonas (Adaptado de Reuter *et al.*, 2011).

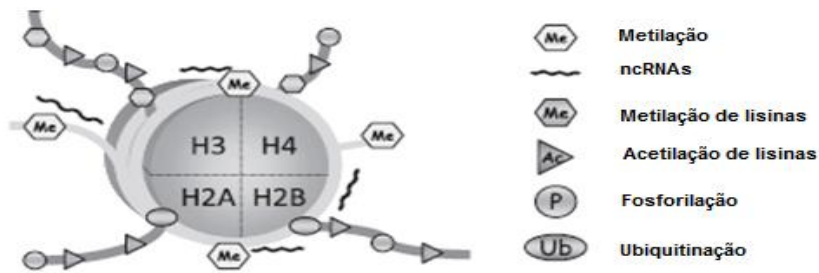
### 2.2.3 Mecanismos epigenéticos

A posição dos nucleossomos em relação ao DNA é um fator que altera o grau de compactação da cromatina e sua acessibilidade para o processo transcricional (Lund & Lohuizen, 2004). Quando a cromatina encontra-se num estado mais condensado, é denominada heterocromatina (Fig.2A), sendo associada com a repressão e o silenciamento gênico. Quando a cromatina apresenta-se mais acessível, ou seja, menos condensada ela é denominada de eucromatina (Fig.2B), permite a transcrição gênica e com isso aumenta a expressão gênica (Rodenhiser & Mann, 2006). Este estado dinâmico da cromatina pode ser alterado por modificações epigenéticas, envolvendo mecanismos bioquímicos que atuam nas histonas ou no próprio DNA (Kouzarides, 2007).



**Figura 2.** Grau de compactação da cromatina. **(A)** Euromatina, a cromatina apresenta-se mais acessível para o processo transcricional; **(B)** Heterocromatina, a cromatina está mais condensada, ocorre uma diminuição da transcrição gênica (Adaptado de Gonzalo, 2010).

As histonas possuem substratos para diversos tipos distintos de modificações pós traducionais, como por exemplo, acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação e ADP-poli-ribosilação, sendo que a maioria destas ocorre nas caudas N-terminais destas proteínas (Fig.3) Uma vez que as histonas são modificadas, estas exercem funções regulatórias em diversos eventos genéticos, com a ativação ou silenciamento transcricional (Verdone *et al.*, 2006; Gonzalo, 2010; Reuter *et al.*, 2011).

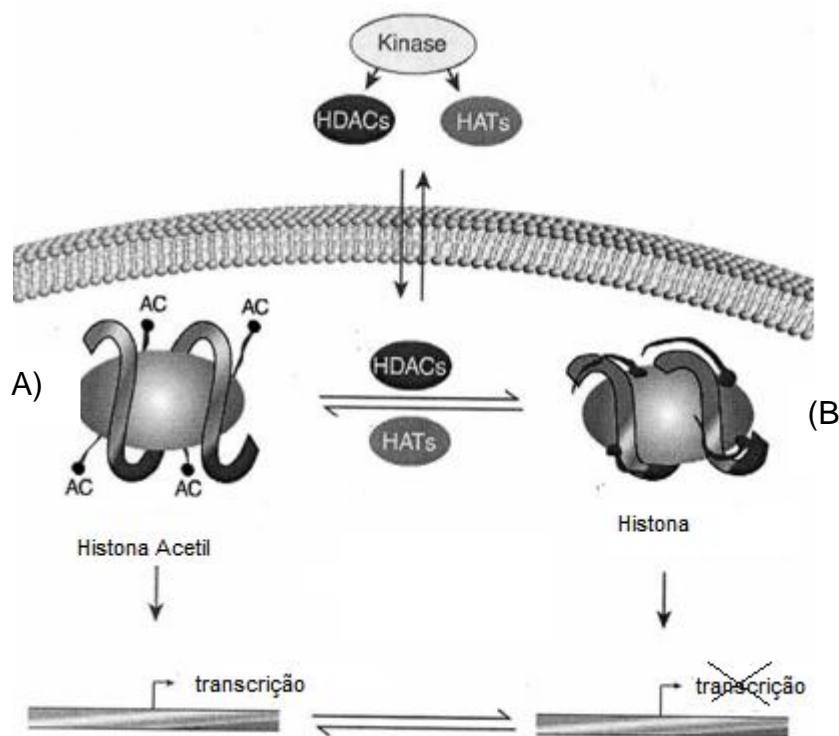


**Figura 3.** Diagrama do nucleossomo formado por octâmero de histonas envolto de dupla fita de DNA. As caudas N-terminais das histonas mostram uma variedade de modificações pós-translacionais (Adaptado de Gonzalo, 2010).

#### 2.2.4 Acetilação de histonas

A acetilação de histonas ocorre principalmente nas caudas N-terminais e está associada com a atividade da transcrição gênica, sendo reguladas por dois grupos de enzimas, as histonas acetiltransferases (HAT) e as histonas desacetilases (HDAC) (Strahl & Allis, 2000).

As HATs são responsáveis por promover a acetilação das histonas, ou seja, remove um grupo acetil da acetil-coenzima A, adicionando-o nos resíduos de lisina. Isto resulta no relaxamento da cromatina, deixando sua estrutura “aberta”, facilitando o processo de transcrição e conseqüentemente a expressão gênica. Por outro lado, as HDACs removem o grupo acetil da histona, tornando a estrutura da cromatina mais compacta (Strahl & Allis, 2000), atenuando o processo de transcrição e contribuindo para o silenciamento gênico. Desta forma, o sistema HAT-HDAC é importante na regulação do processo de transcrição gênica (Fig. 4)



**Figura 4. (A)** Acetilação de histonas demonstrando a ação das enzimas histonas acetiltransferases (HAT), permitindo maior acessibilidade para o processo de transcrição gênica; **(B)** Desacetilação de histonas pela ação das histonas desacetilases (HDAC), ocasionado uma maior compactação da cromatina e com isso levando a uma diminuição da transcrição gênica (Adaptado de <http://www.dom.pitt.edu/paccm/faculty/zhou.html>).

Estudos têm demonstrado que o equilíbrio entre as enzimas HAT e HDAC está intimamente ligado à homeostase celular (Tauton *et al.*, 1996), sendo também considerado um pré-requisito para a sobrevivência neuronal em condições normais (Boutillier *et al.*, 2003).

Evidências demonstraram que o desequilíbrio do balanço HAT/HDAC, parece influenciar no processo de envelhecimento, morte celular, câncer e no surgimento de doenças neurodegenerativas (Kazantsev & Thompson, 2008; Willis-Martinez *et al.*, 2010). Um decréscimo nos níveis de acetilação das histonas pode ser causado tanto pelo aumento na atividade da HDAC, quanto pela diminuição na atividade da HAT (Jiang *et al.*, 2003).

Em humanos e camundongos, são descritas 18 enzimas com atividade desacetiladora de histonas, agrupadas em 4 classes. As classes de HDAC (classe I,

II e IV) são dependentes de  $Zn^{2+}$ , enquanto que a classe III, conhecida como sirtuínas, possuem o seu mecanismo dependente de  $NAD^+$  (Shakespear *et al.*, 2011).

### 2.3 Envelhecimento e mecanismos epigenéticos

O aumento da atividade da HDAC parece ser um mecanismo epigenético que está relacionado ao envelhecimento. Estudos correlacionam o envelhecimento com modificações na expressão gênica em diferentes regiões do cérebro (Gonzalo, 2010; Zeng *et al.*, 2011).

Zeng e colaboradores (2011) demonstraram em hipocampos de ratos, que o processo de envelhecimento parece resultar numa redução da acetilação de histonas H3 e H4 na região promotora do gene fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Interessante destacar que o BDNF possui um papel fundamental na diferenciação e sobrevivência neuronal (Gomez-Pinilla, 1998; Neeper *et al.*, 1996; Gomez-Pinilla, 2011). Estes resultados mostram que o envelhecimento parece ter relação com a acetilação de histonas levando a uma diminuição da expressão do gene BDNF. Além disso, Walker *et al.* (2012) observaram uma diminuição da acetilação global da histona H3, em cultura de neurônios hipocámpais de camundongos senescentes.

Ainda neste contexto, em um estudo com modelo animal para doença de Alzheimer foi evidenciado um declínio global das histonas H3 e H4 nos hipocampos desses animais, sendo este resultado associado a um déficit da memória espacial (Ricobaraza *et al.*, 2009).

Considerando o papel da desacetilação de histonas no processo de envelhecimento, em especial em doenças neurodegenerativas, tem sido sugerido o uso de estratégias que aumentem a acetilação com finalidade neuroprotetora como, por exemplo, o uso de inibidores de HDAC.

Há relatos que inibidores da HDAC melhoram o desempenho da memória (Lubin *et al.*, 2008) e são capazes de reverter déficits de memória (Korzus *et al.*, 2004). Estudos mostram que o tratamento com inibidores de HDAC apresentaram efeito neuroprotetor em modelos animais de isquemia (Gardian *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007) e são capazes de reverter a apoptose neuronal induzida pelo estresse

oxidativo, associado ao envelhecimento e doenças neurodegenerativas (Ryu *et al.*, 2003). Ainda neste contexto, Kilgore e colaboradores (2010) observaram, em modelo animal da Doença de Alzheimer, que após duas semanas de administração com o valproato de sódio, butirato de sódio e ácido hidroxâmico suberoilânida, inibidores clássicos da HDAC, houve uma redução especificamente da classe I das enzimas desacetilases (HDAC 1, 2, 3, 8) em hipocampus, sugerindo que esta redução pode estar associada a uma melhora das funções cognitivas.

Além disso, inibidores da HDAC revertem o prejuízo de memória em camundongos com menor atividade da HAT (Alarcón *et al.*, 2004; McQuown *et al.*, 2011). Interessante destacar também que esses inibidores são capazes de reverter o efeito do envelhecimento em paradigmas de aprendizado e memória, como demonstrados por Reolon e colaboradores (2011) que evidenciaram uma melhora na formação da memória de reconhecimento de objetos em ratos idosos, quando tratados com butirato de sódio.

Estes dados abrem um leque interessante de estudo sobre os mecanismos epigenéticos como alternativas terapêuticas para reversão de déficits associados ao envelhecimento.

## **2.4 Curcumina e mecanismos epigenéticos**

A curcumina é um composto polifenólico encontrado em maior concentração na planta *Curcuma longa* (Bharat *et al.*, 2008; Begum *et al.*, 2008).

Os estudos da ação da curcumina *in vivo* sobre os mecanismos epigenéticos são raros. Contudo estudos que utilizam diferentes linhagens celulares levantam evidências de que este composto pode induzir alterações epigenéticas. A curcumina parece inibir a atividade da HAT e induzir um estado de hipoacetilação de histonas em cultura de linhagem celular de hepatoma humano (Kang *et al.*, 2005). Além disso, esse composto reduziu a atividade de HDAC em cultura de meduloblastoma (Lee *et al.*, 2011) e em cultura celular de linfoma humano induziu uma inibição específica da classe I da HDAC (HDAC 1, HDAC 3 e HDAC 8) e um aumento da acetilação da histona H4 (Liu *et al.*, 2005).

Interessante descrever que, em cultura celular de câncer de próstata, a curcumina induz uma inibição da atividade total da HDAC, porém foi observado que apenas a HDAC 3 teve uma diminuição na sua expressão, enquanto que as HDACs 1, 4, 5, e 8 tiveram sua expressão aumentada (Shu *et al.*, 2011).

Estudos com cultura celular sugerem que esse composto é capaz de alterar vários mecanismos epigenéticos, contudo a ação do extrato bruto da *Curcuma longa* e dos demais curcuminóides ainda não foram elucidados.

## 2.5 Caracterização da *Curcuma longa*

A morfologia desta espécie é caracterizada por ramificações laterais compridas (Fig.5A), a raiz (rizoma) possui uma coloração esbranquiçada ou acinzentada externamente e amarelada internamente. Seu rizoma (Fig.5B) pode medir até 10 cm de comprimento e quando cortado possui um odor agradável. É a partir da sua raiz que se obtém o pó de cor amarela, utilizado na culinária (Pereira & Moreira, 2009).



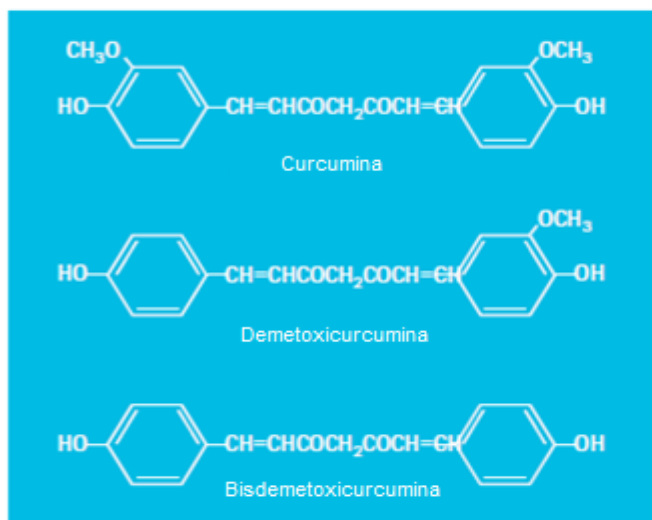
**Figura 5 (A)** Espécie *Curcuma longa*. **(B)** Rizomas da espécie *Curcuma longa*. (Adaptado de Pereira & Moreira, 2009)

Estudos têm demonstrado que a *Curcuma longa* tem sido utilizada no tratamento de distúrbios gastrointestinais, no alívio de dores artríticas, função hepática e processos inflamatórios (Ng *et al.*, 2006; Pereira & Moreira, 2009; Thorne, 2002; Jurenka, 2009). É considerada uma especiaria de pigmentação amarela, amplamente utilizada, como por exemplo, o “curry” e em diferentes tipos de molhos (Ringman *et al.*, 2005; Hamaguchi *et al.*, 2010).

A espécie possui na sua constituição três compostos polifenólicos majoritários (Fig.6), a curcumina (aproximadamente 70-80%), a demetoxicurcumina (aproximadamente 15-25%) e a bisdemetoxicurcumina (aproximadamente 3-7%), além de outros compostos polifenólicos em menor concentração, como 4''-(3'''-metoxi-4'''-hidroxifenil)-2''-oxo-3'''- n-butanil 3-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil) propenoato (Calebin-A), 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4,6-heptatrieno-3-ona, 1-hidroxi-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-6-hepteno-3,5-diona, 1,7-bis(4-hidroxifenil)-1-hepteno-3,5-diona, 1,7-bis(4-hidroxifenil)-1,4,6-heptatrieno-3-ona e 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadieno-3-ona (Park *et al.*, 2002) associado a estes compostos estão ainda óleos voláteis (tumerona, atlantona e zingiberona), açúcares, proteínas e resinas (Jurenka, 2009; Hamaguchi *et al.*, 2010). Assim, a curcumina representa de 0,3 a 5,4% da matéria bruta da *Curcuma longa* (Leung, 1980).

Possui alta atividade antioxidante que está relacionada ao número de grupos hidroxilas na estrutura do seu anel aromático (Rossi *et al.*, 2008; Hamaguchi *et al.*, 2010). Importante destacar que, este composto foi primeiramente isolado, em 1815, por Vogel e Pelletier e teve sua estrutura química determinada em 1910 por Lampe e Milobedeska. É interessante descrever que a curcumina foi testada pela primeira vez em 1937 no tratamento de doenças biliares (67 pacientes tratados). Em 1949, passou a ser utilizada como agente antimicrobiano e em 1972 se observou sua propriedade hipoglicemiante (Bharat *et al.*, 2008).





**Figura 6.** Estrutura química dos três compostos polifenólicos encontrados na planta *Curcuma longa* (Adaptado de Jurenka, 2009).

### 2.5.1 Efeito protetor da *Curcuma longa*

Um estudo epidemiológico realizado em 2006 demonstrou que o consumo de “curry”, uma especiaria rica em açafrão, quando utilizado regularmente pode melhorar o desempenho cognitivo em idosos (Ng *et al.*, 2006).

A curcumina possui múltiplas características relevantes que podem justificar o interesse nesta espécie como alternativa neuroprotetora, incluindo as atividades antioxidante, antiinflamatória e antiproliferativa (Cole *et al.*, 2007; Aggarwal *et al.*, 2008; Begum *et al.*, 2008). Além de que como citado acima modula mecanismos epigenéticos em modelos de cultura celular (Kang *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2011). É interessante destacar que o composto é altamente lipofílico, conferindo a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Rossi *et al.*, 2008).

Cabe descrever que, a administração crônica de curcumina reverteu a redução dos níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) induzida pelo estresse crônico em animais de experimentação (Xu *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que a suplementação com esse composto é capaz de prolongar a vida de *Drosophilas* em até 25,8%, reduzindo o estresse oxidativo (Shen *et al.*, 2012).

Neste contexto, em roedores, a curcumina diminuiu o estresse oxidativo, desagregando as fibras  $\beta$  amilóides e prevenindo a formação de oligômeros fibrilares, características relacionadas com a doença de Alzheimer (Lim *et al.*, 2001). Em relação à ação antiinflamatória da curcumina, foi demonstrado que houve uma redução de citocinas pró-inflamatórias em cultura celular de disco intervertebral humano (Klawitter *et al.*, 2012). Além disso, esse composto protegeu funcionalmente e alterou parâmetros bioquímicos, especificamente níveis de peroxidação lipídica em modelo de dano induzido pela colchicina (Khurana *et al.*, 2012) e reverteu o aumento das atividades das nucleotidasas em córtex de ratos induzidos pela inalação de fumaça de cigarro (Jaques *et al.*, 2011).

Recentemente, Sarvalkar *et al.* (2011) realizaram estudo a fim de investigar os efeitos da administração da curcumina em ratos sobre os níveis de peroxidação lipídica e estresse oxidativo em glândula salivar. Estes pesquisadores observaram que a curcumina (30mg/Kg) reduziu significativamente os níveis de malondialdeído, produto final da peroxidação lipídica, e de grânulos de lipofuscina, pigmento celular considerado um índice de senescência celular. Quitschke (2012) observou em cultura celular de carcinoma embrionário (células NT2/D1) que a incubação com os curcuminóides, curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina, induziu uma redução da proliferação celular, de parâmetros de senescência e de morte celular. Ainda neste contexto, estudo realizado em modelo animal de Doença de Parkinson foi verificado que os curcuminóides apresentaram ação neuroprotetora, aumentando os níveis de enzimas antioxidantes, como por exemplo, a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase. Além disso, observou-se um aumento nos níveis dopaminérgicos em núcleo estriado dos animais tratados quando comparados ao grupo sem tratamento (Agrawal *et al.*, 2012).

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito do envelhecimento e do tratamento agudo com *Curcuma longa* sobre mecanismos epigenéticos em estruturas cerebrais de ratos Wistar.

#### 3.2 Objetivos específicos

- I) Avaliar a atividade da enzima HDAC em hipocampo e córtex frontal de ratos Wistar com 3 meses e 18 meses de idade;
- II) Avaliar a atividade da enzima HDAC em hipocampo e córtex frontal de ratos Wistar com 3 meses e 18 meses de idade após a administração aguda de *Curcuma longa*;
- III) Avaliar a atividade da enzima HDAC em hipocampo e córtex frontal de ratos em diferentes tempos após a administração de *Curcuma longa*.

#### 4. Referências Bibliográficas da Revisão

Aggarwal, B.B.; Harikumar, K.B. (2008) Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. Int. J. Biochem.Cell Biol. 41, 40–59

Agrawal, S., S.; Gullaiya, S.; Dubey,V.;Singh,V.;Kumar,A.;Nagar,A.;Tiwari,P.(2012) Neurodegenerative shielding by curcumin and its derivates on brain lesions induced by 6-OHDA model of Parkinson's disease in albino Wistar rats. Cardiovascular psychiatry and neurology, ID 942981.

Alarcon, J. M., G. Malleret, et al. (2004). "Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration." Neuron 42(6): 947-959.

Aprahamian,I.; Martinelli, J. E.; Yassuda, M., S. (2009) Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico.Rev Bras Clin Med ;7:27-35

Barja, G., S. Cadenas, et al. (1994). "Low Mitochondrial Free-Radical Production Per Unit O-2 Consumption Can Explain the Simultaneous Presence of High Longevity and High Aerobic Metabolic-Rate in Birds." Free Radical Research 21(5): 317-327.

Barone, E., F. Di Domenico, et al. (2012). "Heme oxygenase-1 posttranslational modifications in the brain of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment." Free Radic Biol Med 52(11-12): 2292-2301.

Bellet, M. M. and P. Sassone-Corsi (2010). "Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link." J Cell Sci 123(Pt 22): 3837-3848.

Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." Physiol Rev 78(2): 547-581.

Begum, A. N., M. R. Jones, et al. (2008). "Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease." J Pharmacol Exp Ther 326(1): 196-208.

Bharat B.; Aggarwal AND Bokyoung Sung. (2008) Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. Cell Press.

Bickford, P. C., T. Gould, et al. (2000). "Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats." Brain Res 866(1-2): 211-217.

Boutillier, A. L., E. Trinh, et al. (2003). "Selective E2F-dependent gene transcription is controlled by histone deacetylase activity during neuronal apoptosis." J Neurochem 84(4): 814-828.

Carney, J. M., P. E. Starke-Reed, et al. (1991). "Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron." Proc Natl Acad Sci U S A 88(9): 3633-3636.

Cole, G. M., B. Teter, et al. (2007). "Neuroprotective effects of curcumin." Adv Exp Med Biol 595: 197-212.

Driscoll, I., B. Martin, et al. (2012). "Plasma BDNF is associated with age-related white matter atrophy but not with cognitive function in older, non-demented adults." PLoS One 7(4): e35217.

Elisabetsky, E. and P. Shanley (1994). "Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon." Pharmacol Ther 64(2): 201-214.

Elsner V. R., Lovatell G. A., Bertoldi K., Vanzella C., Santos F. M., Spindler C., Almeida E. F. de, Nardin P., Siqueira I. R. (2011) Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. Neuroscience 192, 580–587.

Erickson, K. I., R. S. Prakash, et al. (2010). "Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume." J Neurosci 30(15): 5368-5375.

Foley, D. L., J. M. Craig, et al. (2009). "Prospects for epigenetic epidemiology." Am J Epidemiol 169(4): 389-400.

Fontán-Lozano, A., R. Romero-Granados, et al. (2008). "Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice." Mol Cell Neurosci 39(2): 193-201.

Forlenza, O.(2005) Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. Revista de Psiquiatria Clínica n 32, p. 137-148.

Floyd, R. A., M. West, et al. (2001). "Oxidative biochemical markers; clues to understanding aging in long-lived species." Exp Gerontol 36(4-6): 619-640.

Gardian, G., S. E. Browne, et al. (2005). "Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease." J Biol Chem 280(1): 556-563.

Gomez-Pinilla, F. (2011). "Collaborative effects of diet and exercise on cognitive enhancement." Nutr Health 20(3-4): 165-169.

Gomez-Pinilla, F., V. So, et al. (1998). "Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise." Neuroscience 85(1): 53-61.

Gonzalo, S. (2010). "Epigenetic alterations in aging." J Appl Physiol 109(2): 586-597.

Hamaguchi, T., K. Ono, et al. (2010). "REVIEW: Curcumin and Alzheimer's disease." CNS Neurosci Ther 16(5): 285-297.

Handel, A. E., G. C. Ebers, et al. (2010). "Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease." Trends Mol Med 16(1): 7-16.

Hardy, T. M. and T. O. Tollefsbol (2011). "Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer." Epigenomics 3(4): 503-518.

Howitz, K. T., K. J. Bitterman, et al. (2003). "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan." Nature 425(6954): 191-196.

Huang, H. C., P. Chang, et al. (2012). "Protective effects of curcumin on amyloid beta-induced neuronal oxidative damage." Neurochem Res 37(7): 1584-1597.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2008). População brasileira envelhece em ritmo acelerado. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php)

Jaques, J. A., J. F. Rezer, et al. (2011). "The effect of curcumin in the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats." Cell Biochem Funct 29(8): 703-707.

Jiang, H., F. C. Nucifora, Jr., et al. (2003). "Cell death triggered by polyglutamine-expanded huntingtin in a neuronal cell line is associated with degradation of CREB-binding protein." Hum Mol Genet 12(1): 1-12.

Jurenka, J. S. (2009). "Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research." Altern Med Rev 14(2): 141-153.

Kang, J., J. Chen, et al. (2005). "Curcumin-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species." Biochem Pharmacol 69(8): 1205-1213.

Kazantsev, A. G. and L. M. Thompson (2008). "Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders." Nat Rev Drug Discov 7(10): 854-868.

Khurana S, Jain S, Mediratta P.K, Banerjee B.D, Sharma K.K. Protective role of curcumin on colchicine-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in rats. Hum. Exp. Toxicol., 2012.

Klawitter, M., L. Quero, et al. (2012). "Curcuma DMSO extracts and curcumin exhibit an anti-inflammatory and anti-catabolic effect on human intervertebral disc cells, possibly by influencing TLR2 expression and JNK activity." J Inflamm (Lond) 9(1): 29.

Kilgore, M., C. A. Miller, et al. (2010). "Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." Neuropsychopharmacology 35(4): 870-880.

Kim, H. J., M. Rowe, et al. (2007). "Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action." J Pharmacol Exp Ther 321(3): 892-901.

Kim, D. S., J. Y. Kim, et al. (2012). "Curcuminoids in neurodegenerative diseases." Recent Pat CNS Drug Discov 7(3): 184-204.

Kirkinezos, I. G., S. R. Bacman, et al. (2005). "Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice." J Neurosci 25(1): 164-172.

Korzus, E., M. G. Rosenfeld, et al. (2004). "CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation." Neuron 42(6): 961-972.



Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell 128(4): 693-705.

Kumar, G. P. and F. Khanum (2012). "Neuroprotective potential of phytochemicals." Pharmacogn Rev 6(12): 81-90.

Lee, W. J., J. Y. Shim, et al. (2005). "Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids." Mol Pharmacol 68(4): 1018-1030.

Lee, S. J., C. Krauthauser, et al. (2011). "Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo." BMC Cancer 11: 144.

Leung A. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics. (1980) New York, NY: John Wiley: 313-314.

Lim, G. P., T. Chu, et al. (2001). "The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse." J Neurosci 21(21): 8370-8377.

Liu, H. L., Y. Chen, et al. (2005). "Curcumin, a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation." Acta Pharmacol Sin 26(5): 603-609.

Lubin, F. D., T. L. Roth, et al. (2008). "Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory." J Neurosci 28(42): 10576-10586.

Lund, A. H. and M. van Lohuizen (2004). "Epigenetics and cancer." Genes Dev 18(19): 2315-2335.

Lynch, G., C. S. Rex, et al. (2006). "Synaptic plasticity in early aging." Ageing Res Rev 5(3): 255-280.

Mastroeni, D., A. Grover, et al. (2011). "Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging 32(7): 1161-1180.

McQuown, S. C., R. M. Barrett, et al. (2011). "HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation." J Neurosci 31(2): 764-774.

Menard, C. and R. Quirion (2012). "Group 1 metabotropic glutamate receptor function and its regulation of learning and memory in the aging brain." Front Pharmacol 3: 182.

Mielcarek, M., C. L. Benn, et al. (2011). "SAHA decreases HDAC 2 and 4 levels in vivo and improves molecular phenotypes in the R6/2 mouse model of Huntington's disease." PLoS One 6(11): e27746.

Neeper, S. A., F. Gomez-Pinilla, et al. (1996). "Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain." Brain Res 726(1-2): 49-56.

Ng, T. P., P. C. Chiam, et al. (2006). "Curry consumption and cognitive function in the elderly." Am J Epidemiol 164(9): 898-906.

Park, S. Y. and D. S. Kim (2002). "Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease." J Nat Prod 65(9): 1227-1231.

Pereira, R. C. A. Moreira, M. da R. (2009) Cultivo de *Curcuma longa* L. (Açafrão-da-Índia ou Cúrcuma). Comunicado técnico ISSN 1679-6535.

Quitschke, W. W. (2012). "Curcuminoid binding to embryonal carcinoma cells: reductive metabolism, induction of apoptosis, senescence, and inhibition of cell proliferation." PLoS One 7(6): e39568.

Reolon, G. K., N. Maurmann, et al. (2011). "Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats." Behav Brain Res 221(1): 329-332.

Reuter, S., S. C. Gupta, et al. (2011). "Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds." Genes Nutr 6(2): 93-108. Ricobaraza, A., M. Cuadrado-Tejedor, et al. (2009). "Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model." Neuropsychopharmacology 34(7): 1721-1732.

Ringman, J. M., S. A. Frautschy, et al. (2005). "A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res 2(2): 131-136.

Rinwa, P. and A. Kumar (2012). "Piperine potentiates the protective effects of curcumin against chronic unpredictable stress-induced cognitive impairment and oxidative damage in mice." Brain Res. [Epub ahead of print]

Rodriguez-Rodero, S., J. L. Fernandez-Morera, et al. (2011). "Aging genetics and aging." Aging Dis 2(3): 186-195.

Rodenhiser D, Mann M.(2006).Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. CMAJ.Jan 31;174(3):341-8.

Rossi, L., S. Mazzitelli, et al. (2008). "Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease." Neurochem Res 33(12): 2390-2400.

Rouaux, C., J. P. Loeffler, et al. (2004). "Targeting CREB-binding protein (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders." Biochem Pharmacol 68(6): 1157-1164.

Ryu, H., J. Lee, et al. (2003). "Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 100(7): 4281-4286.

Saha, R. N. and K. Pahan (2006). "HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis." Cell Death Differ 13(4): 539-550.

Sarvalkar P. P.; Walvekar M. V.; Bhopale L. P.Antioxidative effect of curcumin (*Curcuma longa*) on lipid peroxidation and lipofuscinogenesis in submandibular gland of D-galactose- induced aging male mice. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(20), pp. 5191-5193, 30 September, 2011.

Shakespear, M. R., M. A. Halili, et al. (2011). "Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity." Trends Immunol 32(7): 335-343.

Sharma, VK (2003), Adaptive significance of circadian clocks. Chronobiol Int 20:901-919.

Shen, L. R., F. Xiao, et al. (2012). "Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila*." Age (Dordr).

Shinomol, G. K., Muralidhara, et al. (2011). "Exploring the role of "Brahmi" (*Bocopa monnieri* and *Centella asiatica*) in brain function and therapy." Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov 5(1): 33-49.

Shiv,I.;Grewal,S.;Jia,S. (2007) Heterochromatin revisited. Nature Reviews Genetics, vol.8.

Shoba, G., D. Joy, et al. (1998). "Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers." Planta Med 64(4): 353-356.

Shu, L., T. O. Khor, et al. (2011). "Epigenetic CpG demethylation of the promoter and reactivation of the expression of *Neurog1* by curcumin in prostate LNCaP cells." AAPS J 13(4): 606-614.

Siqueira, I. R., C. Fochesatto, et al. (2005). "Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain." Int J Dev Neurosci 23(8): 663-671.

Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature 403(6765): 41-45.

Sweatt,J. D. (2010). "Epigenetics and Cognitive Aging." Science, v.328.

Tauton J, Hassig CA, Schreiber SL (1996), A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. Science 272:408-411.

Thorne Research, inc. *Curcuma longa*. Alternative Medicine Review, 2002.

Tuder, R. M., J. A. Kern, et al. (2012). "Senescence in chronic obstructive pulmonary disease." Proc Am Thorac Soc 9(2): 62-63.

Vanamala, J., A. C. Kester, et al. (2012). "Mitigation of obesity-promoted diseases by *Nigella sativa* and thymoquinone." Plant Foods Hum Nutr 67(2): 111-119.

Verdone, L., E. Agricola, et al. (2006). "Histone acetylation in gene regulation." Brief Funct Genomic Proteomic 5(3): 209-221.

Viegas, C. Jr., Bolzani, V. S., Furlan, M. (2004) Produtos naturais como úteis no tratamento do mal de Alzheimer. Quimica Nova. n 4, p. 655-660.

Villeponteau, B., R. Cockrell, et al. (2000). "Nutraceutical interventions may delay aging and the age-related diseases." Exp Gerontol 35(9-10): 1405-1417.

Xu, Y., Ku, B., Yao, I., T., Jiang, W., Ma, X., Li, X. (2006) Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. Brain Research, p.56-64.

Zeng, Y., M. Tan, et al. (2011). "Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging." J Neurosci 31(49): 17800-17810.

Walker, M. P., F. M. Laferla, et al. (2012). "Reversible epigenetic histone modifications and Bdnf expression in neurons with aging and from a mouse model of Alzheimer's disease." Age (Dordr).

Willis-Martinez, D., H. W. Richards, et al. (2010). "Role of HDAC1 in senescence, aging, and cancer." Exp Gerontol 45(4): 279-285.

Willis, L. M., B. Shukitt-Hale, et al. (2009). "Modulation of cognition and behavior in aged animals: role for antioxidant- and essential fatty acid-rich plant foods." Am J Clin Nutr 89(5): 1602S-1606S.

## **5. Artigo em Inglês**



**Histone deacetylase activity is altered in brain areas from aged rat: effect of acute administration of *Curcuma longa* extract**

Gabriela dos Santos Sant' Anna<sup>d</sup>, Viviane Rostirola Elsner<sup>b</sup>, Felipe Moysés<sup>b</sup>, Gisele Agustini Lovatel<sup>c</sup>, Claudia Vanzella<sup>a</sup>, Laura Reck Cechinel<sup>a</sup>, Gilsane Lino von Poser<sup>e</sup>, Ionara Rodrigues Siqueira<sup>\*a,b,c,d</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacologia, <sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, <sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, <sup>d</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas; <sup>e</sup>Departamento de Produção de Matéria Prima, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

\* Tel/Fax: + 55 51 3308 3121; E-mail: ionara@ufrgs.br (I. Siqueira)

## ABSTRACT

It has been suggesting a relationship between the aging-related memory impairment and altered histone acetylation levels. Besides, environmental factors, including dietary compounds, seem to modulate histone acetylation status. Curcumin, a polyphenolic compound, found in rhizomes of *Curcuma longa* (known as turmeric), has been recognized as an epigenetic modulator through its inhibitory activity against histone deacetylases (HDAC), histone acetyltransferases (HAT) and DNA methyltransferase (DNMT) in several *in vitro* cancer models. Despite a remarkable interest on nutraceutical components in functional food, studies reporting the effect of oral administration of *Curcuma longa* on HDAC activity in any brain region during aging process are lack. Our aim was to evaluate the effect of the aging process and the acute treatment of *Curcuma longa* extract on HDAC activity in the hippocampus and frontal cortex from Wistar rats. The animals were treated with saline, solvent (DMSO 20%) or extract of *Curcuma longa* (10 and 50 mg/kg) by gavage, and killed by decapitation 2 h and 18 h after the administration. The aging process augmented HDAC activity in hippocampus and frontal cortex, while no effect of *Curcuma longa* treatment on HDAC activity was observed in both young and aged groups. Together, these data support the hypothesis that aging-related dysfunction may be related, at least in part, to acetylation levels through modulation of HDAC activity. In addition, the acute administration with *Curcuma longa* extract it is not able to alter the HDAC activity in both tested brain areas.

**Keywords:** aging process; *Curcuma longa*; rats; hippocampus; frontal cortex; HDAC activity.

## INTRODUCTION

Aging is a complex biological process characterized by a gradual decline of cognitive functions and deterioration of synaptic functions in specific regions of the brain, such as hippocampus and prefrontal cortex (Korzus et al. 2004; Lynch et al. 2006; Saha & Pahan, 2006; Lubin et al. 2008; Zeng et al. 2011). Recently, aging-related memory decline have been linked to lower histone acetylation levels (Levenson et al. 2008; Peleg et al. 2010).

Histone acetylation is the most extensively studied epigenetic mechanism and has been widely associated with enhanced transcriptional activity through accessibility of the gene to the transcriptional machinery (Kimura et al. 2005; Choi and Howe 2009), whereas deacetylation is typically associated with transcriptional repression (Kouzarides 2007). Histone tail acetylation is a dynamic process, where histone acetyltransferases are responsible for the addition of acetyl groups to the lysine residues from amino-terminal tails of histones, and histone deacetylases remove these acetyl groups (Choi and Howe 2009; Kouzarides 2007). It is interesting to describe that the DNA is wrapped around a complex of histones, namely H1 (or H5), H2A, H2B, H3 and H4 (Kouzarides 2007).

Previous works have shown that histone acetylation seems exert a pivotal role in memory formation (Levenson et al. 2008). Memory formation has been associated with increased acetylation of H3 and H4 lysine residues (Barrett and Wood 2008; Mikaelsson and Miller 2011). Interestingly, some evidences have been suggesting a link between the aging-related memory impairment and altered histone acetylation levels. It is important to cite that these studies have focused on aversive and spatial memory paradigms and long term potentiation (LTP), a model for memory at the

cellular/synaptic level (Lovatell et al. 2012; Peleg et al. 2010, Zeng et al. 2011) in aging rodents. Recently, we demonstrated that hippocampi from aged rats have lower H4 acetylation levels and that there is a positive correlation with aversive memory performance (Lovatell et al. 2013, submitted). Indeed, a decreased histone acetylation was observed in several cellular and *in vivo* neurodegeneration models (Rouaux et al. 2004; Saha and Pahan 2006; Sleiman et al. 2009). Despite these findings, studies reporting the impact of aging process on histone deacetylases activity in rat brain during normal aging process are rare.

It has been suggested that environmental factors, including dietary compounds, may prevent diseases through the modulation of histone acetylation and deacetylation (Canani et al. 2012). In this context, there is a growing interest in dietary histone deacetylase inhibitors. For example, sodium butyrate, a known histone deacetylase inhibitor, can be formed by comensal bacteria involved in the fermentation of dietary fibers (Canani et al. 2012). Indeed, different dietary botanicals can play a role in the regulation of epigenetic mechanism. Sulforaphane, rich in cruciferous vegetables, such as broccoli, kale and cabbage, is able to inhibit histone deacetylase enzyme, leading to an increase in the global and local histone acetylation status, what has been linked to chemoprevention properties (for review Meeran et al. 2010).

Curcumin, a major curcuminoid compound in the yellow curry spice, is found in rhizomes of *Curcuma longa* (known as turmeric), has been recognized as an epigenetic agent through its interaction with histone deacetylases, histone acetyltransferases, DNA methyltransferase I, and microRNAs (Fu and Kurzrock 2010). The strong inhibitory activity against HDAC and HAT has been widely described in several *in vitro* cancer models (Kang et al. 2005; Lee et al. 2011). Despite a body of evidences indicates that curcumin may have neuroprotective

properties, especially in Alzheimer's disease models (Frautschy et al. 2001), to our knowledge, there are few studies describing the effect of this compound on HDAC activity in any brain region.

Although there was a remarkable interest on the health regulatory properties of nutraceutical components in functional food, studies reporting the effect of oral administration of *Curcuma longa* during aging process are lack. *Curcuma longa* has a mixture of several compounds including other curcuminoids, polyphenol compounds, such as demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin, that seems have several biological activities. Interestingly, non-demented elderly Asian subjects aged 60–93 years who consumed curry “occasionally” and “often or very often” had significantly better MMSE Mini-Mental State Examination (MMSE) scores those subjects that “never or rarely” consumed curry (Ng et al. 2006).

Therefore, the aims of this work were to investigate (1) the effect of aging process on histone deacetylase activity in the hippocampus and frontal cortex from Wistar rats and (2) the effect of acute treatment of *Curcuma longa* extract on this parameter.

## **1. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Animals**

Male Wistar rats of different ages, 3 and 18-months-old were used. The animals were maintained under standard conditions (12-h light/ dark, 22±2 °C) with food and water *ad libitum* and housed five per cage. The NIH “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication No. 80-23, revised 1996) was followed in all

experiments. The Local Ethics Committee (CEUA de Ética em Pesquisa - UFRGS) approved all handling and experimental conditions (nr. 22062).

## **2.2 Preparation of the Ethanol Extract**

One hundred grams of rhizome powder (SantosFlora lot number ACAFP01/0608) was soaked in 1000 mL of ethanol (99.5%) for 3 days in room temperature. After, the solvent was filtered and dried under vacuum, resulting in the ethanol extract (EE). For the treatments, EE was dissolved in 20% of dimethyl sulfoxide (DMSO). The animals were treated with saline, solvent (DMSO 20%) or EE of *Curcuma longa* (10 and 50 mg/kg) by gavage (1ml/Kg) (Pyrzanowska et al., 2010).

## **2.3 Preparation of samples**

Rats were killed by decapitation 2 h and 18 h after the extract of *Curcuma longa* administration. The hippocampi and frontal cortices were quickly dissected out and immediately snap-frozen in liquid nitrogen, then stored at -80 °C until the determination of HDAC enzyme activity. On the day of the assay, the samples were homogenized in 1:3 volumes of ice-cold lysis buffer (containing (in mM): 250 sucrose; 20 Tris-HCl; pH 7.4; 1 ethylenediamine tetraacetic acid; 1 ethylene glycol tetraacetic acid; 10 potassium chloride; 1 dithiothreitol; 0.1 phenylmethylsulfonyl fluoride; 0.001 okadaic acid). The lysates were subjected to centrifugation (16,000xg for 5 min) at 4 °C in a microcentrifuge tube, and the supernatant was removed for analysis. The protein concentration of each sample was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

## 2.4 Determination of global HDAC enzyme activity

The effect of acute treatment of *Curcuma longa* extract 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.

## 2.5 Statistical Analysis

The results were analyzed by Three-Way Analysis of Variance (ANOVA) with age, effect of acute treatment of *Curcuma longa* extract on global HDAC activity. *Curcuma longa* administration and time after administration as factors followed by post hoc Tukey's multiple range tests when appropriate. In all tests,  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## 2. RESULTS

Firstly, we evaluated the effect of the aging process on HDAC activity. Three-way ANOVA showed that 18-months-old rats displayed higher HDAC activity compared to the young group in both structures, hippocampus ( $F_{(1, 71)} = 10.430$ ,  $p = 0.002$ ; Fig. 1) and frontal cortex ( $F_{(1, 75)} = 4.438$ ,  $p = 0.039$ ; Fig 2).

Surprisingly, there was no significant effect of *Curcuma longa* treatment on HDAC activity in both young and aged groups. Interestingly, three-way ANOVA indicated effect of time effect after administration of *Curcuma longa* extract on hippocampal HDAC activity ( $F_{(1, 71)} = 4.238$ ,  $p = 0.044$ ; Fig. 1). Additionally, it was observed a significant interaction between age and time of administration factors in frontal cortices, since HDAC activity was higher in the aged group 18 hours after administration compared to the other times ( $F_{(1,75)} = 1.765$ ,  $p = 0.001$ ; Fig. 2).

### 3. DISCUSSION

Our data demonstrate that HAT/HDAC balance is disturbed in favor of HDAC in brain aging process, which can be related to previous studies demonstrating a reduction on acetylation levels in aged rodents (Lovatell et al. 2012; Peleg et al. 2010). Therefore, we can suggest a fundamental role of HDAC activity and the subsequent malfunctioning acetylation apparatus during the normal aging process. Interestingly, we demonstrated that lower H4 acetylation levels in hippocampi from aged rats were correlated with worse aversive memory performance (Lovatell et al. 2012). Taken together, these findings lead us to hypothesize that this epigenetic mechanism can be involved in age-associated memory impairment.

This result supports the data obtained with administration of HDAC inhibitors improving aging-related memory decline in rodents (Peleg et al. 2010; Reolon et al. 2011). Pharmacological inhibitors such as sodium valproate, sodium butyrate, trichostatin and suberoylanilide hydroxamic acid are alternatives which have demonstrated to improve the cognitive functions and the maintenance and regulation of neuronal plasticity (Kilgore et al. 2010; Ricobaraza et al. 2009). HDAC inhibitors



are also able to reverse the neuronal apoptosis (Ryu et al, 2003) and have neuroprotective activity in ischemia model (Gardian et al. 2005).

Consistently, it has been demonstrated that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression, which contributes in memory formation and is involved in neurogenesis and neuronal survival, can be modulated by histone acetylation and seem to be reduced in the aged hippocampus (Zeng et al. 2011; Kohman et al. 2012; Barrientos et al. 2010). In accordance, HDAC activity induces histone deacetylation, which is typically associated with transcriptional repression (Kouzarides 2007). In addition HDAC contributes to form transcriptional co-repressor complexes (Nakao 2001).

It is possible to infer that the H4 histone hypoacetylation and reduced HDAC activity in hippocampi from aged rats would indicate a global acetylation state in cells, which can influence the function of other acetylated substrates (Bannister et al. 2000; Imhof et al. 1997). In this context, Dompierre and colleagues (2007) demonstrated that HDAC inhibition was shown to increase vesicular transport of BDNF via increased acetylation of  $\alpha$ -tubulin. Taken together, we can suppose that our findings obtained in hippocampi from aged rats would be related at least in part to hypoacetylation of non-histones substrates.

The results here described were in agreement with those obtained by Elsner and colleagues (2011), demonstrating the influence of circadian rhythm on HDAC activity. In addition, there was an interaction between age and time of day in frontal cortex, given that the early morning (taken as 18 hours after exercise) has lower activity when compared to the afternoon (2 hours after) in the aged group.

Although pharmacological and non-pharmacological approaches have induced transitory alterations on HDAC activity, the acute administration with *Curcuma longa*

extract did not alter the HDAC activity in both tested brain areas. Recently, it was demonstrated that a single treadmill exercise reduced acutely HDAC activity in rat hippocampus (Elsner et al. 2011). Previous studies have demonstrated a similar pattern where treatments altered these parameters for only a short time. For example, histone acetylation levels were significantly increased 1 hour, but not 24 hours after contextual fear conditioning (Levenson et al. 2004; Chwang et al. 2006). Besides, a single injection of valproic acid induces transitorily a hyperacetylation state (Dowdell et al. 2009).

Moreover, this result may be related to poor bioavailability of curcumin, since an extensive metabolism of the compound in the gastrointestinal wall, glucoronidation in the liver, and enterohepatic circulation have been described (Ringman et al, 2005).

#### **4. CONCLUSIONS**

The present study is the first evidence reporting that healthy aged Wistar rats showed lower HDAC activity in hippocampi and frontal cortices. These data support the hypothesis that aging-related dysfunction may be associated, at least in part, to acetylation levels through modulation of HDAC activity. We also demonstrated that acute administration with *Curcuma longa* did not affect HDAC activity in brain areas. Further studies are needed to clarify the details of the mechanisms by which HDAC activities are altered in aging process.

## 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. Vanzella); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (G.A. Lovatel; F. Moysés); Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC CNPq-UFRGS (L.R. Cechinel).

## References

- Bannister AJ, Miska EA, Görlich D, Kouzarides T (2000) Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol.* 10(8):467-70
- Barrett RM, Wood MA (2008) Beyond transcription factors: The role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn. Mem.* 15:460-467. doi:10.1101/lm.917508
- Barrientos RM, Frank MG, Watkins LR, Maier SF (2010) Memory impairments in healthy aging: role of aging-induced microglial sensitization. *Aging Dis.* 1:212–231
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248–254
- Canani RB, Costanzo MD, Leone L (2012) The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. *Clin Epigen.* doi: 10.1186/1868-7083-4-4
- Choi JK, Howe LJ (2009) Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem Cell Biol.* 87(1):139-50. doi: 10.1139/O08-112

- Chwang WB, O'Riordan KJ, Levenson JM, Sweatt JD (2006) ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem.* 13(3): 322–328. doi: 10.1101/lm.152906
- Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, Saudou F (2007) Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the transport deficit in Huntington's Disease by increasing tubulin acetylation. *JNeurosci.* (13):3571– 3583 - 3571
- Dowdell KC, Pesnicak L, Hoffmann V, Steadman K, Remalev AT, Cohen JI, Straus SE, Rao VK (2009) Valproic Acid (VPA), a Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor, diminishes lymphoproliferation in the Fas Deficient MRL/lpr<sup>-/-</sup> murine model of Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS). *Exp Hematol* 37(4): 487–494
- Elsner VR, Lovatell GA, Bertoldi K, Vanzella C, Santos FM, Spindler C, Almeida EF de, Nardin P, Siqueira IR (2011) Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neurosci.* 192, 580–587
- Frautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME, Cole GM (2001) Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of A $\beta$  induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol Aging.* 22:993-1005
- Fu S, Kurzrock R (2010) Development of curcumin as an epigenetic agent. *Cancer.* 116 (20): 4670-6. doi: 10.1002/cncr.25414
- Gardian G, Browne SE Choi D, Klivenyi P, Gregorio J, Kubilus JK, Ryu H, Langley B, Ratan RR, Ferrante RJ, Beal MF (2005) Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Biol Chem.* 280(1): 556-563

- Imhof A, Yang X, Ogryzko V V, Nakatani Y, Wolffe AP, Ge H (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol.* 7:689–692. <http://biomednet.com/eleceref/0960982200700689>
- Kang J, Chen J, Shi Y, Jia J, Zhang Y (2005) Curcumin-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* 69(8): 1205-1213
- Kilgore, M, Miller CA, Fass DM, Henning KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, Rumbaugh G (2010) Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacol.* 35(4): 870-880
- Kimura A, Matsubara K, Horikoshi MA (2005) Decade of Histone Acetylation: Marking Eukaryotic Chromosomes with Specific Codes. *J Biochem.* 138(6): 647-662. doi: 10.1093/jb/mvi184
- Kohman R A, DeYoung EK, Bhattacharya TK, Peterson LN, Rhodes JS (2012) Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain Behav Immun.* 26(5):803-10. doi: 10.1016/j.bbi.2011.10.006
- Korzus E, Rosenfeld MG et al (2004) CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron.* 42(6): 961-972
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128(4): 693-705
- Lee SJ, Krauthauser C, Maduskuie V, Fawcett PT, Olson JM, Rajasekaran SA (2011) Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo. *BMC Cancer.* 11: 144
- Levenson, RW, Ascher E, Goodkind M, McCarthy M, Sturm V, Werner K. (2008) Laboratory testing of emotion and frontal cortex. In: Goldenberg G, Miller BL (Eds.),

- Handbook of clinical neurology.Vol. 88: Neuropsychology and behavioral neurology .Edinburgh, Scotland: Elsevier, pp. 489 – 498
- Lovatel GA, Bertoldi K, Elsner VR, Vanzella C, Moysés F dos S, Spindler C, Funck VR, Pereira LM, de Oliveira CV, Oliveira MS, Netto CA, Siqueira IR (2012) Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function. *Neurobiol Learn Mem.* 98(2):182-7. doi: 10.1016/j.nlm.2012.06.002
- Lovatel G, Elsner V, Bertoldi K, Vanzella C, Moysés F, Vizquete 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. Submitted to *Neurobiol Learn Mem.* (NLM-12-201)
- Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2008) Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci.* 28(42): 10576-10586
- Lynch G, Rex CS, Gall CM (2006) Synaptic plasticity in early aging. *Ageing Res Rev.* 5(3): 255-280
- Meeran SM, Patel SN, Tollefsbol TO (2010) Sulforaphane Causes Epigenetic Repression of hTERT Expression in Human Breast Cancer Cell Lines. *PLoS ONE.* 5(7): e11457. doi:10.1371/journal.pone.0011457
- Mikaelsson MA, Miller CA (2011) The path to epigenetic treatment of memory disorders. *Neurobiol Learn Mem.* 96(1):13-8. doi:10.1016/j.nlm.2011.02.003
- Nakao, M (2001) Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene.* 278, 25–31. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00721-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00721-1)
- Ng TP, Chiam PC, Lee T, Chua HC, Lim L, Kua EH (2006) Curry consumption and cognitive function in the elderly. *Am J Epidemiol.* 164(9): 898-906
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer

- M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A (2010) Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science*.328 (5979):753-6. doi: 10.1126/science.1186088
- Pyrzanowska J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Lehner M, Skórzewska A, Turzyńska D, Sobolewska A, Plaznik A, Widy-Tyszkiewicz E (2010) The influence of the long-term administration of *Curcuma longa* extract on learning and spatial memory as well as the concentration of brain neurotransmitters and level of plasma corticosterone in aged rats. *Pharmacol, Biochem and Behav.* 95 351–358. doi:10.1016/j.pbb.2010.02.013
- Reolon GK, Maurmann N et al (2011) Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behav Brain Res.* 221(1): 329-332
- Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M et al (2009) Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacol.* 34(7): 1721-1732
- Ringman JM, Frautschy SA, Cole GM, Masterman DL, Cummings JL (2005) A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2(2): 131-136
- 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(6): 1157-1164
- Ryu H, Lee J et al (2003) Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 4281-4286

Saha, RN, Pahan K (2006) HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ.* 13(4): 539-550

Sleiman SF, Basso M, Mahishi L, Kozikowski AP, Donohoe ME, Langley B, Ratan RR (2009) Putting the 'HAT' back on survival signalling: the promises and challenges of HDAC inhibition in the treatment of neurological conditions. *Expert Opin Investig Drugs.* 18:573–584

Zeng Y, Tan M, Kohyama J, Sneddon M, Watson JB, Sun YE , Xie CW (2011) Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. *J Neurosci* 31(49): 17800-17810

### List of legends

Fig.1. Effects of aging process and of acute treatment of *Curcuma longa* extract on global HDAC in hippocampus from Wistar rats. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3-6 animals per group). Three-way ANOVA followed by Tukey's test, # = significantly different from the aged group; \* = significantly different from 18 h after *Curcuma longa* extract treatment.

Fig.2. Effects of aging process and of acute treatment of *Curcuma longa* extract on global HDAC in frontal cortex from Wistar rats. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3-6 animals per group). Three-way ANOVA followed by Tukey's test, # = significantly different from the aged group; \* = significantly different from 18 h after *Curcuma longa* extract treatment.



Figure 1

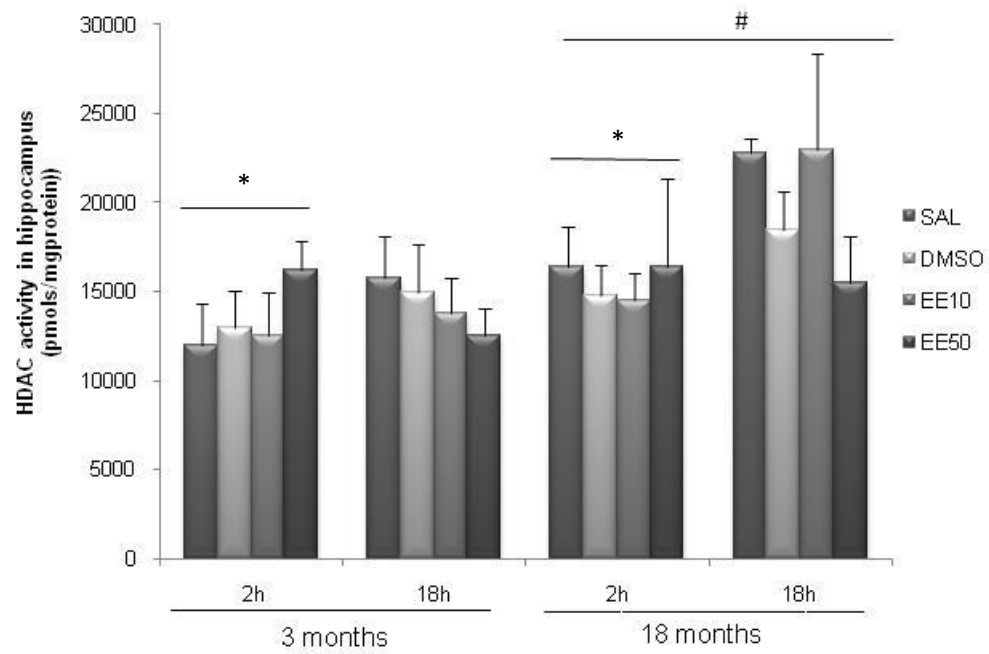
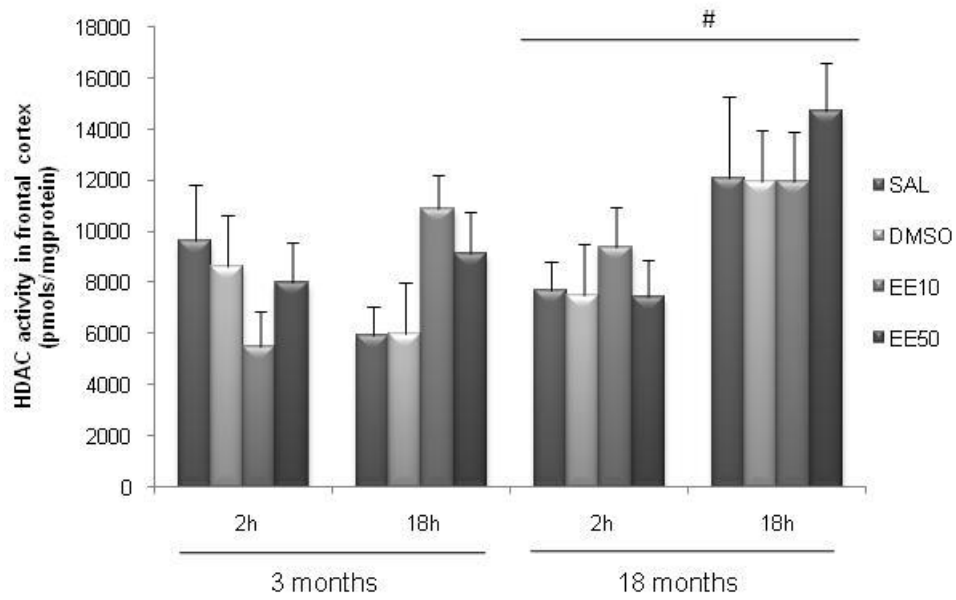


Figure 2



## 6. Considerações finais

Nossos dados corroboram a hipótese de que os mecanismos epigenéticos estão relacionados com o processo de envelhecimento cerebral. Hipocampus e córtices de ratos Wistar com 18 meses de idade apresentaram maior atividade da HDAC, considerando que esta enzima induz um estado de hipoacetilação de histonas, aumentando a compactação da cromatina, podemos sugerir uma consequente redução da expressão gênica. Têm sido descrito que o aumento da atividade da HDAC pode estar relacionado com o processo de envelhecimento e no surgimento de doenças neurodegenerativas (Saha & Pahan, 2006; Zeng *et al.*, 2011; Rodríguez-Rodero *et al.*, 2011).

Cabe ressaltar que as estruturas aqui estudadas são fundamentais na formação e consolidação da memória e do aprendizado (Lynch *et al.*, 2006), assim nossos achados podem estar relacionados com o declínio das funções cognitivas durante o processo de envelhecimento (Gonzalo, 2010; Zeng *et al.*, 2011).

Diversos estudos demonstram que o declínio das funções cognitivas, pode estar relacionado com uma diminuição na acetilação de histonas, aumentando a expressão da HDAC e diminuindo a expressão da HAT e consequentemente afetando a expressão de genes importantes envolvidos nos circuitos neuronais em diferentes regiões do cérebro (Lynch *et al.*, 2006; Sweatt, 2010).

O aumento da atividade da HDAC pode resultar numa diminuição da expressão gênica de genes importantes na neurogênese e na sobrevivência neuronal, como por exemplo, o gene BDNF (Gomez-Pinilla, 1998; Neeper *et al.*, 1996; Gomez-Pinilla, 2011; Driscoll *et al.*, 2012). Recentemente, corroborando nossos achados, foi observada em hipocampus de ratos Wistar com 22 meses de idade uma redução nos níveis de acetilação das histonas H3 e H4 em regiões promotoras do gene BDNF, ocasionando uma diminuição na expressão gênica e com isso prejudicando a atividade das vias de sinalização responsáveis pela plasticidade sináptica (Zeng *et al.*, 2011).

Ainda nesse contexto, Rouaux e colaboradores (2004) observaram em cultura primária de neurônios cerebelares submetidos à privação neurotrófica (modelo de apoptose neuronal), que houve uma desacetilação das histonas H3 e H4 que precederam a morte neuronal, esta desacetilação estava acompanhada pelo silenciamento da CBP, uma proteína de ligação ao CREB que é a Proteína Ligadora ao Elemento Responsivo ao AMPc que está associada a desordens neurodegenerativas. Esses autores sugerem que a desacetilação global de histonas parece aumentar no processo inicial de apoptose neuronal presente nos processos neurodegenerativos, além disso, Saha & Pahan (2006) sugerem que durante o processo de morte neuronal há um aumento da atividade da HDAC.

Importante ressaltar que o processo de envelhecimento cerebral parece estar associado com uma diminuição dos níveis séricos de BDNF, prejudicando a formação de memória no hipocampo em humanos (Erickson *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011).

Neste contexto, o uso de inibidores da HDAC tem sido proposto para a prevenção e tratamento das desordens neurodegenerativas que estão associadas à senescência cerebral. Inibidores farmacológicos como o Valproato de Sódio, Butirato de Sódio, Tricostatina e o Ácido Hidroxâmico Suberoilânilida são alternativas que têm demonstrado serem eficientes na melhora das funções cognitivas e na manutenção e regulação da plasticidade neuronal (Kilgore *et al.*, 2010; Ricobaraza *et al.*, 2009). Diversos autores descrevem que os inibidores da HDAC são capazes de melhorar a formação da memória através do aumento da expressão gênica de genes específicos (Fontán-Lozano *et al.*, 2008; Lubin *et al.*, 2008; Korzus *et al.*, 2004).

Estudos com roedores mostram que inibidores da HDAC são capazes de reverter a apoptose neuronal (Ryu *et al.*, 2003) e ter atividade neuroprotetora em modelo de isquemia (Gardian *et al.*, 2005). Importante salientar que a apoptose neuronal tem sido associada ao envelhecimento e a várias desordens neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, Parkinson e Isquemia. Além disso, foi observado que a administração crônica de ácido hidroxâmico suberoilânilida induziu uma diminuição da atividade da HDAC4 e um aumento da expressão gênica do BDNF em córtex de camundongos (Mielcarek *et al.*, 2011).

Dentre as estratégias neuroprotetoras investigadas, os produtos naturais têm sido amplamente estudados. Por exemplo, o resveratrol, um polifenol derivado principalmente de sementes de uvas, reduz a atividade da HDAC, aumentando consequentemente à longevidade, em leveduras de fungos (Howitz *et al.*, 2003).

O composto epigallocatequina – galato encontrado no chá verde tem sido descrito como um potente inibidor da metilação do DNA (Lee *et al.*, 2005). Além de que, o exercício físico, que tem propriedades neuroprotetoras, parece modular os mecanismos epigenéticos. Nosso laboratório, recentemente, descreveu que um protocolo de exercício diminuiu a atividade da HDAC e aumentou a atividade da HAT em hipocampus de ratos Wistar (Elsner *et al.*, 2011).

Nesse contexto, investigamos o efeito do extrato etanólico de *Curcuma longa* (10mg/Kg e 50mg/Kg) sobre a atividade da enzima HDAC em hipocampo e córtex de ratos com 3 e 18 meses de idade. Nosso estudo demonstrou que o tratamento agudo com extrato etanólico de *Curcuma longa* não afetou a atividade da HDAC.

Há relatos demonstrando que em estudos *in vivo* a curcumina, possui biodisponibilidade baixa. Necessitando de altas doses (acima de 400mg/kg) para ser detectável em tecidos de ratos, sendo atribuído ao metabolismo extensivo desse composto na parede gastrointestinal, glicuronidação hepática e circulação enterohepática (Ringman *et al.*, 2005). Uma dose oral de 500mg/kg em roedores resulta em um pico de concentração plasmática de apenas 1,8 ng/mL (Jurenka, 2009). Uma das alternativas que vêm sendo proposta para aumentar a biodisponibilidade da curcumina é a associação com a piperina, um alcalóide pertencente à família Piperaceae (Shoba *et al.*, 1998; Rinwa & Kumar, 2012).

Outro dado interessante deste estudo é que os níveis de HDAC em hipocampo e córtex de ratos Wistar parecem sofrer influência do fator tempo, uma vez que os níveis de HDAC foram maiores no tempo de 18 horas após a administração (correspondendo ao período da manhã) em comparação ao tempo de 1 hora após a administração, que corresponde ao turno da tarde. Este achado pode estar relacionado à cronobiologia, onde a organização circadiana permite que o organismo mantenha a homeostase em resposta a variações diárias decorrentes do ambiente externo e do próprio organismo (Sharma, 2003; Bellet & Sassone-Corsi, 2010). Cabe descrever que os ratos Wistar são animais notívagos, onde o período

da manhã é o início do período de sono; assim poderíamos sugerir uma redução da acetilação e conseqüentemente uma redução na expressão gênica nesse período. Esses dados corroboram com os encontrados por Elsner e colaboradores (2011) que demonstraram a atuação do ciclo circadiano na atividade das enzimas acetiltransferase (HAT) e desacetilase (HDAC).

