



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO EM ESTEIRA SOBRE
PARÂMETROS EPIGENÉTICOS EM ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS**

Christiano de Figueiredo Spindler

PORTO ALEGRE
2012

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO EM ESTEIRA SOBRE
PARÂMETROS EPIGENÉTICOS EM ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS**

Christiano Spindler

Orientadora: Profa.Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
- Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre.

PORTO ALEGRE

2012

Christiano de Figueiredo Spindler

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO EM ESTEIRA SOBRE
PARÂMETROS EPIGENÉTICOS EM ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro
UFRGS

Prof. Dr. Alex Sander Araújo
UFRGS

Profa. Dra. Nadja Schröder
PUC-RS

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e oportunidade de realizar este sonho.

Agradeço aos meus pais Carlos e Lucia Marina e minhas irmãs Gabriele e Caroline, meus grandes exemplos e eternos apoiadores e estimuladores.

À minha namorada, amiga e companheira, Fernanda Foppa, pelo convívio e pela força em praticamente todo o tempo dispendido no mestrado.

À professora Dra. Ionara Rodrigues Siqueira, minha orientadora, pela oportunidade que me foi dada em seu laboratório, pelo exemplo de ética e trabalho, pelas inúmeras orientações relacionadas ou não com o trabalho, pela paciência, pelo estímulo, pelos conselhos e pela confiança em mim depositada.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Vivi, Kaki, Gi, Felipe, Duda, Cláudia, Louisiana, Carla e Laura, pelo apoio e pela participação vital neste trabalho. Sem a ajuda e o empenho de todos vocês não seria possível a realização deste trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado, pela amizade e companheirismo, que desejo que se estenda para o resto da vida. O convívio com todos vocês, dentro e fora da universidade me proporcionou crescimento científico e humano.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pelas oportunidades, bem como a todos os professores do Departamento de Fisiologia

pelo conhecimento e enriquecimento cultural e científico a mim proporcionado.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante o mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram da conquista deste sonho. O meu eterno obrigado

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Exercício físico.....	1
1.2 Classificações do exercício físico.....	2
1.3 Efeitoneuroprotetor do exercício físico	3
1.4 Epigenética.....	5
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2. Objetivos Específicos.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 Animais.....	11
3.2 Protocolo de Exercício Físico.....	11
3.2.1 <i>Sessão única de exercício</i>	13
3.2.2. <i>Treinamento Crônico</i>	13
3.3 Dissecção e preparação das amostras.....	14
3.4 Atividade da enzima HDAC.....	14
3.5 Atividade da enzima HAT.....	15
4. Estatística.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1 Protocolo de sessão única.....	17
5.1.1 <i>Córtex frontal</i>	17
5.1.2 <i>Estriado</i>	17
5.2 Protocolo de treinamento crônico.....	20
5.2.1 <i>Córtex frontal</i>	20
5.2.2 <i>Estriado</i>	20
6. DISCUSSÃO.....	23
7. CONCLUSÕES.....	27

8. PERSPECTIVAS.....	28
9. REFERÊNCIAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da cromatina

Figura 2. Representação esquemática das modificações epigenéticas em histonas

Figura 3. Esteira ergométrica adaptada para ratos

Figura 4. Representação gráfica da linha do tempo dos protocolos de exercício físico em esteira.

Figura 5. Efeito da sessão única de exercício sobre a atividade das enzimas HAT e HDAC em córtex frontal de ratos

Figura 6. Efeito do protocolo crônico de exercício sobre a atividade das enzimas HAT e HDAC em estriado de ratos

Figura 7. Efeito da sessão única de exercício sobre a atividade das enzimas HAT e HDAC em estriado de ratos

Figura 8. Efeito do protocolo crônico de exercício sobre a atividade das enzimas HAT e HDAC em estriado de ratos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcetilCoA	Acetil Coenzima A
AMPc	Adenosina 5'-monofosfato cíclico
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BDNF	Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo
BSA	Albumina do Soro Bovino
CBP	Proteína de ligação ao CREB
CREB	Proteína de ligação ao Elemento Responsivo ao AMPc
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ÁcidoEtilenodiaminotetraacetato
EGTA	Ácido tetracético etilenoglicol
EXE	Exercitado
HAT	Histona Acetiltransferase
HDAC	Histona Desacetilase
HRP	<i>Horseradishperoxidase</i>
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
IgG	Imunoglobulina
KCl	Cloreto de Potássio
m/min	Metros por minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N₂	Nitrogênio
nm	Nanômetro

pH	Potencial de Hidrogênio
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluoreto
POG	Privação de oxigênio e glicose
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
SAHA	Ácido suberoilanihidroxâmico
SED	Sedentário
TBS	Tampão Tris
VO₂ max	Consumo máximo de oxigênio
μL	Microlitro

Resumo

O exercício físico moderado e regular é considerado uma estratégia neuroprotetora promissora. Os mecanismos pelos quais o exercício físico altera a função cerebral não foram completamente esclarecidos. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o exercício físico alterou a atividade de enzimas relacionadas à acetilação de histonas, Histona Acetiltransferase (HAT) e Histona Desacetilase (HDAC), em hipocampo de ratos Wistar, o que pode estar relacionado às propriedades neuroprotetoras levando ao remodelamento da cromatina. Nossa hipótese de trabalho é de que o exercício físico moderado em esteira ergométrica altera a atividade destas enzimas em diferentes estruturas cerebrais. O objetivo do estudo foi investigar o efeito do exercício agudo (sessão única) e crônico (duas semanas) sobre a atividade da HAT e da HDAC em estriado e córtex frontal de ratos. Ratos Wistar machos adultos foram distribuídos em um grupo não-exercitado (sedentário) e grupos exercitados em esteira ergométrica, utilizando diferentes protocolos: sessão única de exercício (corrida de 20 minutos) e treinamento crônico de exercício (corrida de 20 minutos, uma vez por dia, durante duas semanas). Os efeitos do exercício na atividade da HAT e HDAC foram determinados imediatamente e 1 h após a sessão única ou após a última sessão do treinamento crônico de exercício. A sessão única de exercício aumentou a atividade da HAT em córtex frontal de ratos 1 h após o exercício. O protocolo crônico de exercício reduziu a atividade da HDAC no córtex frontal imediatamente e 1 h após a última sessão de treino. No estriado, o protocolo crônico de exercício aumentou a atividade da HAT e diminuiu a atividade da HDAC imediatamente após o treino. O exercício físico alterou a atividade das enzimas Histona HAT e HDAC, sugerindo um estado de hiperacetilação de histonas em córtex e estriado de ratos Wistar e assim é possível inferir que altere o estado conformacional da cromatina.

Abstract

There is abundant evidence that the practice of regular physical activity modulates different brain functions. The neuroprotective properties of physical exercise have been widely described; however its mechanism of action is not yet fully elucidated. Recently, we demonstrated that the exercise was able to alter the activity of enzymes histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) in hippocampus from Wistar rats. Our working hypothesis was that the exercise would result in changes on HAT and HDAC activities in different brain areas. The aim of this study was to investigate the effect of different protocols of treadmill running on the global activity of the enzymes HAT and HDAC in frontal cortex and striatum of rats. Male Wistar rats were randomly distributed in sedentary and exercised groups. The animals were submitted to exercise were divided into different groups: sedentary, single bout of exercise (running 20 min) and chronic exercise protocol (running once daily for 20 min, for 2 weeks). The effects of exercise on the activity of HAT and HDAC were measured immediately and 1 h after a single session or after the last session of chronic exercise protocol using specific ELISA kits. The single session of exercise increased the HAT activity in the frontal cortex of rats 1 h after exercise. The protocol of chronic exercise reduced the activity of HDAC immediately and 1 h after the last training session in the frontal cortex. In the striatum, the chronic exercise protocol increased the activity of HAT and decreased HDAC activity. Our exercise protocol modified the activity of both enzymes HAT and HDAC in cortex and striatum of rats, suggesting a state of hyperacetylation of histones.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Exercício Físico

A atividade física sempre esteve presente nos relatos da história da humanidade. Estudos antropológicos relatam a existência da prática do exercício físico desde a cultura pré-histórica, como componente integral da expressão cultural, religiosa e social (Antunes, 2006). Ao longo dos tempos, o exercício vem sendo relacionado com efeitos favoráveis ao bem estar, como no estudo de Duman (2005) onde o autor observou que o exercício proporcionou benefícios sociais e psicológicos, tais como atividade ansiolítica e antidepressiva, os quais culminaram em uma mudança positiva sobre fatores de integração social e sobre a autoestima em pacientes que apresentavam depressão leve a moderada. Sabe-se ainda que os efeitos da atividade física afetam inúmeros sistemas fisiológicos, como cardiovascular, nervoso, respiratório e muscular, contribuindo positivamente para a homeostasia, sendo que pessoas moderadamente ativas apresentam um risco menor de serem acometidas por alterações fisiológicas ou tumores quando comparadas a pessoas sedentárias (Antunes, 2006; Wilmore e Costill 2001; Mahabir et al., 2004; Patel et al., 2003).

Askue et al (2009) relacionaram o exercício regular com melhora no funcionamento do sistema cardiovascular e aumento da densidade mineral óssea. Outros estudos também relacionam a prática de exercício regular com diminuição do risco de morte induzida por acidente vascular cerebral, câncer e diabetes (Lee e Paffenbarger, 1998; Askue et al 2009).

Além disso, diversos autores já relataram efeitos positivos sobre o sistema nervoso central, provenientes de diferentes protocolos de exercício físico, como

agudo e crônico, corrida em esteira adaptada (Pietrelliet al., 2011), natação (Drummond et al., 2012) ou ainda (Hopkins et al., 2011) rodas de corrida de livre acesso em protocolos de exercício voluntário, o que corrobora Narath et al que relataram 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).

1.2. Classificações do exercício físico

Uma das classificações do exercício físico é realizada de acordo com a intensidade do esforço realizado pelo indivíduo, que pode considerada como leve, moderada e intensa. Esta classificação pode ser determinada pela taxa de consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), sendo esta última a capacidade máxima que o indivíduo tem de captar e utilizar o oxigênio inspirado para gerar trabalho. Um exercício leve corresponde a 20 e 50% do VO_{2max} , um exercício moderado de 50-70% do VO_{2max} e o exercício intenso acima de 80% do VO_{2max} (Drummond et al., 2005).

Outra maneira de classificar o exercício físico envolve o tipo de motivação, sendo o exercício classificado como voluntário ou forçado. Os modelos experimentais de exercício voluntário utilizam a roda de corrida de livre acesso (Mondonet al., 1985; Russel et al., 1987), porém o controle das variáveis, como frequência e intensidade, durante o treinamento é impreciso (Raglin, 1990). Por outro lado, os modelos de treinamento forçado utilizam esteiras de corrida

adaptadas ou nado forçado tornando possível que as variáveis sejam mais facilmente controladas (Radáket al., 2001).

Os efeitos do exercício podem ser divididos em agudos e crônicos sendo os efeitos agudos aqueles associados diretamente com a sessão de exercício e podem ser subdivididos em imediatos ou tardios. Os efeitos agudos imediatos são aqueles que ocorrem nos períodos pré-imediato, *per* e pós-imediato rápido (até alguns minutos) ao exercício físico; já os efeitos agudos tardios são observados ao longo das primeiras 24 ou 48 horas (às vezes até 72 horas) que se seguem a uma sessão de exercício. Os efeitos crônicos, também denominados adaptações, são aqueles que resultam da exposição frequente e regular a sessões de exercício (Nóbrega e Araújo, 1988).

1.3. Efeito neuroprotetor do Exercício Físico

Há várias evidências de que a prática da atividade física regular modula diferentes funções cerebrais. As propriedades neuroprotetoras do exercício físico têm sido amplamente descritas, como a melhora da função cerebral (Winteret al 2007; Coles e Tomporowiski, 2008; Sibley e Beilock, 2007), o restabelecimento das habilidades mentais em adultos e idosos (Dustman et al., 1984; Elsayed et al., 1980; Kramer et al., 1999), o aprimoramento da função cognitiva (McCloskey et al., 2001) e efeitos favoráveis sobre parâmetros de memória (van Praag et al., 2005; Ang et al., 2006; Ogonovsky et al., 2005; Radak et al., 2006). Ainda, alguns autores descrevem o efeito do exercício físico sobre a memória espacial de roedores em vários modelos comportamentais. Anderson e colaboradores (2000) demonstraram que ratos exercitados em rodas de corrida necessitaram de um

menor período de treino para adquirir o critério de desempenho. Radák e colaboradores (2001) demonstraram que o exercício regular pode ser um meio importante para prevenir o declínio da função cognitiva relacionado com a idade.

Diversos protocolos de exercício vêm sendo usados para estudar os efeitos benéficos do exercício físico, tais como a roda de livre acesso à corrida, esteira ergométrica, através de protocolos de baixa ou alta intensidade, contínuo ou intermitente e de longa ou curta duração (Garcia et al., 2012).

Os resultados obtidos por este grupo de pesquisa demonstraram que os hipocampus de animais submetidos a um protocolo de exercício moderado em esteira (20 minutos diários durante 15 dias) apresentaram alterações na suscetibilidade ao evento isquêmico *in vitro* (Scopel et al., 2006), enquanto que o protocolo de exercício intenso aumentou o dano isquêmico (Scopel et al., 2006). Este resultado corrobora estudos que indicam que os efeitos mediados pelo exercício são dependentes de variáveis como intensidade, frequência e duração do esforço físico (Narathet al., 2001).

Embora a ação neuroprotetora e os seus mecanismos tenham sido amplamente estudados, o(s) exato(s) mecanismo(s) de ação ainda não está (ão) completamente elucidado(s). Tem sido proposto que o exercício físico moderado promove a capilarização (Blackett al., 1987) e aumenta as conexões dendríticas (Pysh e Weiss, 1979). VanPraag e colaboradores (1999) observaram que a melhora do aprendizado espacial foi relacionada com o aumento da neurogênese hipocampal em animais submetidos a exercício voluntário.

Alguns estudos demonstram que o exercício físico moderado em esteira leva também a alterações em outras estruturas encefálicas como córtex e estriado. Protocolos de corrida induziram aumento na densidade de vasos

sanguíneos, proliferação de astrócitos, atividade metabólica e de conteúdo de sinapsina e sinaptofisina em córtices e estriados de ratos (Li et al., 2005; McCloskey, 2001 e Garcia et al, 2012). Ao focarem nas estruturas estriatais, diversos autores observaram que ratos exercitados apresentaram maior expressão de receptores glutamatérgicos, bem como aumento na arborização dendrítica nessa estrutura (Li et al., 2005 e Takamatsu, 2010).

Evidências sugerem que o exercício físico moderado em esteira pode promover o aumento na expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), importante para a diferenciação e sobrevivência neuronal (Ishimaru, 2010; Soya, 2007 e Hopkins et al.,2011). Segundo Russo-Neustadt e colaboradores (2000), um curto período de treinamento já é suficiente para aumentar a expressão de BDNF, uma vez que encontraram níveis elevados de RNAm de BDNF apenas dois dias após o exercício. Miladi-Gorjiet al (2011) encontraram em seu estudo que a administração de um inibidor do BDNF foi suficiente para reduzir significativamente a melhora de parâmetros de memória espacial gerados por um protocolo de exercício voluntário, sugerindo então que o BDNF estaria de alguma forma ligado aos efeitos positivos gerados pelo exercício voluntário sobre parâmetros de memória. É importante ressaltar que a expressão gênica do BDNF pode ser alterada via modificações epigenéticas (Sweatt, 2011).

1.4 Epigenética

O termo epigenética, cunhado em 1942 pelo cientista Conrad Waddington, significa, literalmente, “sobre os genes”. Primordialmente, a definição de epigenética utilizada era a de um processo no qual uma informação genética

sofria influência do ambiente e assim definia o fenótipo (Murrell et al., 2005). Atualmente, a definição do termo é descrita como uma alteração herdável da expressão gênica que são estáveis ao longo de diversas divisões celulares, que não envolvem alteração na sequência de DNA, mas que alteram a conformação da cromatina (Bird, 2007).

A unidade fundamental da cromatina é denominada nucleossomo, o qual consiste em uma unidade de DNA dividida em duas espirais, que se enrolam em torno de um octâmero proteico (Figura 1) constituído por quatro pares de proteínas denominadas histonas: H2A, H2B, H3 e H4 (Kouzarides, 2007; Strahl e Allis, 2000). Além disso, uma molécula avulsa de histona (H1 ou H5) se liga ao DNA dentro e entre os nucleossomos, ajudando a estabilizar a estrutura da cromatina (Angelov et al., 2001).

A alta proporção de resíduos dos aminoácidos lisina e arginina nas histonas gera uma carga positiva, que permite a forte ligação destas proteínas com o DNA que possui alta carga negativa (Kouzarides, 2007). Cada histona apresenta uma sequência amino-terminal (N-terminal) flexível de 11 a 37 aminoácidos. Estas regiões são chamadas de “caudas das histonas”.

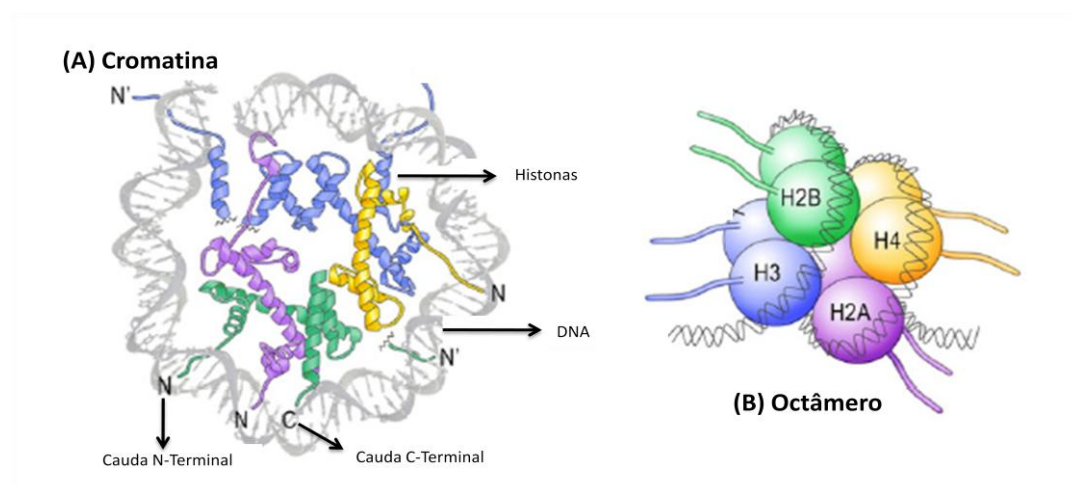


Figura 1.(A) Estrutura da cromatina formada por histonas envolvidas por duas moléculas de DNA; (B) Octâmero proteico do nucleossomo, formado por quatro pares de histonas (Adaptada

de Gräff e Mansuy, 2008).

O grau de condensação das histonas e a compactação dos nucleossomos alteram a acessibilidade ao DNA para o processo transcricional (Lund e Lohuizen, 2004). Fatores que aumentem a condensação da cromatina levam geralmente a uma repressão e ao silenciamento gênico, ao passo que a cromatina no seu estado mais “frouxo” tende a facilitar a transcrição e a expressão gênica (Rodenhiser e Mann, 2006). Este estado dinâmico da cromatina pode ser alterado por modificações epigenéticas que ocorrem nas histonas ou no próprio DNA, como acetilação, metilação, fosforilação ubiquitinação e ADP-poli-ribosilação (Tang et al., 2007; van Holde et al, 1988).

Dentre os processos que alteram as caudas das histonas, destaca-se a acetilação a qual é a modificação mais estudada até o momento e foi o foco do nosso estudo. A acetilação ocorre nas caudas N-terminais das histonas e é controlada por dois grupos enzimáticos, as “Histonas AcetilTransferases” (HAT) que promovem acetilação e as “Histonas Desacetilases” (HDAC), que promovem a desacetilação.

As HAT atuam catalisando a adição de um grupamento acetil, proveniente da molécula doadora acetil-coenzima A (acetil-CoA), aos resíduos de lisina das histonas, fazendo com que a carga positiva destas proteínas seja neutralizada, diminuindo então a força eletrostática de ligação com o DNA, tornando o estado conformacional da cromatina mais aberto, facilitando os processos de transcrição. Se contrapondo a esta atividade, as enzimas HDAC desacetilam a cromatina, retirando o grupamento acetil da cauda N-terminal, fazendo com que as cargas positivas novamente fortaleçam a ligação eletrostática com o DNA, condensando a cromatina e desta forma, contribuindo para a diminuição dos processos de

transcrição e para o silenciamentogênico(Waggoner, 2007; Yoo e Jones, 2006).

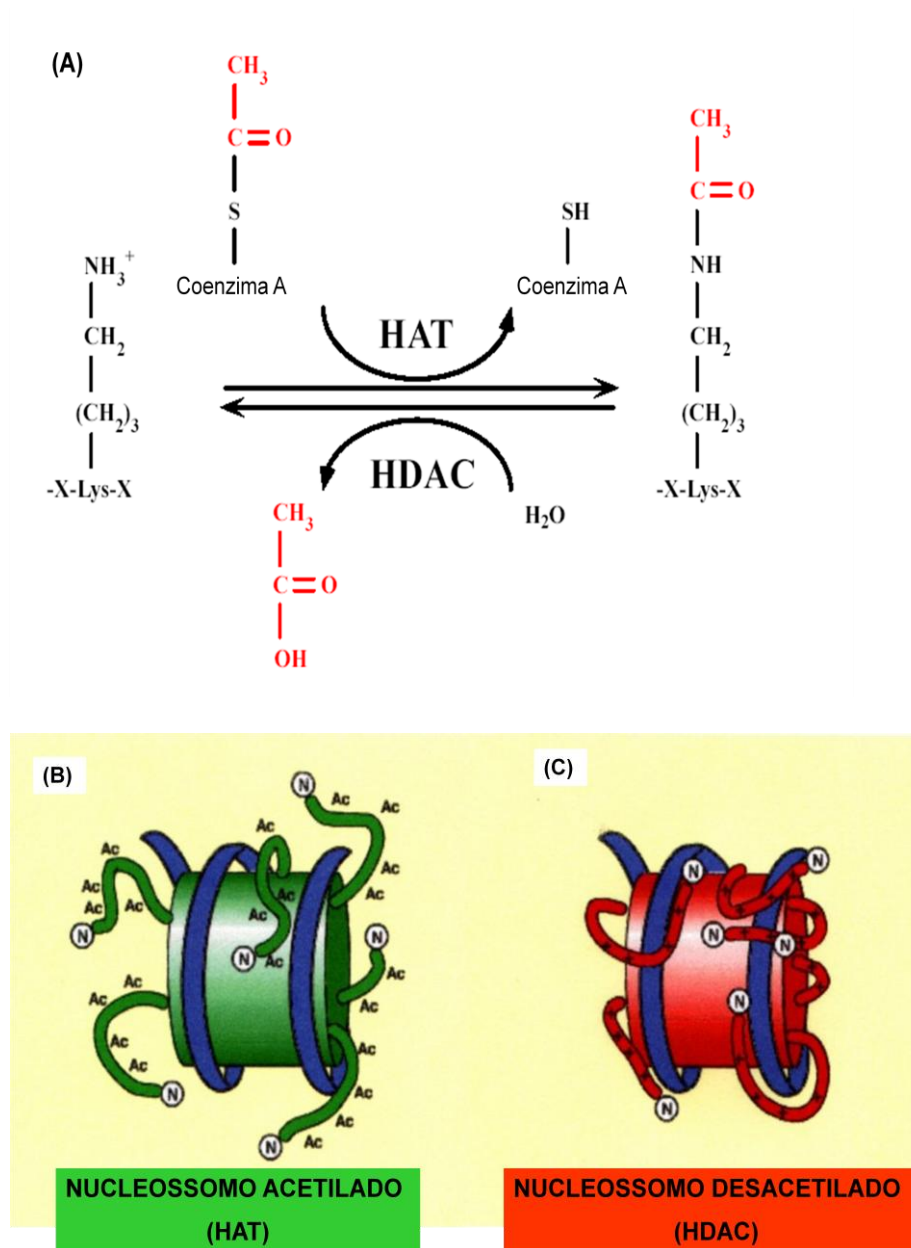


Figura 2.(A) Acetilação e desacetilação de histonas catalisadas pela ação da HAT e da HDAC; (B) Cromatina “aberta”; (C) Cromatina condensada (Adaptado de <http://bricker.tcnj.edu/Amb/amble9.html>).

É sugerido que o balanço entre a atividade dos dois grupos enzimáticos é de vital importância para a manutenção da homeostase, uma vez que estudos apontam para a utilização de agentes que aumentem os níveis de acetilação de histonas como recursos terapêuticos promissores no tratamento de diversas alterações neurodegenerativas (Saha e Pahan, 2006).

Estudos experimentais indicam que a utilização de inibidores de HDAC como a tricostatinaA (TSA) e o valproato de sódio, parece ser favorável no manejo da morte neuronal e conseqüentemente na melhora da qualidade de vida de pacientes que sofrem de doenças neurodegenerativas, neuropsiquiátricas e distúrbios de aprendizagem e memória (Bates, 2001; Sugarse Rubinsztein, 2003; Hockly et al., 2003; Ryu et al., 2003).

Resultados obtidos recentemente neste grupo sugerem o papel do exercício sobre a modulação da acetilação de histonas. Elsner e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos de um protocolo neuroprotetor de corrida em esteira ergométrica adaptada sobre a atividade das enzimas controladoras da acetilação – HAT e HDAC em hipocampo de ratos. O exercício parece estar envolvido na modulação do estado de acetilação de histonas, uma vez que o protocolo de corrida aumentou a atividade das enzimas HAT e concomitantemente diminuiu a atividade de HDACs em hipocampus de ratos Wistar.

Assim, torna-se importante avaliar o impacto do exercício físico moderado em esteira ergométrica sobre a atividade das enzimas HAT e HDAC em diferentes estruturas cerebrais de ratos Wistar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de um protocolo de exercício físico moderado sobre a atividade das enzimas HAT e HDAC em córtex frontal e estriado de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

I) Avaliar o efeito do protocolo neuroprotetor crônico sobre as atividades das enzimas HAT e HDAC em córtex frontal e estriado de ratos Wistar.

II) Estudar o efeito de sessão única de exercício sobre as atividades das enzimas HAT e HDAC em córtex frontal e estriado de ratos Wistar.

III) Avaliar as atividades das enzimas HAT e HDAC em córtex frontal e estriado em diferentes tempos após o treino (imediatamente e 1 hora).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos adultos com 2-3 meses, pesando entre 200 e 300 g, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e pela Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas (390 X 320 X 170 mm³), forradas com maravalha, contendo cinco animais/caixa. Os animais foram mantidos em condições padrão, aclimatizados com um ciclo normal claro/escuro de 12 horas, com ração padronizada e água “*ad libitum*”.

Omáximo de precaução foi tomado com o intuito de minimizar o sofrimento e de reduzir o número de animais utilizados, sendo que todos os experimentos estiveram de acordo com os critérios estabelecidos na Lei Arouca (11.794) eo “Guide for Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication No. 80-23, revised 1996). Este trabalho foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 09-123.

3.2 Protocolo de Exercício Físico

O protocolo de exercício físico consistiu em sessões de corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos, contendo oito pistas individuais separadas entre si por paredes confeccionadas em acrílico (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brasil, Figura 3), sempre entre as 14hs e 17hs. Nenhum choque elétrico foi utilizado neste estudo.



Figura 3. Esteira ergométrica adaptada.

Para determinar a velocidade de corrida que seria utilizada durante os treinos foi utilizada a medida de consumo máximo de oxigênio indireto ($VO_2\text{max}$) recomendada por Brooks e White (1987). Cada animal correu na esteira a uma velocidade inicial baixa seguida por incrementos de 5m/min a cada 3min até atingir seu ponto de exaustão (incapacidade do rato em continuar a correr). O tempo de fadiga (em minutos) e a velocidade máxima (em m/min) foram tomados como 100% da capacidade de exercício e usados para a determinação de $VO_2\text{max}$ indireto.

Os animais inicialmente selecionados que se recusavam a correr eram encorajados com gentis “tapinhas” em suas costas. Os que, mesmo assim, se recusavam a correr foram excluídos da amostra (Scopel, et al., 2006). O grupo sedentário (SED) foi transportado para a sala de experimentos e os animais foram

manipulados exatamente como os do grupo exercitado (EXE), sendo submetidos à esteira sem movimento durante 5 minutos, porém sem realizar a corrida. Além disso, todos os animais foram habituados ao aparato de treino um dia antes para minimizar o estresse, sendo colocados na esteira desligada por 5 minutos.

3.2.1 Sessão única de exercício

No primeiro protocolo, os animais EXE foram submetidos a uma única sessão de exercício, ou seja, correndo na esteira durante 20 minutos. Os primeiros minutos foram destinados para a elevação da velocidade e os últimos minutos para o decréscimo desta, ou seja: iniciou-se com uma velocidade de 6,7 m/min nos primeiros 4 min, aumentando para 15 m/min nos próximos 12 min, e finalizou-se com 6,7 m/min nos últimos 4 min.

3.2.2 Treinamento Crônico

No segundo protocolo, os animais EXE foram submetidos ao exercício crônico, ou seja, correndo na esteira diariamente, durante 20 minutos, por duas semanas. Nas duas primeiras sessões, os ratos foram adaptados ao treinamento correndo com velocidade inicial de 6,7 m/min nos primeiros 2 min, aumentando para 10 m/min nos próximos 4 min, 15 m/min nos últimos 8 min, 10 m/min nos próximos 4 min e finalizando com velocidade de 6,7 m/min nos últimos 2 min. Nas demais sessões, iniciou-se com velocidade de 6,7 m/min nos primeiros 4 min, progredindo para 15 m/min nos próximos 12 min, e finalizando com 6,7 m/min nos últimos 4 min.

3.3 Dissecção e preparação das amostras

Em ambos os protocolos de exercício, os animais foram decapitados em diferentes tempos após o treino: imediatamente (EXEim, SEDim) ou 1 hora (EXE1h, SED1h). A decapitação dos animais foi realizada em laboratório diferente da sala de onde foi realizado o treino de corrida. O córtex frontal e o estriado foram rapidamente dissecados bilateralmente. As amostras foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C até a realização dos ensaios (determinação da atividade das enzimas HAT e HDAC). Os ensaios bioquímicos foram realizados no laboratório 204 do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS.

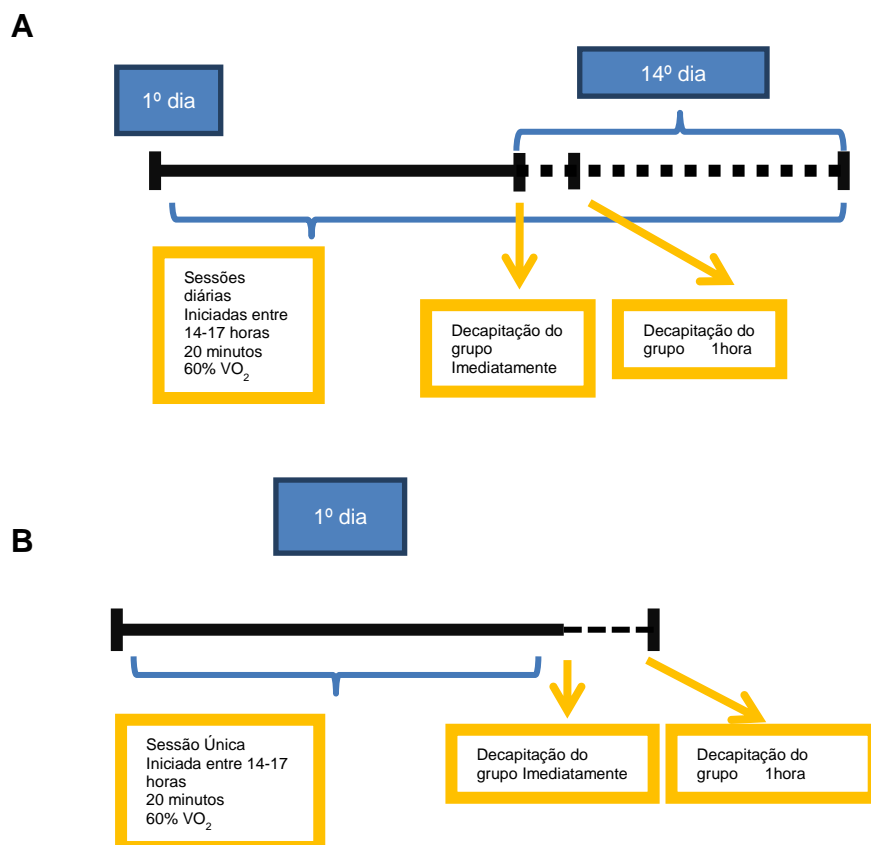


Figura4. Linha do tempo Protocolo Crônico de exercício (A) e Protocolo de sessão única de exercício (B).

Para a realização dos ensaios, as estruturas cerebrais foram homogeneizadas num volume de 1:3 em tampão de lise gelado contendo sacarose 250 mM; Tris-HCl 20 mM; pH 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; KCl 10 mM; DTT 1 mM; PMSF 0,1 mM; *ácido ocadáico* 0,1 mM. Os lisados foram centrifugados (16.000g) por 5 minutos a 4°C em um tubo de microcentrífuga e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio.

A concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão.

3.4 Atividade da enzima HDAC

O efeito do exercício sob a atividade da enzima HDAC foi mensurado no sobrenadante através de um kit-ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Detecção Fluorimétrica, catálogo #17-372, Upstate Biotechnology). Foram incubados 5 µL de tampão, 5 µL de amostra e 10 µL de substrato durante 60 min a 30°C. Após, houve incubação por 15 min em temperatura ambiente com solução ativadora. A leitura ocorreu em um leitor de placas de fluorescência (excitação=360 nm, emissão=450 nm) durante 60 min.

3.5 Atividade da enzima HAT

O efeito do exercício sob a atividade da enzima HAT foi mensurado através de um kit-ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Detecção Colorimétrica, catálogo #17-279, Upstate Biotechnology). Este kit baseia-se na utilização da histona H4 e permite a comparação direta da atividade da enzima HAT na sua respectiva cauda amino-terminal, a qual é suscetível a alterações

pós-traducionais. 100µL de 1µg/mL de histona H3 ou histona H4 foram incubados com estreptavidina durante 30min em temperatura ambiente. Os poços foram lavados 5 vezes com TBS e incubados com 200µL de BSA 3% por 30min a 30°C. Para induzir a acetilação das histonas, os poços foram novamente lavados com TBS, e adicionou-se em cada poço 50µL da reação de coquetel (composta de 10µL tampão, 10µL de acetil-CoA, 5µL de amostra e 25µL de H₂O destilada) e a placa foi incubada por 40min a 30°C. Após 5 lavagens com TBS, pipetou-se em cada poço 100µL de anticorpo anti-acetil-lisina (1:2500 diluído em TBS) e a placa foi incubada por 1h30min em temperatura ambiente. Depois disso, lavou-se a placa 5 vezes com TBS, pipetou-se 100µL de conjugado IgG com peroxidase (1:500 diluído em TBS) em cada poço e a placa foi incubada por 30min a temperatura ambiente. Posteriormente, foi incubado 100µL de mistura de substrato de tetrametilbenzidina no escuro durante 10 minutos. Finalmente para parar a reação de peroxidase foi pipetado 50µL de H₂SO₄. As alterações colorimétricas foram mensuradas através de um leitor de placas em dois comprimentos de onda, 450nm e 570nm.

4. Estatística

Ao final dos experimentos, os dados foram coletados e armazenados em uma planilha (Microsoft Excel). Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo *post hoc* de Tukey, onde os fatores considerados foram o exercício e o tempo de eutanásia após o treino. Para isso, utilizou-se o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Science*), versão 16.0, adotando-se nível de significância $p < 0,05$. Todos os dados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Protocolo de sessão única de exercício

5.1.1. Córtex Frontal

A sessão única de exercício alterou significativamente a atividade da HAT no córtex frontal dos ratos. O grupo exercitado apresentou maior atividade da HAT quando comparado com o grupo sedentário uma hora após o treinamento ($P = 0,012$), conforme mostra a Figura 5 A. Não houve diferença significativa na atividade da HDAC no córtex frontal (Figura 5 B).

5.1.2 Estriado

No estriado, o protocolo de sessão única de exercício não alterou significativamente a atividade das enzimas HAT e HDAC (Figuras 6A e 6B, respectivamente).

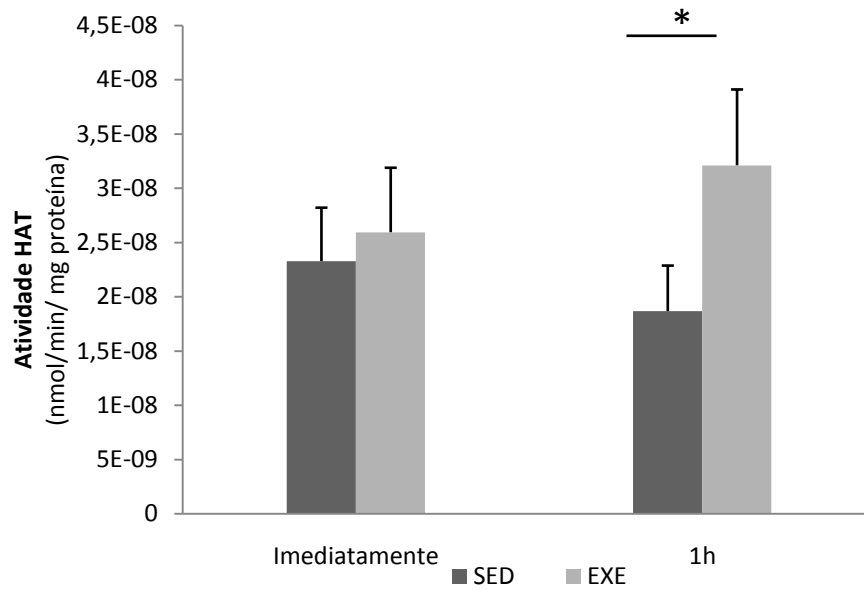
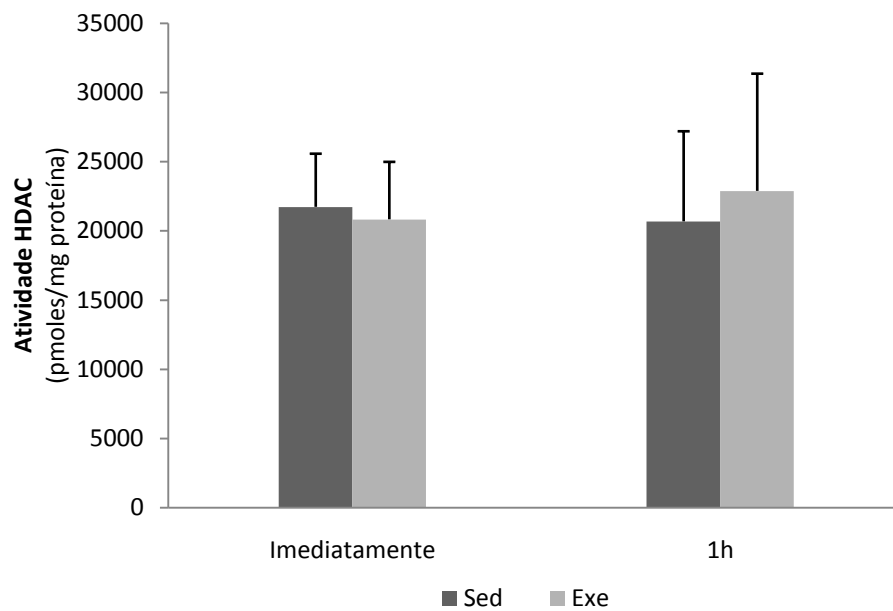
A**B**

Figura 5. Efeito da sessão única de exercício sobre a atividade das enzimas HAT(A) e HDAC(B) em córtex frontal de ratos. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3-5 animais por grupo). *Valores significativamente diferentes entre os grupos EXE e SED, determinados por ANOVA de duas vias seguido do Teste de Tukey ($p < 0,05$).

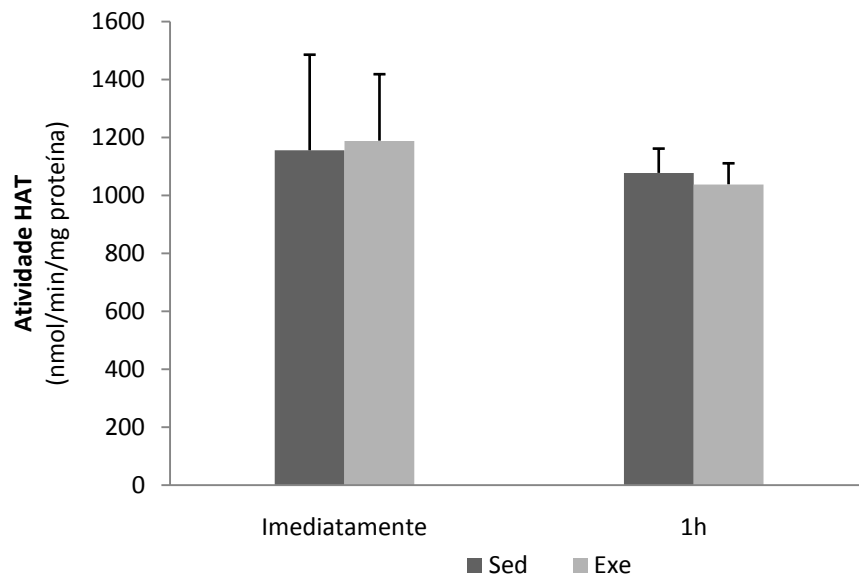
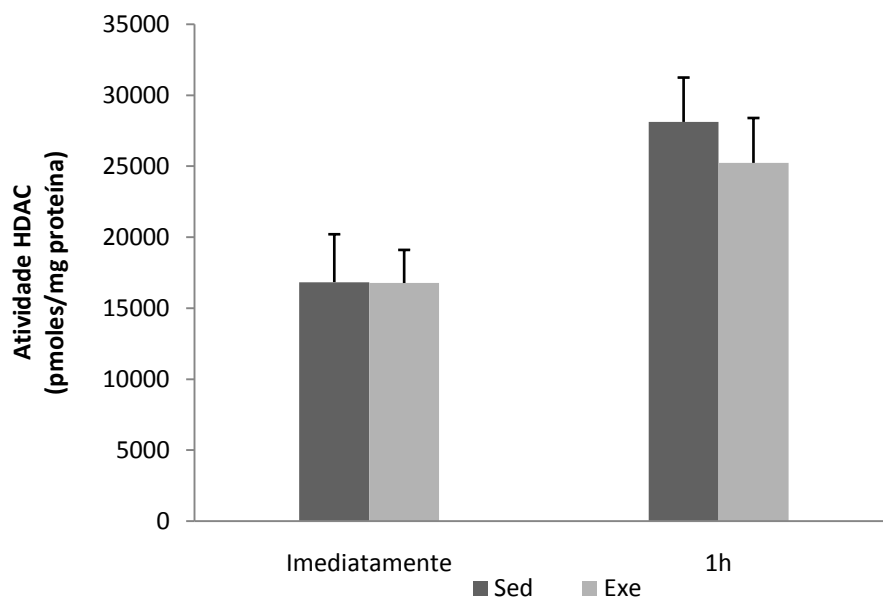
A**B**

Figura 6. Efeito da sessão única de exercício sobre a atividade das enzimas HAT(A) e HDAC(B) em estriado de ratos. Os resultados determinados por ANOVA de duas vias e estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3-5 animais por grupo).

5.2 Protocolo crônico de exercício

5.2.1 Córtex Frontal

O protocolo crônico de exercícionão induziu alterações significativas na atividade da HAT em córtex frontal dos ratos (Figura 7A). Porém, a enzima HDAC apresentou uma redução significativa de atividade no grupo exercitado quando comparado ao grupo sedentário imediatamente ($p=0,001$) e uma hora ($p=0,002$) após a última sessão de treino (Figura 7B).

5.2.2 Estriado

O exercício crônico em esteira aumentou a atividade da HAT imediatamente após o treino ($p=0,046$). Contudo este efeito não foi observado uma hora após a última sessão de treino (Figura 8A). Ainda, o mesmo protocolo reduziu a atividade da HDAC, quando comparado com o grupo sedentário, imediatamente após a última sessão de exercício ($p=0,003$; Figura 8B).

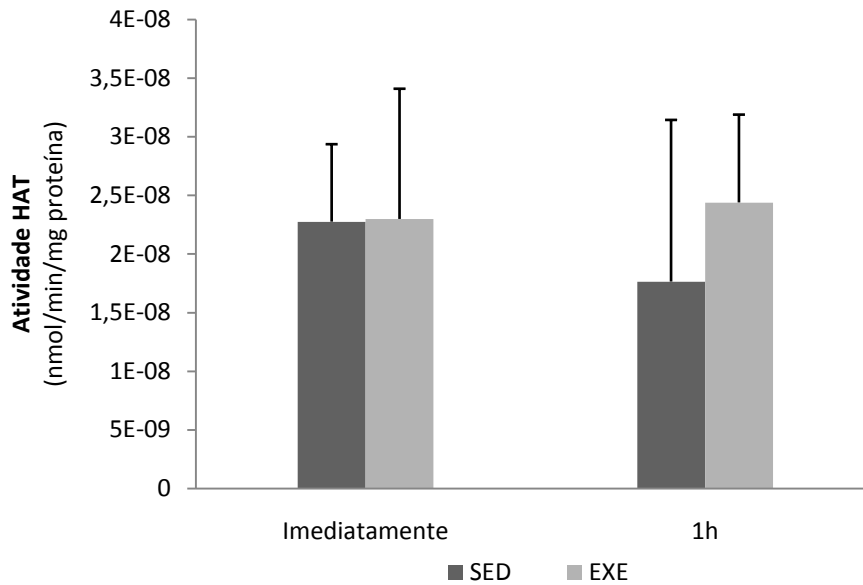
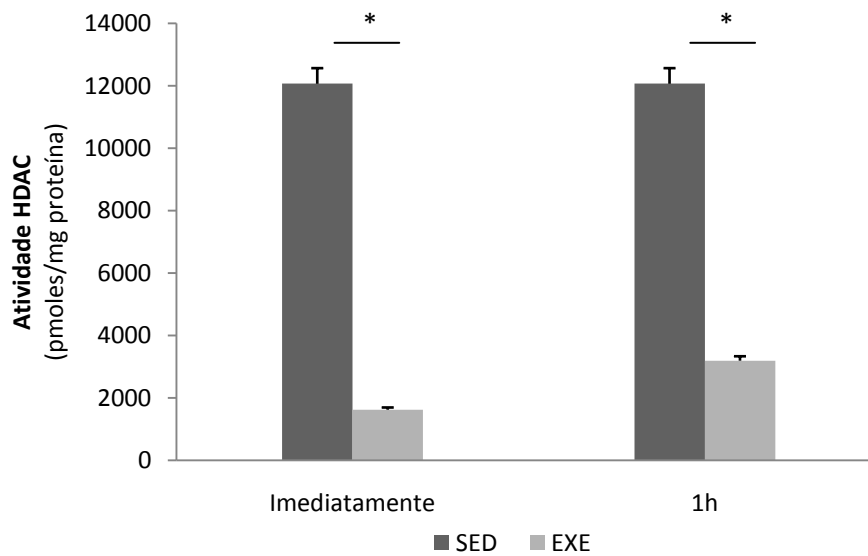
A**B**

Figura 7. Efeito do protocolo crônico de exercício sobre a atividade das enzimas HAT(A) e HDAC(B) em córtex frontal de ratos. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=4-5 animais por grupo). *Valores significativamente diferentes entre os grupos EXE e SED, determinados por ANOVA de duas vias seguido do Teste de Tukey ($p < 0,05$).

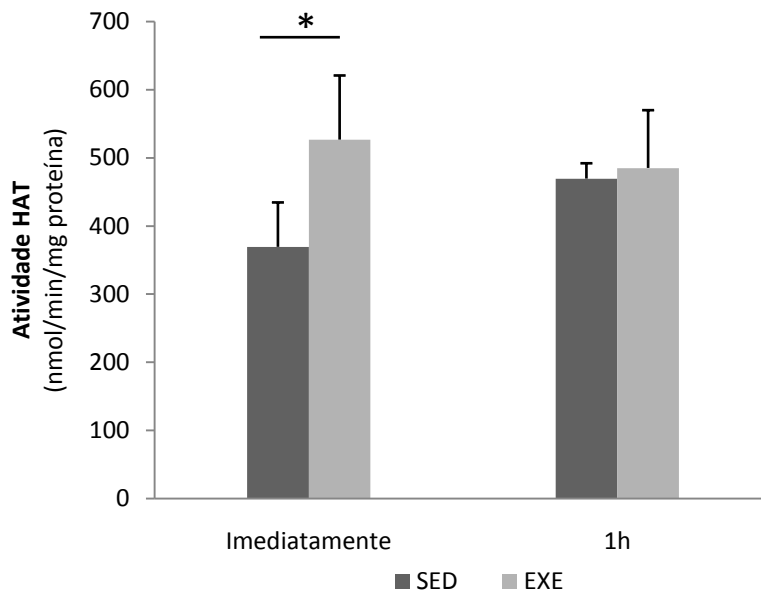
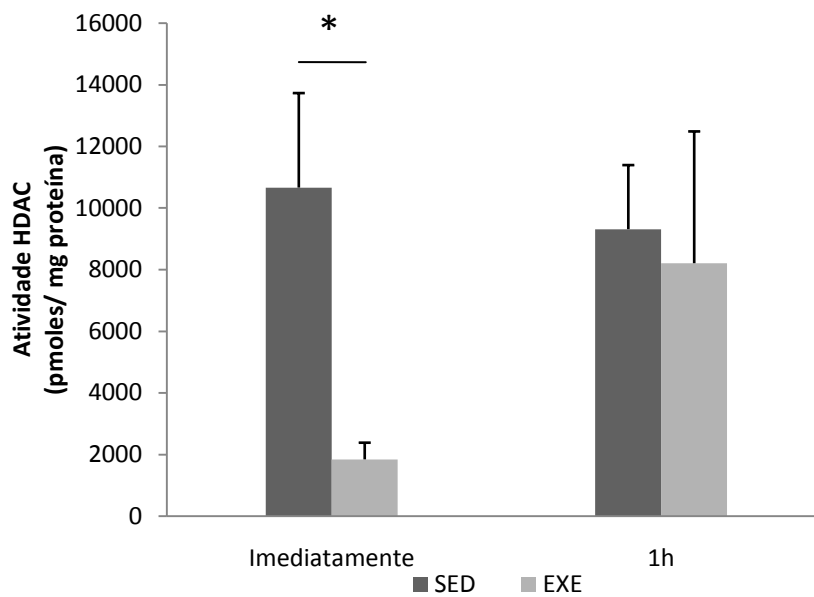
A**B**

Figura8. Efeito do protocolo crônico de exercício sobre a atividade das enzimas HAT(A) e HDAC(B) em estriado de ratos. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=4-5 animais por grupo). *Valores significativamente diferentes entre os grupos EXE e SED, determinados por ANOVA de duas vias seguido do Teste de Tukey ($p < 0,05$).

6. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo corroboram a hipótese de que o exercício físico moderado em esteira ergométrica pode estar envolvido na modulação do estado de acetilação de histonas no cérebro de ratos Wistar, alterando a atividade de enzimas envolvidas na acetilação de histonas em diferentes regiões encefálicas. O exercício moderado em esteira parece modular de forma dependente de tempo e da estrutura, considerando o perfil temporal e as diferenças entre as estruturas cerebrais de interesse, córtex frontal e estriado.

Dados obtidos em nosso laboratório (Elsner et al., 2011) demonstraram que o protocolo de sessão única de exercício foi capaz de aumentar a atividade global da HAT e de diminuir a atividade global da HDAC em hipocampo de ratos exercitados imediatamente e uma hora após o exercício, comparados aos grupos sedentários, o que sugere um padrão de hiperacetilação das histonas. Por outro lado, o protocolo de duas semanas não alterou a atividade de ambas as enzimas em hipocampo de ratos adultos. Cabe destacar que recentemente foi observado neste laboratório que o protocolo de duas semanas aumentou a acetilação global em hipocampus de ratos de 20 meses, o que não ocorreu em adultos jovens.

Os resultados deste trabalho demonstram que a sessão única de exercício aumentou a atividade da HAT em córtex, enquanto que, o protocolo crônico não alterou a atividade da HAT, enquanto, reduziu pronunciadamente a atividade da HDAC em ambos os tempos testados.

No estriado, observamos uma alteração na atividade de ambas as enzimas após o protocolo de exercício crônico, onde os níveis de atividade da HAT apresentaram um aumento no grupo exercitado imediatamente após a última

sessão de treino, quando comparado ao grupo sedentário, bem como uma diminuição da atividade da HDAC. As alterações induzidas pelo exercício no estriado são de especial interesse devido ao envolvimento funcional desta estrutura cerebral com o comportamento e o controle motor. As alterações observadas apenas imediatamente após o exercício nesta estrutura pode ser explicada, ao menos em parte, por uma possível adaptação da circuitaria estriatal frente aos estímulos provenientes do protocolo de exercício.

Essa diferença de respostas ao exercício físico encontrada em estruturas cerebrais já foi encontrada em outros estudos, onde estruturas encefálicas distintas respondem diferentemente aos estímulos provenientes dos protocolos de exercício físico. McCloskey e colaboradores (2001) observaram um aumento de parâmetros metabólicos induzido pelo exercício físico em roda de corrida em estriado e córtex, mas não em hipocampo. Nesse estudo, seis meses de exercício voluntário aumentaram a densidade da enzima citocromo oxidase no córtex motor e na região estriatal, caudado-putâmen dorsolateral, mas não no caudado-putâmen ventrolateral ou em qualquer região hipocampal. Além disso, a heterogeneidade da maquinaria epigenética pode estar relacionada às diferenças nas respostas obtidas, contudo, de nosso conhecimento, estudos que comparem os mecanismos de acetilação nas diferentes estruturas cerebrais ainda não foram realizados.

De forma geral, podemos sugerir que o exercício pode alterar a expressão gênica nas estruturas estudadas, já que o estado acetilado de histonas, induzido pelo aumento da atividade da HAT e/ou pela redução da atividade da HDAC, leva a uma conformação mais aberta da cromatina, sendo então associada a um aumento da atividade transcricional (Strahl e Allis, 2000; Wade, 2001). Desta

forma, nossos dados parecem estar relacionados com os achados de Loue colaboradores que mostraram um aumento de expressão dos genes NMDAR1, VEGF, Flk-1 B e BDNF induzido pelo exercício físico em esteira ergométrica em ratos (Lou et al., 2008). Em concordância, alguns estudos demonstraram que o exercício físico forçado em esteira ergométrica é capaz de promover aumento da expressão de genes, como o do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) (Bosetal., Takamatsu, 2012, Hopkins et al., 2011, 2010). Ainda, outros estudos demonstraram que a acetilação da região do promotor IV no gene do BDNF aumenta a expressão desse fator, que por sua vez está relacionado com aprendizado, memória e neuroproteção (Tsankova et al., 2006, Gomez-Pinilla, 2011).

Assim, podemos inferir que o efeito do exercício físico sobre a acetilação de histonas esteja relacionado ao efeito neuroprotetor do exercício, uma vez que já foi demonstrado que a atividade global da HAT pode estar envolvida na formação de memória e com a neuroproteção (Selviet al., 2010). Cabe descrever que a diminuição de coativadores que apresentam atividade HAT, como a P300 e a CBP (proteína de ligação ao CREB), está associada à neurodegeneração (Rouaux et al., 2004; Jiang et al., 2003). Utilizando um modelo de apoptose neuronal *in vitro*, Rouaux et al (2003) descreveram que somado à desacetilação das histonas H3 e H4 que precederam a apoptose, foi constatada a diminuição do conteúdo de CBP nas culturas de neurônios cerebelares. Uma alta atividade da HDAC também tem sido observada nos processos iniciais da apoptose celular e parece estar relacionada com alterações neurodegenerativas (Rouaux et al., 2003). Fontán-Lozano e colaboradores (2008) demonstraram que uma redução dos processos de desacetilação pela utilização de inibidores de

HDAC além de induzir um aumento na acetilação de histonas, melhorou parâmetros de memória em diversos testes experimentais. Além disso, a inibição da atividade da HDAC por meio da administração de inibidores foi relacionada com a melhora em inúmeras condições neurodegenerativas. A administração de inibidores de HDAC, foi capaz de reverter a indução da apoptose induzida pelo estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, AVC, Esclerose Múltipla e ataxia de Friedreich (Ryu et al., 2003). Ainda, inibidores de HDAC como a Tricostatina A (TSA) e o ácido Suberoilânilidá Hidroxâmico (SAHA) foram capazes de diminuir a toxicidade e a neurodegeneração dependente da poliglutamina em moscas *Drosophila* (Steffan et al., 2001). Assim, a diminuição da atividade da enzima HDAC observado no presente trabalho permite-nos sugerir o envolvimento da diminuição da atividade desacetiladora com os mecanismos de ação da atividade neuroprotetora induzida pelo exercício.

A sessão única de exercício físico aumentou a atividade da HAT e, ainda, o protocolo crônico aumentou a atividade da HAT e reduziu a atividade da HDAC no córtex frontal. Estes dados podem estar relacionados com a melhora transitória da memória aversiva, como já observada pelo nosso grupo (Lovatelet al., 2012), já que a formação de memórias declarativas está relacionada fundamentalmente com o hipocampo e conta com a participação de estruturas corticais como o córtex frontal (Lent, 2008). Interessante comentar que a melhora na memória aversiva segue um padrão temporal semelhante ao observado nos parâmetros bioquímicos, uma vez que a melhora da memória ocorreu agudamente (cerca de uma hora após a última sessão de treino), utilizando o paradigma da esQUIVA inibitória (Lovatelet al., 2012). Considerando que o treinamento em esteira

ergométrica durante duas semanas não alterou parâmetros epigenéticos no hipocampo, podemos sugerir que as alterações induzidas no córtex frontal (imediatamente e uma hora após a última sessão de exercício) podem ser determinantes para esta resposta funcional.

Um aumento transitório na acetilação de histonas foi observado em músculo esquelético de humanos (McGeet al., 2009), corroborando o perfil de hiperacetilação induzido pelo exercício físico. Estudos em músculo esquelético de humanos demonstraram que uma única sessão de exercício diminuiu a concentração de uma HDAC nuclear (HDAC5) e ainda aumentou a expressão de GLUT-4 (Kranioet al 2000, McGeet al 2009).

Por fim, nossos resultados sugerem que a acetilação de histonas mediada pela atividade das enzimas HAT e HDAC pode ter, pelo menos em parte, um papel no efeito neuroprotetor induzido pelo exercício físico moderado em esteira ergométrica em córtex frontal e estriado de ratos Wistar.

7. Conclusões

Nossos resultados nos permitem concluir que:

- O exercício físico em esteira é capaz de modular a atividade das enzimas histona acetiltransferase(HAT) e histona desacetilase (HDAC) em córtex frontal e estriado de ratos.
- A modulação da atividade das enzimas HAT e HDAC depende do protocolo de exercício utilizado, uma vez que os diferentes protocolos induziram diferentes respostas nas estruturas de estudo.
- As estruturas cerebrais estudadas, córtex frontal e estriado, respondem de maneira diferente aos protocolos de exercício.

Nossos dados permitem sugerir que a neuroproteção induzida pelo exercício físico de intensidade moderada em esteira ergométrica, pode estar relacionada, pelo menos em parte, com as atividades das enzimas histona acetiltransferase (HAT) e histona desacetilase (HDAC) em córtex frontal e estriado.

8. Perspectivas

- Analisar o efeito de diferentes protocolos de exercício físico sobre a atividade das enzimas HAT e HDAC em outras estruturas cerebrais de ratos.
- Investigar o efeito dos protocolos de exercício em esteira sobre diferentes alterações epigenéticas, como metilação de histonas e de DNA.

9. REFERÊNCIAS

- Anderson JB, Rapp ND, Baek HD, McCloskey PD, Coburn-Litvak SP, Robinson KJ. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiology & Behavior* 2000, 70:425-429.
- Ang ET, Dawe GS, Wong PTH, Moochhala S. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Research* 2006, 1113: 186–193.
- Angelov D, Vitolo JM, Mutskov V, Dimitrov S, Hayes JJ. Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *Proc. National Academy of Science USA* 2001, 98: 6599–6604.
- Asku I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O. Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, pré-frontal córtex and striatum. 2009, *Neuroscience Letters* 452:281-285
- Bates GP (2001), Huntington's disease. Exploiting expression. *Nature* 413:691-694.
- Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007, 447:396–398.
- Black JE, Greenough WT, Anderson BJ, Isaacs KR. Environment and the aging brain. *Canadian Journal Psychology* 1987, 41: 111-130.
- Bos I, Boever P, Panis LI, Sarre S, Meeusen R. Negative effects of ultrafine particle exposure during forced exercise on the expression of brain-derived factor in the hippocampus of rats. *Neuroscience* 2012, 223:131–139.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976, 72:218–254.
- Coles K, Tomporowski PD. Effects of acute exercise on executive processing, short-term and long-term memory. *Journal of Sports Science* 2008, 26: 333–344.

- Drummond MJ, Vehrs PR, Schaalje GB, Parcell AC. Aerobic and resistance exercise sequence affects excess postexercise oxygen consumption. *Journal of Strength Conditioning Research* 2005, 19:332-7.
- Drumond LE, Mourão FAGA, Leite HR, Abreu RV, Reis HJ, Moraes MFD, Pereira GS, assensini AR. Differential effects of swimming training on neuronal calcium sensor-1 expression in rat hippocampus/cortex and in object recognition memory tasks. *Brain Research Bulletin* 2012, 88: 385–391
- Duman RS. Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. *Neurobiology of Aging* 2005, 1:88-93.
- Dustman RE, Ruhling RO, Russell EM, Shearer DE, Bonekat HW, Shigeoka JW, Wood JS, Bradford DC. Aerobic exercise training and improved neuropsychological function of older adults. *Neurobiology of Aging* 1984, 35-42.
- Elsayed M, Ismail AH, Young RJ. Intellectual differences of adult men related to age and physical fitness before and after an exercise program. *Journal of Gerontology* 1980, 35:383-7.
- Elsner VR, Lovatel GA, Bertoldi K, Vanzella C, Santos FM, Spindler C, de Almeida EF, Nardin P, Siqueira IR. Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neuroscience* 2011, 192:580-587.
- Fontán-Lozano A, Romero-Granados R, Troncoso J, Múnera A, Delgado-García JM, Carrión AM. Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2008, 39:193–201.
- Garcia PG, Real CC, Ferreira AFB, Alouche SR, Britto LRG, Pires RS. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural

- proteins in motor areas of the rat brain. *Brain Research* 2012, 1456:36-48.
- Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *Journal of Neurophysiology* 2002, 88: 2187-95.
- Gräff, J, Mansuy IM. Epigenetic codes in cognition and behavior. *Behavior Brain Research* 2008, 70:87.
- Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden PA et al. Suberoylanilidehydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 2003, 100:2041-2046.
- Hopkins ME, Nitecki R, Bucci DJ. Physical exercise during adolescence versus adulthood: Differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 2011, 194:84–94.
- Ishimaru N, Fukuchi M, Hirai A, Chiba Y, Tamura T, Takahashi N, Tabuchi A, Tsuda M, Shiraishi M. Differential epigenetic regulation of BDNF and NT-3 genes by tricostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine in Neuro-2^a cells. *Biochemical and Biophysical Communications* 2012, 394:173-177.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007, 4:693–705.
- Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A. Ageing fitness and neurocognitive function. *Nature* 1999, 400:418–419
- Kraniou Y, Cameron-Smith D, Misso M, Collier G, Hargreaves M. Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 2000, 88: 794–796.

- Lee IM, Paffenbarger RS. Jr. Physical activity and stroke incidence: the Harvard Alumni Health Study. *Stroke* 1998, 29:2049-54.
- Li J, Ding Y, Rafols JÁ, Lai Q, McAllister II JP, Ding Y. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neuroscience Letters* 2005,386:160-164.
- Lou SJ, Liu JY, Chang H, Chen PJ, Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. *BrainResearch* 2008, 1210:48–55.
- Lovatel G, Bertoldi k, Elsner VR, Vanzella C, Moysés FS, Spindler C, Funck VR, Pereira LM, Oliveira CV, Oliveira MS, Netto CA, Siqueira IR. Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory nacyclooxygenase pathway function. *Neurobiology of Learn and Memory* 2012, 98:182-187.
- Lund and Lohuizen, Lund A H, Lohuizen M V. Epigenetics and cancer. *Genes and Development* 2004, 18:2315-3.
- Mahabir S, Leitzmann MF, Pietinen P, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR. Physical activity and renal cell cancer risk in a cohort of male smokers. *International Journal of Cancer* 2004, 108:600-5.
- McCloskey DP, Adamo DS, Andersons BJ. Exercise increases metabolic capacity in the motor córtex and striatum, but not in the hippocampus. *Brain Research* 2001, 891:168-175.
- McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*2009, 587:5951-8
- Mcgee SL, Hargreaves M. Histone modifications and exercise adaptations. *Journal of Applied Physiology* 2011, 110: 258-263
- Miladi-Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y, Akhavan MM, Semnianian S, Safari M., Voluntary exercise ameliorates cognitive déficits in morphine dependente rats:

- The role of hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *Neurobiology of Learning and Memory* 2011, 98: 479-491.
- Mondon CE, Dolkas CB, Sims C, Reaven GM. Spontaneous running activity in male rats: effect of age. *J Appl Physiol* 1985, 58:1553-1985.
- Murrell A, Rakyan VK, Beck S. From genome to epigenome. *Human Molecular Genetics* 2005, 14 Spec 1:3-10.
- Narath E, Skalicky M, Viidik A. Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Experimental Gerontology* 2001,36:1699 –1711.
- Nóbrega ACL, Araújo CGS. Medicina do exercício: o que é ensinado nos cursos de graduação médica brasileiros. *Revista Brasileira Educação Médica* 1988, 12:69–72.
- Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, Radák Z. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochemistry International* 2005,46: 635–640.
- Patel AV, Press MF, Meeske K, Calle EE, Bernstein L Lifetime recreational exercise activity and risk of breast carcinoma in situ. *Cancer* 2003, 98:2161-9.
- Pietrelli P, López-Costa JJ, Goñi, López EM, Brusco A, Basso N. Effects of moderate and chronic exercise on the nitrenergic system and behavioral parameters in rats. *Brain Research* 2011, 1389:71-82.
- Pysh JJ, Weiss GM Exercise during development induces and increases in Purkinje cell dendritic tree size. *Science* 1979, 206:230-231
- Radák Z, Goto S, Tahara S, Kaneko T, Kumagai S, Berkes I, Ogonovszky H. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochemistry International* 2005, 46:635-

640.

Radák Z, Kaneco T, Tahara S, Nakato H, Pucsok J, Sasvári M, Nyakas C, Goto S, Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemistry International* 2001, 38:17–23.

Radák Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochemistry International* 2006,49:387-392.

Raglin JS Exercise and mental health.Beneficial and detrimental effects. *Sports Medicine*1990, 9:323-9.

Rodenhiser D, Mann M., Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications.*CAMJ* 2006, 174:341-48.

Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, Boutillier AL, Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO Journal* 2003, 22:6537–6549.

Russel JC, Epling WF, Perce D, Amy RM, Boer DP, Induction of voluntary prolonged running by rats. *Journal of Applied Physiology* 1987, 63:2549-2553.

Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW, Physical activity and antidepressant treatment potentate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. *Neuroscience* 2000, 101:305-312.

Ryu H, Lee J, Olofsson BA, Mwidau A, Dedeoglu A, Escudero M, Flemington E, Azizkhan-Clifford J, Ferrante RJ, Ratan RR, Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *Procedures of National Academy of Science USA* 2003, 100:4281–4286.

Saha RN, Pahan K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted

- acetylation homeostasis. *Cell Death & Differentiation* 2006, 13:539–550.
- Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Belló-Klein A, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Research Bulletin* 2006, 71:155–159.
- Selvi RB, Cassel JC, Kundu TK, Boutillier AL, Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010, 1799:840-53.
- Sibley BA, Beilock SL, Exercise and working memory: An individual differences investigation. *Journal of Sport Exercise & Psychology* 2007, 29:783-791
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM, Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 2001, 413:739–743.
- Strahl BD, Allis CD The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000, 403:41–45.
- Sugars KL, Rubinsztein DC Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genetics* 2000, 19:233-238.
- Takamatsu Y, Ishida A, Hamakawa M, Tamakoshi k, Jung C, Ishida K. Treadmill running improves motor function and alters dendritic morphology in the striatum after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Research* 2010, 1355:165-173.
- Tang WY, Ho S M Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2007, 8:173-82.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ Sustained

- hippocampal chromatin regulation in hippocampus in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nature Neurosciences* 2006, 9:519-525.
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH, Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosciences* 1999, 2:266–270.
- Van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH, Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *Journal of Neurosciences* 2005, 25:8680–5
- Wade PA, Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays* 2001, 23: 1131–1137.
- Waggoner D), Mechanisms of disease: epigenesis. *Seminars in Pediatric Neurology* 2007, 14:7-14
- Wang RY, Yang YR, Yu SM Protective effects of treadmill training on infarction in rats. *BrainResearch* 2001, 922:140–143.
- Wilmore JH, Costil DL, *Fisiologia do Esporte e do Exercício* 2001, 2^o edição, Editora Manole, São Paulo.
- Winter B, Breitenstein C, Mooren FC, Voelker K, Fobker M, Lechtermann A, Krueger K, Fromme A, Korsukewitz C, Floel A, Knecht S, High impact running improves learning. *Neurobiology of Learn and Memory* 2007, 4:597-609.
- Yoo CB, Jones PA, Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006, 5:37-50

