



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

WAGNER DE AGUIAR RAUPP

**HISTONA DESACETILASE 2 CORTICAL ESTÁ ASSOCIADA AO
DESEMPENHO EM PARADIGMA DE MEMÓRIA AVERSIVA NO
PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

Porto Alegre

2016

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

**HISTONA DESACETILASE 2 CORTICAL ESTÁ ASSOCIADA AO
DESEMPENHO EM PARADIGMA DE MEMÓRIA AVERSIVA NO
PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada no Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

WAGNER DE AGUIAR RAUPP

Orientadora: Prof^a Dr^a Ionara Rodrigues Siqueira

**Porto Alegre
2016**

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências!

O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e pelas oportunidades.

Aos meus pais Gilberto Raupp e Loenir Aguiar e meus irmãos Gilnei, Diziane, Jonas e Josué que além do carinho e grandes exemplos são apoiadores e estimuladores incondicionais.

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

À professora Dra. Ionara Rodrigues Siqueira pela oportunidade em seu laboratório, por suas orientações e paciência e por ter acreditado em mim.

Aos colegas do grupo de pesquisa que pelo convívio tornaram-se amigos e parceiros: Felipe, Carla, Louisiana, Laura, Kaki, Gi, Gisa, Bruna, Vivi, Amanda, Beta, Nati, Fernando, Fernanda e Silvia.

Aos professores que, além de mestres, tornaram-se amigos: Marcelo Grillo, Nei Marçal, Christiane Guilherme e Carlos Gilberto Santos.

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 amigos, familiares e colegas que direta ou indiretamente, participaram desta conquista. O meu eterno obrigado!

RESUMO

O envelhecimento da população mundial aumentou o interesse na busca pelos mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no processo do envelhecimento saudável e por estratégias preventivas e terapêuticas de doenças relacionadas à idade. O envelhecimento cerebral alterou a atividade global de histona desacetilases (HDAC), enzima envolvida nos níveis de acetilação de histonas, marca epigenética relacionada com a expressão gênica. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o protocolo de exercício físico diário em esteira reduziu a atividade global da HDAC no córtex frontal imediatamente e 1 hora após a última sessão de treino. Assim, é de interesse elucidar as isoformas de HDAC envolvidas no processo de envelhecimento e no efeito do exercício físico. O exercício físico voluntário aumenta os níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) por mecanismos epigenéticos, no entanto, o impacto do exercício forçado parece ser contraditório. Nossos objetivos foram avaliar os efeitos do envelhecimento e do exercício de corrida sobre os níveis de HDAC2 e de BDNF em córtex pré-frontal de ratos Wistar. Para isso, utilizamos ratos Wistar machos com 3 e 20 meses de idade. Os animais do grupo exercitado foram submetidos ao protocolo diário de exercício físico moderado em esteira por 14 dias. No 13º dia, os animais foram submetidos à tarefa da esQUIVA inibitória (treino) e, no 14º dia, 30 minutos após a última sessão de exercício físico, foi realizado o teste do paradigma da esQUIVA inibitória. Após 30 minutos do teste na esQUIVA inibitória (uma hora após a última sessão de exercício), os córtices foram obtidos para os ensaios bioquímicos. Os níveis da HDAC2 foram maiores em córtices de animais envelhecidos. Ainda, foi observada uma correlação negativa entre o conteúdo da HDAC2 e o desempenho no teste de memória aversiva (esQUIVA inibitória). O exercício físico em esteira não alterou os níveis de HDAC2 em nenhuma das idades testadas. O envelhecimento e o exercício físico em esteira não alteraram os níveis de BDNF. Nossos dados sugerem que os altos níveis de HDAC2 estão envolvidos com o pior desempenho de animais envelhecidos na memória aversiva e que esta isoenzima não está relacionada aos efeitos epigenéticos do exercício físico em córtex pré-frontal.

Palavras chave: HDAC2, BDNF, memória, envelhecimento, exercício físico.

ABSTRACT

Increasing attention has been paid to study the physiological and biochemical mechanisms of healthy aging process as well to seek therapeutic and protective strategies for age-related neurodegenerative diseases, since the aging population is growing. Epigenetic marks related to gene expression has been involved in aging brain process; increases in global histone desacetylase (HDAC) activity, enzyme involved with histone acetylation levels, has been found in aged brain areas. Our research group demonstrated that daily treadmill exercise protocol reduced global HDAC activity in frontal cortex immediately and 1hr after the last training session. The role of HDAC isoforms in aging process and exercise effects still needs to be elucidated. Taken that a specific HDAC isoform, HDAC2, has been involved with formation of hippocampus-dependent memory, the involvement of HDAC2 in aging process and exercise effects must be considered. Besides, it was described that voluntary exercise increases the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through epigenetic mechanisms; while the forced exercise effects on BDNF levels seem be contradictory. Our aim was to evaluate the aging and exercise effects on HDAC2 and BDNF levels in prefrontal cortices of Wistar rats. Young adult and age male Wistar rats were submitted to a daily moderate treadmill exercise protocol (20 min/day during 14 days). The rats were assigned to sedentary and exercise groups. Single-trial step-down inhibitory avoidance (IA) conditioning was employed as an aversive memory paradigm. In the training trial (IA), rats were placed on a platform and immediately after stepping down on the grid received a footshock prior to removal from the apparatus. The test trial took place 24 hours after the training trial. Prefrontal cortices were obtained thirty minutes after inhibitory avoidance test, what was 1 hour after the last training session of exercise. HDAC2 levels were increased in cortices of aged rats. Moreover, a negative correlation was observed between HDAC2 content and aversive memory performance evaluated by inhibitory avoidance. Treadmill exercise did not alter the HDAC2 levels in any evaluated age. Aging process and treadmill exercise were unable to alter BDNF levels. Our results suggest that the age-related memory impairment may be associated with the increased HDAC2 levels.

Keywords: HDAC2, memory, aging process, exercise, BDNF.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC – Sistema nervoso central

VO₂ máx – Consumo máximo de oxigênio

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

DNA – Ácido desoxirribonucléico

HAT – Histona Acetiltransferase

HDAC – Histona Desacetilase

H3K9 – Histona 3 Lisina 9

HMT – Histona Metiltransferase

HDM – Histona Desmetilase

DNMT – DNA Metiltransferases

H3K27 – Histona 3 Lisina 27

CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

EXE – Exercitado

SED – Sedentário

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

ANOVA - Análise de Variância

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da cromatina (A) e histonas (B)	11
Figura 2 - Modificações epigenéticas em histonas	12
Figura 3 - Enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC)	12
Figura 4 – Tabela de Classificação das HDACs – Imagem adaptada.....	13
Figura 5 – Imagem adaptada – Diferentes interações das HDACs 1 e 2	14
Figura 6: Esteira ergométrica adaptada.	23
Figura 7 – Efeito de protocolo de exercício diário no conteúdo da enzima HDAC2 em córtex pré-frontal de ratos Wistar. Os resultados foram expressos em porcentagem de controle como média \pm desvio padrão, onde # representa diferença significativa em relação aos grupos de 3 meses após a Análise de Variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey ($p < 0.05$).	27
Figura 8. Correlação dos níveis de HDAC2 em córtex de ratos Wistar com o tempo de descida em segundos no paradigma da esQUIVA inibitória. Teste de Pearson ($p = 0,002$).....	28
Figura 9. Conteúdo de BDNF em córtex pré-frontal de ratos Wistar de 3 e 20 meses. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA de duas vias.	29
Figura 10. Correlação dos níveis de BDNF em córtex pré-frontal de ratos Wistar de 3 e 20 meses com o tempo de descida em segundos no paradigma da esQUIVA inibitória. Correlação de Pearson.	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 ENVELHECIMENTO	10
1.2 EPIGENÉTICA	11
1.3. EPIGENÉTICA E ENVELHECIMENTO.....	15
1.4 EXERCÍCIO FÍSICO.....	16
1.5 EXERCÍCIO FÍSICO E EPIGENÉTICA	18
2 HIPÓTESE	21
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 ANIMAIS.....	22
4.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO	22
4.3 TESTE DE MEMÓRIA E APRENDIZADO.....	23
4.4 TESTES BIOQUÍMICOS	24
4.4.1 Preparação das amostras	24
4.4.2 Determinação dos níveis de HDAC2	25
4.4.3 Determinação dos níveis de BDNF	25
4.4.4 Dosagem de proteínas	25
4.4.5 Análise estatística	26
5 RESULTADOS	27
5.1 NÍVEIS DE HDAC2	27
5.2 CORRELAÇÃO DO DESEMPENHO NO PARADIGMA DA ESQUIVA INIBITÓRIA COM OS NÍVEIS DE HDAC2	28
5.3 NÍVEIS DE BDNF	29
5.4 CORRELAÇÃO DO DESEMPENHO NO TESTE DA ESQUIVA INIBITÓRIA COM OS NÍVEIS DE BDNF.....	30
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO

O perfil demográfico mundial tem sido alterado nas últimas décadas, sendo uma característica marcante desta alteração o acentuado envelhecimento da população (LIMA COSTA; VERAS, 2003). Em 2011, a Organização das Nações Unidas emitiu relatório sobre as perspectivas de vida e destacou que até 2020 o número de pessoas com mais de 65 anos será maior do que o de crianças com até 5 anos de idade (ORGANIZATION, 2011). Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) a população brasileira de idosos com idade igual ou superior a 60 anos corresponde a 11,8% da população geral e no Rio Grande do Sul cerca de 13,6% da população pertence a este grupo, sendo considerado o estado brasileiro com a maior população dentro desta faixa etária (Censo, 2010).

Os avanços da medicina, o amplo acesso a tecnologias e ao saneamento básico são alguns dos fatores que têm sido relacionados ao fenômeno do aumento da expectativa de vida (Lima-Costa e Veras, 2003; Silva e Boemer, 2009). Flatt (2012) define envelhecimento como um processo dinâmico e progressivo caracterizado pelo declínio das funções fisiológicas e bioquímicas que envolvem progressivamente a perda dos tecidos e a funcionalidade dos órgãos. O envelhecimento da população envolve o aumento da prevalência de doenças crônicas, como as dislipidemias, diabetes, hipertensão, osteoporose, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas sendo as duas últimas as principais causas de mortes nos países desenvolvidos (PHTLS, 2015). Ainda, há perda de capacidades cognitivas, de adaptação e o prejuízo das funções motoras são algumas das alterações observadas durante o processo de envelhecimento (MAHNCK et al., 2006; SOUZA et al., 2007; PARADIES et al., 2011; JURGENS, JOHNSON, 2012).

Dentre as alterações fisiológicas, Flatt (2012) destaca alterações nos sistemas imunológico e antioxidante, alterações na atividade microglial e na plasticidade neuronal.

1.2 EPIGENÉTICA

Diversos estudos têm demonstrado que o meio ambiente pode induzir modificações epigenéticas e conseqüentemente modular a expressão de genes específicos (ZHANG; MEANEY, 2010). Estas mudanças podem interferir no comportamento, nos processos fisiológicos e ainda no desenvolvimento de diversas doenças (FEINBERG, 2008; FOLEY et al., 2009; HANDEL et al., 2010). Vários fatores ambientais podem induzir modificações epigenéticas, sendo que os mais citados são dieta, poluição, fármacos e exercício físico (MULLER; PRADO, 2008).

Epigenética refere-se aos processos de alterações herdáveis na cromatina, que podem promover alterações na expressão gênica, sem que haja alteração na seqüência dos nucleotídeos (WAGGONER, 2007; GRAVINA; VIJG, 2010). A cromatina é formada, estruturalmente, por quatro pares de proteínas denominadas histonas (H2B, H4, H3 e H2A), as quais são envolvidas pela dupla fita de DNA (Figura 1).

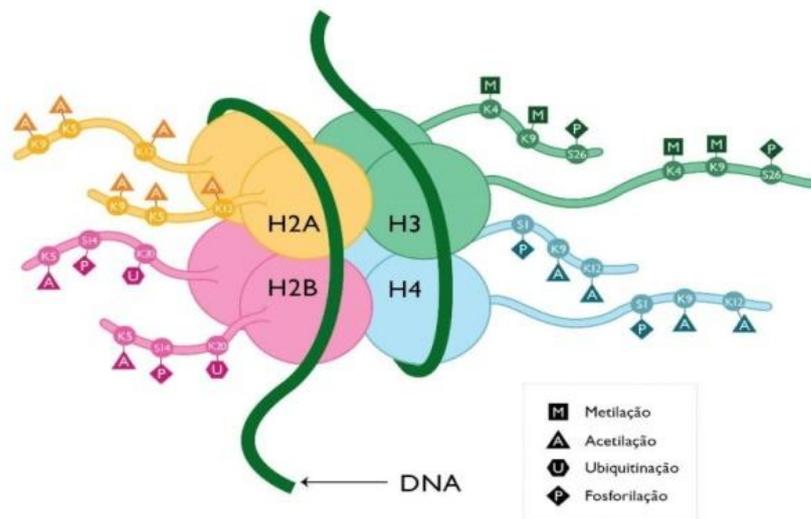


Figura 1 - Estrutura da cromatina (A) e histonas (B)

As principais alterações epigenéticas estão relacionadas com os processos de metilação do DNA e a acetilação, a fosforilação, a metilação e a ubiquitinação das histonas. A acetilação das histonas é um dos parâmetros epigenéticos mais estudados (STRAHL, ALLIS, 2000; MEHLER, 2008; Arrowsmith, BOUNTRA *Et Al.*, 2012), a qual ocorre em resíduos específicos, as lisinas (K) (Figura 2) (STRAHL; ALLIS, 2000; GRAFF; MANSUY, 2009; Liu, GROENC *et al.*, 2009). É relevante

destacar que as alterações na conformação das histonas podem alterar o estado de compactação do DNA, que por sua vez tem influência na atividade dos genes (KIEFER, 2007).

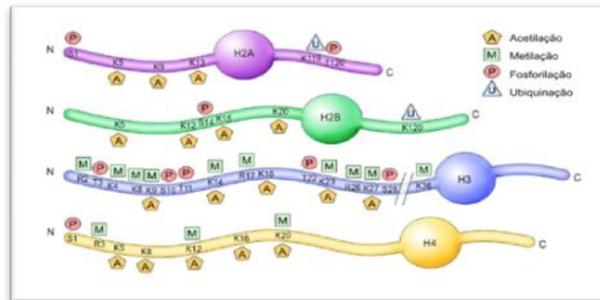


Figura 2 - Modificações epigenéticas em histonas
Fonte: Gräff e Mansuy (2008).

O processo de acetilação das histonas é controlado por dois grupos enzimáticos denominados como histona acetiltransferases (HATs) e histona desacetilases (HDACs) (YOO; JONES, 2006; ARROWSMITH; BOUNTRA *et al.*, 2012). HATs usam o acetil-CoA como doador de grupamento acetil para as histonas (STRAHL; ALLIS, 2000; GRÄFF; MANSUY, 2008). A acetilação atua neutralizando as cargas positivas das histonas, enfraquecendo desta forma as interações eletrostáticas da histona com o DNA, diminuindo a compactação da cromatina e assim, facilitando a transcrição gênica (YOO; JONES, 2006; ARROWSMITH; BOUNTRA *et al.*, 2012). As HDACs desacetilam estas lisinas ao remover o grupamento acetil, deixando a estrutura da cromatina mais compacta e desta forma, reprimem a transcrição gênica (Figura 3) (STRAHL; ALLIS, 2000; KIEFER, 2007).

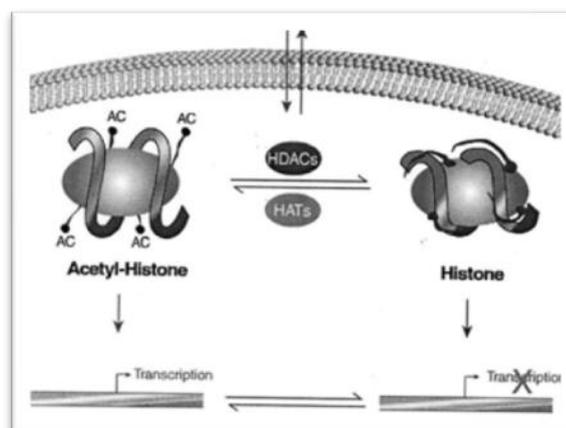


Figura 3 - Enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC)
Fonte: <http://www.dom.pitt.edu/paccm/faculty/zhou.html>

Há diferentes isoformas de HDACs descritas na literatura e estas são classificadas da seguinte forma: Classes I a IV (Figura 4). As HDACs pertencentes à Classe I são as HDACs 1, 2, 3 e 8, estas enzimas são relacionadas ao regulador transcricional RPD3 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As HDACs II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 e 10) possuem semelhança com a HDA1, uma desacetilase encontrada na levedura (BJERLING et al., 2002; FISCHLE et al., 2002; GAO LIN et al., 2002). E a Classe IV é representada pela isoforma HDAC11, que possui maior homologia com a Classe I (BROIDE et al., 2006; LAKSHMAIH et al., 2015). A Classe III é representada por 7 sirtuínas, que utilizam o NAD⁺ como cofator. (DELCUVE et al., 2012).

Atualmente, acredita-se que as HDACs da Classe I são expressas em todos os tipos celulares, enquanto que as HDACs de Classe II possuem um padrão de expressão mais restrito sugerindo que estas possam estar envolvidas nos processos de diferenciação celular e desenvolvimento (JOSEPH et al., 2000; SCOTT C. et al., 2002).

Group	Class	Name	Location in cell	Location in body
Classical (Zn dependent)	Class I (Rpd3)	HDAC1	Nucleus	Ubiquitous
		HDAC2		
		HDAC3		
		HDAC8		
	Class IIa (Hda1)	HDAC4	Nucleus/ cytoplasm	Tissue specific
		HDAC5		
		HDAC7		
	Class IIb (Hda1)	HDAC6	Cytoplasm	Tissue specific
		HDAC10		
	NAD dependent	Class IV (Rpd3/Hda1)	HDAC11	Nucleus/ cytoplasm
Class III		SIRT (1-7)	Nucleus/ cytoplasm	

HDAC=Histone deacetylase, NAD=Nicotinamide adenine dinucleotide, SIRT=Sirtuin

Figura 4 – Tabela de Classificação das HDACs – Imagem adaptada

Fonte: <http://www.cancerjournal.net> Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors

Diversos estudos têm buscado elucidar a expressão e distribuição das HDACs no SNC e alguns evidenciaram que a HDAC2 possui um nível de expressão maior em neurônios do que em células da glia, e a HDAC1 possui maior expressão em células gliais (MACDONALD, ROSKAMS, 2008; GUAN et al., 2009). Broide e colaboradores (2006) descreveram a distribuição das HDACs no cérebro de ratos e demonstraram que as HDAC1 e 2 possuem maior expressão no córtex do que em

outras regiões do cérebro. As HDAC1 e 2 podem formar homo ou heterodímeros, além de integrarem complexos proteicos responsáveis pela inibição da transcrição gênica (KELLY; COWLEY, 2013). A figura 5, imagem adaptada do trabalho de Delcuve e colaboradores 2012, mostra diferentes possibilidades de interação das HDACs 1 e 2 na constituição de complexos proteicos inibidores da transcrição gênica.

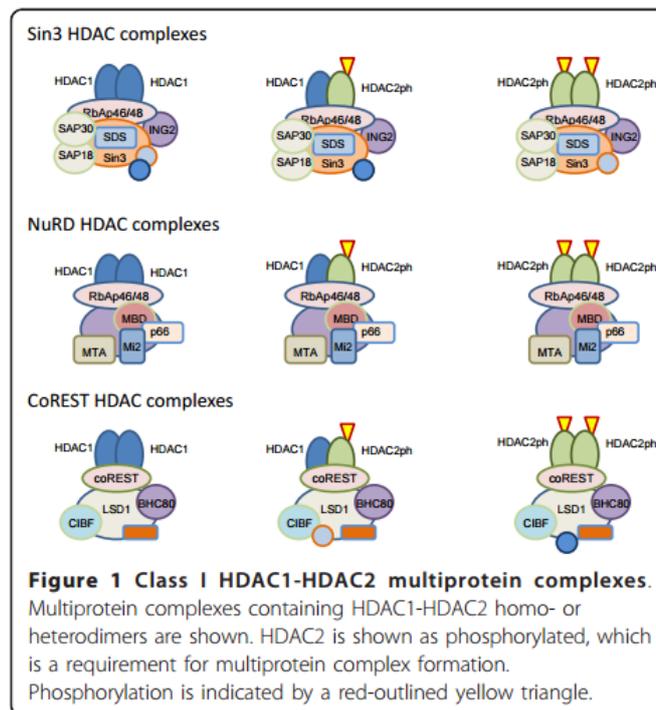


Figura 5 – Imagem adaptada – Diferentes interações das HDACs 1 e 2
 Fonte: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1868-7083-4-5>

A compreensão das diferentes isoformas de HDACs e a diversidade de possibilidades de interações é relevante pelo fato de presumir que estas enzimas podem atuar em conjunto ou separadamente uma da outra (BRUNMEIR, LAGGER, and SEISER, 2009; TAPLICK et al., 2001; LUO Y et al., 2009). É importante destacar que a formação do dímero pode estar associada à atividade da enzima e que a dissociação do dímero pode inibir a atividade da HDAC (LUO Y et al., 2009). Com base nas suas distribuições diferenciais no cérebro em estágios diferentes do desenvolvimento, sugere-se que as HDAC1 e HDAC2 tenham funções diferentes durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (McDONALD and ROSKAMS, 2008).

As HDACs 1, 2 e 3, pertencem à Classe I e apresentam um papel importante no contexto de formação da memória e do aprendizado (DELCUVE et al., 2012). A partir dos resultados descritos por Guan e colaboradores, de que a HDAC2 regula negativamente a plasticidade sináptica e a formação de memória (GUAN et al., 2009), diversos estudos investigaram o seu papel na memória e aprendizado.

Nosso grupo estuda o envolvimento das modificações epigenéticas no processo do envelhecimento saudável, assim como, no efeito protetor do exercício físico.

1.3. EPIGENÉTICA E ENVELHECIMENTO

As alterações epigenéticas parecem estar relacionadas ao processo de envelhecimento normal. Alguns autores sugerem que o envelhecimento pode modular a expressão de genes específicos por meio de modificações epigenéticas, podendo influenciar os processos fisiológicos e fisiopatológicos envolvidos no envelhecimento (WALKER et al., 2013; CHISTHOLM, SOHRABJI, 2016).

A perda do equilíbrio (HAT/HDAC) relacionada às doenças neurodegenerativas e ao envelhecimento normal, podendo ser um mecanismo decisivo nestes processos (SAHA, PAHAN, 2006).

Em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que o envelhecimento normal altera a atividade global da HDAC hipocampal e cortical de ratos Wistar (DOS SANTOS SANT'ANNA et al., 2013). Foi também observado que hipocampus de ratos de 20 meses de idade apresentaram diminuição dos níveis de metilação da histona H3-K9 (ELSNER, et al., 2013) e de acetilação global da histona H4 (LOVATEL, et al., 2013). As alterações na acetilação global da histona H4 em hipocampo de animais de 20 meses de idade, demonstrando um perfil de hipoacetilação desta histona, podem estar relacionadas a maior atividade global de HDAC. No entanto, a isoforma de HDAC envolvida ainda não foi elucidada, sendo objeto de estudo deste trabalho.

Ainda a susceptibilidade às doenças neurodegenerativas no envelhecimento pode estar vinculada a outras alterações epigenéticas em diferentes estruturas cerebrais. Kuzumaki e colaboradores (2010) demonstraram que a metilação de histonas podem estar envolvidas no processo de envelhecimento por meio da regulação da expressão de genes. Outros autores têm descrito que a metilação da

lisina 27 na histona 3 (H3K27), podendo ser mono, di ou tri-metilação, é considerada um marcador de repressão da transcrição gênica, sendo esta modificação catalisada pelas histona metiltransferases, as HMTs (DELCUVE et al., 2012; LUI et al., 2014; MOZZETTA et al., 2015). O envolvimento da metilação de histonas foi descrito em alguns processos patológicos destacando entre eles o câncer (BRACKEN et al., 2003; WEI et al., 2011; LI et al., 2013), a metilação da H3K27 também foi descrita como importante na evolução do processo de envelhecimento. Um estudo recente demonstrou que o silenciamento gênico durante o envelhecimento pode estar associado ao estado de hipermetilação da H3K27me3 em cérebro de camundongos envelhecidos (WANG et al., 2010). Contudo há trabalhos que descrevem a importância das HMTs nos mais diversos processos biológicos e mecanismos regulatórios. Sugerindo que um desequilíbrio entre as proteínas desmetiladoras e os complexos metiladores podem estar associados a desordens neurológicas (LI et al., 2013; MOZZETA et al., 2015). Podemos ainda destacar que as DNMTs também podem estar envolvidas nos mecanismos de envelhecimento. Lopatina e colaboradores (2002) descreveram uma diminuição na atividade da DNMT1 em fibroblastos humanos senescentes o que sugere que alterações na metilação do DNA no decorrer do processo de envelhecimento podem estar associadas ao conteúdo e atividades destas enzimas. Recentemente, demonstramos que o envelhecimento normal não altera os níveis da histona metiltransferases, especificamente da as HMTs H3K27) e das DNA metiltransferases (DNMT1 and DNMT3b) em córtex pré-frontal de ratos Wistar (CECHINEL et al., 2016)

Por fim é relevante destacar que alguns pesquisadores defendem a hipótese do emprego de agentes capazes de promover alterações no perfil epigenético a fim de reduzir (ou minimizar) os déficits cognitivos relacionados à idade.

1.4 EXERCÍCIO FÍSICO

A prática do exercício físico é relacionada à redução no número de doenças físicas e mentais, trazendo benefícios à saúde e qualidade de vida ao indivíduo (GUINEY; MACHADO, 2013; YAMAZAKI et al., 2013).

O exercício pode ser classificado de acordo com a sua intensidade em leve, moderado e intenso, sendo essa classificação determinada pelo VO_2 máx, definida como a capacidade máxima que o indivíduo tem em captar e utilizar o oxigênio

inspirado para gerar trabalho (KASCH et al., 1976). O exercício leve corresponde em torno de 20 e 50% do VO_2 máx, o exercício moderado de 50-70% do VO_2 máx e o exercício intenso acima de 80% do VO_2 máx (DRUMMOND et al., 2005). Outra classificação do exercício é quanto à motivação, podendo ser voluntário ou forçado. Nos protocolos voluntários em modelos de laboratório, os animais têm acesso à roda de corrida de livre acesso durante um determinado período, no entanto, o controle de intensidade, duração e frequência, fica impreciso pelo componente volitivo do animal (KENNARD; WOODRUFF-PAK, 2012; MONDON et al., 1985). Assim, os protocolos forçados usam a corrida em esteira e o nado forçado, que permitem um melhor controle das variáveis estudadas (KE et al., 2011; RADAK et al., 2001).

Há diversos trabalhos que evidenciam os efeitos de diferentes protocolos de exercício no sistema nervoso central (SNC). Vários mecanismos envolvidos com a melhora das funções do sistema nervoso central foram sugeridos, como uma melhor integridade cerebrovascular pelo aumento da rede capilar, de conexões sinápticas, os níveis de fatores neurotróficos (COTMAN; BERCHTOLD, 2002; RADAK et al., 2001; VIVAR et al., 2012).

Entre os efeitos benéficos do exercício ao SNC, destaca-se a melhora das funções cognitivas em especial da memória e aprendizado. Em humanos, o exercício melhorou aspectos da função executiva e reduziu as perdas relacionadas à idade de tecido encefálico em regiões envolvidas com função visuoespacial, ao controle motor e memória de trabalho e melhorou o controle motor em adultos (TSENG et al., 2013). Roig et al (2013), em metanálise, demonstraram que o exercício é capaz de melhorar a memória em humanos saudáveis. Alguns estudos demonstraram a redução no risco de demência em idosos submetidos a protocolos de exercício durante a meia idade (ANDEL et al., 2008; GEDA et al., 2010).

Em estudos pré-clínicos, diferentes protocolos de exercício, melhoraram o desempenho em testes de memória. Estudos demonstraram que o exercício físico voluntário ou forçado induziu melhora da memória espacial, observada no teste do labirinto aquático. Esse achado foi relacionado a um aumento nos níveis de BDNF em estruturas encefálicas de ratos Wistar jovens (BERCHTOLD et al., 2005; BERCHTOLD et al., 2010; ALOMARI et al., 2013). Radak e colaboradores (2001) observaram que a natação melhora a memória aversiva, evidenciada através do teste da esQUIVA inibitória associada à atenuação do dano oxidativo.

Além disso, estudos em animais de laboratório investigando os efeitos do exercício envolvendo o processo do envelhecimento também têm sido conduzidos. Neste contexto, Aguiar-Jr e colaboradores (2011) demonstraram que exercício de corrida em esteira melhorou a memória espacial. Estes autores sugerem que esta melhora está associada ao aumento dos níveis de BDNF induzidos por meio da ativação da proteína serina-treonina quinase (AKT) e do elemento de resposta ao monofosfato cíclico de adenosina (CREB), em hipocampo de ratos Wistar. No entanto, os mecanismos de ação envolvidos nesses efeitos benéficos não estão totalmente esclarecidos. Estes resultados apoiam a idéia de que o exercício pode melhorar a memória, no entanto ainda não estão totalmente elucidados os mecanismos de ação envolvidos nesse processo, bem como o papel das diferentes estruturas encefálicas envolvidas. Estudos recentes têm demonstrado o papel de mecanismos epigenéticos sobre os efeitos benéficos do exercício físico (ERICKSON et al., 2012; GOMEZ-PINILLA et al., 2011).

1.5 EXERCÍCIO FÍSICO E EPIGENÉTICA

Considerando que o exercício é proposto como estratégia terapêutica ou preventiva para atenuar os sintomas relacionados ao envelhecimento, nosso grupo de pesquisa estuda os efeitos do exercício físico sobre parâmetros funcionais, especificamente memória aversiva, e busca os mecanismos de ação, como as marcas epigenéticas em diferentes estruturas cerebrais de ratos Wistar. O exercício altera a atividade da HATs e HDACs em hipocampus de ratos Wistar adultos exercitados (ELSNER et al., 2011). O protocolo de sessão única diminuiu a atividade global da HDAC e aumentou a atividade da HAT na histona H4 aumentando, dessa forma alterou a relação HAT/HDAC, sugerindo um estado de hiperacetilação de histonas (ELSNER et al., 2011). Ainda, o protocolo de exercício diário moderado (duas semanas) promoveu o aumento da atividade da HAT na histona H4 no grupo de animais exercitados quando comparado com o grupo de animais sedentários, fato que pode indicar um aumento da acetilação, porém não houve alteração da atividade da HDAC (ELSNER et al., 2011). Lovatell e colaboradores (2013) demonstraram que o protocolo de exercício diário alterou os parâmetros epigenéticos estudados somente no envelhecimento e descreveram

aumento nos níveis de acetilação da histona H4 em hipocampo de ratos envelhecidos.

Outro estudo de nosso grupo avaliou o córtex pré-frontal e demonstrou que a sessão única de exercício promoveu o aumento da atividade da HAT, enquanto que o protocolo de exercício moderado diário reduziu a atividade global da HDAC no córtex pré-frontal de ratos adultos (CECHINEL et al., 2016). Estes achados sugerem que diferentes protocolos podem impactar de forma distinta em diferentes regiões do cérebro e que os impactos epigenéticos podem ser estrutura-dependentes. Outro estudo avaliou as atividades globais das HAT e HDAC em córtex pré-frontal de animais não submetidos ao paradigma de memória (SPINDLER et al., 2014), não sendo possível correlacionar com a função cognitiva. Assim, é de interesse correlacionar as modificações epigenéticas corticais e o desempenho na memória aversiva, proposto no presente trabalho.

Ainda, é interessante investigar quais isoformas de HDACs são alteradas pelo exercício, visto que possuem diferentes funções. Como descrito acima, as HDACs 1, 2 e 3, que pertencem à Classe I, estão envolvidas com memória e aprendizado (DELCUVE et al., 2012).

Outro mecanismo epigenético associado ao exercício físico é a metilação do DNA, especificamente os níveis das DNMTs. A sessão única de exercício reduziu o conteúdo hipocampal das enzimas DNMT1 e DNMT3b em animais adultos no entanto não se observou modificação nos níveis pelo protocolo diário (ELSNER et al., 2013). Cechinel e colaboradores (2016) demonstraram um efeito idade-dependente do exercício físico em córtex pré-frontal, uma vez que a sessão única de exercício aumentou os níveis da DNMT3b somente em animais envelhecidos. Ainda, o exercício diário em esteira aumentou os níveis da acetilação na histona H4 em córtices pré-frontais de animais envelhecidos (21 meses de idade), sem qualquer efeito significativo em animais jovens.

Um estudo recente demonstrou que a natação por 4 semanas reverteu parcialmente a redução da metilação global desencadeada pelo isolamento social em um modelo de estresse (RODRIGUES et al., 2015). É relevante relatar que em humanos, foi observada uma maior metilação periférica de DNA nos indivíduos que praticavam 30 minutos diários de atividade física, quando comparados aos que realizavam menos de 10 minutos (ZHANG et al., 2011; HORSBURGH et al., 2015)

Além de modificações epigenéticas, outros mecanismos podem estar envolvidos no efeito neuroprotetor do exercício físico, dentre estes podemos destacar o Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF). Diversos estudos demonstraram a importância desta neurotrofina nos processos de regulação sináptica e plasticidade neuronal (COSTA et al., 2015). O exercício físico diário moderado em esteira pode promover o aumento na expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), importante no processo de diferenciação e sobrevivência neuronal (ISHIMARU, 2010; SOYA, 2007 e HOPKINS et al., 2011). Russo-Neustadt e colaboradores (2000) demonstraram que, mesmo um curto período de treinamento, pode aumentar a expressão do BDNF. Miladi-Gorjiet e colaboradores (2011) demonstraram que a administração de um inibidor do BDNF reduziu significativamente a melhora de parâmetros de memória espacial induzido por um protocolo de exercício voluntário. Vários autores sugerem que o BDNF está envolvido aos efeitos positivos do exercício voluntário sobre os parâmetros de memória. É importante destacar que a expressão gênica do BDNF pode ser modificada por alterações epigenéticas (SWEATT, 2011).

Gomez Pinilla e colaboradores (2011) descreveram que o exercício físico voluntário aumentou a acetilação da histona H3 na região IV do promotor do gene do BDNF com concomitante aumento da sua expressão. Estes autores relacionaram o aumento dos níveis de BDNF hipocampal e sua regulação epigenética com o efeito funcional do exercício.

Silva e colaboradores (2016) demonstraram que o exercício no período gestacional aumentou os níveis de BDNF hipocampal na vida adulta da prole, mostrando um efeito a longo prazo da exposição materna. Contudo estes efeitos não foram observados no córtex o que sugere que regiões distintas do cérebro respondem de forma diferente e por vias diferentes ao exercício físico.

Outro fator interessante é que a maioria dos estudos com BDNF são conduzidos com processos fisiopatológicos relacionados à idade, e estudos com envelhecimento normal são escassos até o momento, assim como o impacto do exercício físico neste processo.

2 HIPÓTESE

Considerando o papel da HDAC2 e do BDNF no processo de memória e aprendizado, nossa hipótese central de trabalho é que o envelhecimento aumente os níveis de HDAC2, e o protocolo de exercício de corrida em esteira (20 min, diário por duas semanas) reduza os níveis desta enzima em córtex pré-frontal de ratos Wistar, impactando nos níveis de BDNF em córtex pré-frontal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o efeito do envelhecimento e do exercício sobre marcadores bioquímicos envolvidos nos processos de memória no córtex pré-frontal de ratos Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do envelhecimento sobre os níveis de HDAC2 em córtex pré-frontal de ratos Wistar.
- Analisar o efeito do envelhecimento sobre os níveis de BDNF em córtex pré-frontal de ratos Wistar.
- Avaliar o efeito do exercício de corrida sobre os níveis de HDAC2 em córtex pré-frontal de ratos Wistar de 3 e 20 meses de idade.
- Estudar o impacto do exercício de corrida sobre os níveis de BDNF em córtex pré-frontal de ratos Wistar de 3 e 20 meses de idade.
- Correlacionar os resultados bioquímicos em córtex pré-frontal com o desempenho dos animais no teste comportamental memória aversiva utilizando o teste da esQUIVA inibitória, publicado previamente por Lovatel e colaboradores (2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Este trabalho está aninhado ao projeto de pesquisa guarda-chuva “EFEITOS FUNCIONAIS DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO NO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO: BUSCA DO MECANISMO DE AÇÃO”, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS) sob o número de protocolo: 29818.

Cabe descrever que os dados bioquímicos obtidos com hipocampus, além do desempenho no paradigma da esQUIVA inibitória, destes animais já foram publicados (LOVATEL et al., 2012) e o presente trabalho avaliou os parâmetros epigenéticos em outra estrutura encefálica, o córtex pré-frontal. Utilizamos as amostras armazenadas no intuito de reduzir o número de animais utilizados pelo grupo de pesquisa, e assim minimizar o sofrimento e de atender ao princípio dos 3Rs (Reduction/Redução; Replacement/Substituição; Refinement/Refinamento), especificados na “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos” do CONCEA (DBCA/2013).

Foram utilizados ratos machos Wistar com idade de 3 e 20 meses. Os animais foram mantidos sob condições padrões de biotério e segurança (12-h claro/escuro, 22°C ± 2°C) com dieta e água *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e permaneceram em grupos de no máximo 4, em caixas de Plexiglass forradas com maravalha.

Os procedimentos propostos obedeceram a normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978), pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS), pelos Procedimentos para o Uso Científico de Animais conforme a Lei 11.794 (8 de outubro de 2008) e as Diretrizes do CONCEA. Todas as medidas necessárias a fim de minimizar o número e o sofrimento dos animais foram tomadas. Foram aplicadas as Normas de Segurança e Procedimentos de boas práticas de laboratório. Todas as medidas de proteção aos professores pesquisadores e bolsistas foram

asseguradas. Para manipulação dos animais, o uso de luvas de látex e de jalecos limpos foi obrigatório; a execução dos ensaios foi sempre em grupo.

4.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO

O protocolo de exercício físico consistiu em corrida em esteira ergométrica adaptada para roedores, com pistas de Plexiglass individuais (AVS Projeto, São Paulo, Brasil). Para determinar a velocidade de corrida, foi utilizada a medida de consumo máximo de oxigênio indireto (VO_2 máx) recomendada por Brooks e White . Nesta medida os animais foram submetidos à corrida em esteira com velocidade progressiva (5 m/min a cada 3 min) até atingirem a exaustão. O tempo de fadiga (em minutos) e a velocidade máxima (em m/min) foram tomados como índice da capacidade de exercício e usados para a mensuração de VO_2 máx indireto.

Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos exercitados (EXE) e grupos sedentários (SED). Os animais do grupo EXE foram submetidos à corrida na esteira durante 20 minutos, diariamente, por duas semanas a uma intensidade de 60% do VO_2 máx entre às 14 e 17h, (Lovatel et al., 2013). Os animais SED foram colocados na esteira desligada por 5 minutos, sendo desta forma, manipulados exatamente como os animais do grupo EXE.



Figura 6: Esteira ergométrica adaptada.
Fonte: Imagem adaptada de Spindler (2012).

4.3 TESTE DE MEMÓRIA E APRENDIZADO

Cabe descrever que os dados comportamentais *já* foram publicados (LOVATEL et al., 2013), e o presente trabalho usou estes dados unicamente para correlacionar com os níveis de marcadores epigenéticos em córtex pré-frontal. Obviamente, como previamente apresentados na Tese de Gisele Lovatel (PPG Neurociências) e no referido artigo, não serão demonstrados na presente dissertação.

Para avaliar a memória aversiva de longa duração, foi utilizado o paradigma da esQUIVA INIBITÓRIA. Todos os animais foram submetidos ao teste da esQUIVA INIBITÓRIA. O teste consiste de duas sessões, sendo elas treino e teste. O aparato da esQUIVA INIBITÓRIA consiste de uma caixa de acrílico de 50x25x25 cm com uma grade de barras de aço paralelas de 1 mm de diâmetro contendo uma plataforma (com altura de 7 cm). Na sessão treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo de latência de descida da plataforma em direção a barra metálica foi mensurado em segundos. Ao descer, os animais receberam um choque de 0,6 mA por 3 segundos. Desta forma, os animais associaram a descida da plataforma ao choque (estímulo aversivo). A sessão teste foi realizada 24h após o treino e consistiu em mensurar a latência de descida da plataforma sem a aplicação do choque. Foi considerado um tempo máximo de 180 segundos para a descida dos animais (LOVATEL et al., 2013).

4.4 TESTES BIOQUÍMICOS

4.4.1 Preparação das amostras

Os animais foram decapitados em guilhotina adaptada para roedores (Insight®) sem anestesia prévia, uma vez que os anestésicos alteram a função cerebral (ELSNER *ET AL.*, 2011; GOMEZ-PINILLA, ZHUANG *et al.*, 2011), contudo todos os cuidados foram tomados para minimizar a dor e o sofrimento dos animais.

O encéfalo foi removido, e as estruturas encefálicas, hipocampo e córtex pré-frontal, foram rapidamente dissecados, congeladas em N2 líquido e armazenadas a -80°C até a realização dos ensaios bioquímicos.

Como descrito acima, neste trabalho foram utilizados os córtices pré-frontais. Para realização dos ensaios bioquímicos, as amostras foram divididas, uma vez que os procedimentos de preparação para análise dos níveis de HDAC2 e de BDNF são diferentes. Para avaliar os níveis de HDAC2, a amostra foi homogeneizada em 1: 3 volumes de tampão de lise gelado contendo: sacarose 250 mM; Tris-HCl 20; pH 7,4; ácido etilenodiaminotetracético 1 mM, ácido etileno-glicol-tetraacético 1 mM, cloreto de potássio 10 mM; ditioneitol 1 mM ; fluoreto de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM, ácido ocaidaico 0,001 mM. Os lisados foram submetidos à centrifugação (16000 x g durante 5 min a 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado (Sant'Anna et al., 2013).

Para o ensaio dos níveis de BDNF, a amostra foi homogeneizada em 1:10 volumes de tampão gelado contendo: 100 mM Tris / HCl, pH 7, contendo 2% de albumina de soro bovino (BSA), 1 M de NaCl, 4 mM de EDTA.Na₂, 2% de Triton X-100, 0,1% de azida de sódio e os inibidores de protease (Sigma) 5 ug / ml de aprotinina, 0,5 ug / mL de antipaina, 157 ug / mL de benzamidina, 0,1 ug / ml de pepstatina a fluoreto e 17 ug / mL de fenilmetil-sulfonilo. Os homogeneizados foram centrifugados a 14.000 x g durante 30 minutos e os sobrenadantes resultantes foram usadas.

4.4.2 Determinação dos níveis de HDAC2

Os níveis da enzima HDAC2 foram determinados por meio de kit-ELISA disponível comercialmente Epigentek, EpiQuik™ HDAC2 Assay Kit (colorimetric) Base Catalog #P-4006, de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.3 Determinação dos níveis de BDNF

A determinação dos níveis de BDNF foi realizada por meio de kit-ELISA disponível comercialmente MILIPORE ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA Kit Cat. No. CYT306, de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.4 Dosagem de proteínas

A concentração de proteína para cada amostra foi determinada pelo método descrito por Bradford (BRADFORD, 1976), usando albumina bovina como padrão.

4.4.5 Análise estatística

Ao final dos experimentos, os dados coletados foram organizados e armazenados em uma planilha eletrônica de dados (Microsoft Excel®). A normalidade dos dados foi confirmada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias através do teste de Levine. O teste de Variância (ANOVA) de duas vias foi utilizado considerando como fator a idade e o exercício. Nos casos onde houve uma interação idade x exercício, as diferenças entre grupos foram estabelecidas por meio do teste comparações múltiplas Tukey. O teste de correlação de Pearson foi usado para avaliar as associações entre o teste comportamental e os marcadores bioquímicos (BDNF e HDAC2). A significância aceita foi $P \leq 0.05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 NÍVEIS DE HDAC2

Foi possível observar um aumento nos níveis da enzima HDAC2 no córtex pré-frontal dos animais envelhecidos ($F(1,28) = 7.11$; $p = 0.013$) (Figura 7). O protocolo de exercício físico moderado diário não foi capaz de modular os níveis da HDAC2 nesses animais.

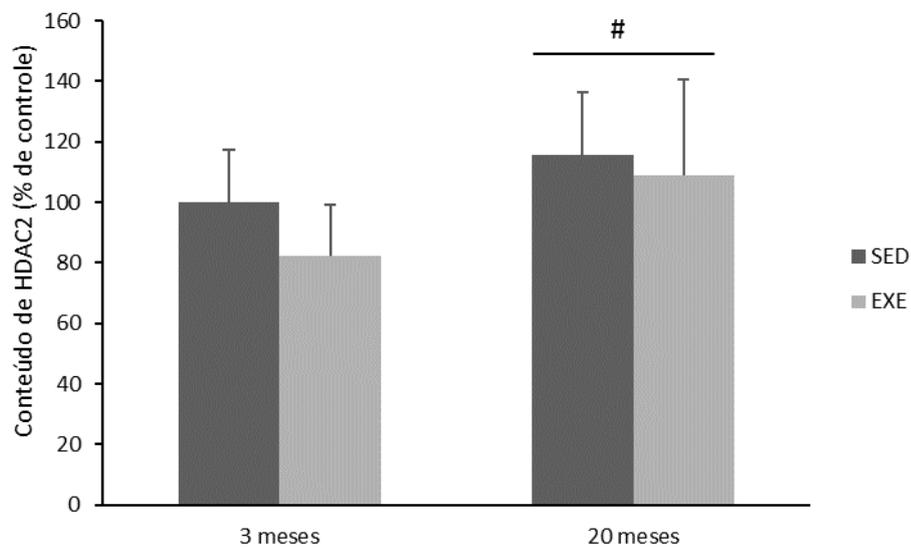


Figura 7 – Efeito de protocolo de exercício diário no conteúdo da enzima HDAC2 em córtex pré-frontal de ratos Wistar. Os resultados foram expressos em porcentagem de controle como média \pm desvio padrão, onde # representa diferença significativa em relação aos grupos de 3 meses após a Análise de Variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey ($p < 0.05$; $n = 6-8$ animais por grupo).

5.2 CORRELAÇÃO DO DESEMPENHO NO PARADIGMA DA ESQUIVA INIBITÓRIA COM OS NÍVEIS DE HDAC2

Considerando dados de memória aversiva publicados anteriormente por Lovatel et al. (2013) e os bioquímicos com amostras de córtex pré-frontal destes animais (acima descritos), foi realizado o teste de correlação de Pearson. Houve uma correlação negativa entre o conteúdo da HDAC2 e o tempo de latência para descida em segundos ($R=-0,561$; $p=0,002$) (Figura 8). Assim, altos níveis de HDAC2 representaram piores desempenhos (menor latência) no teste de memória.

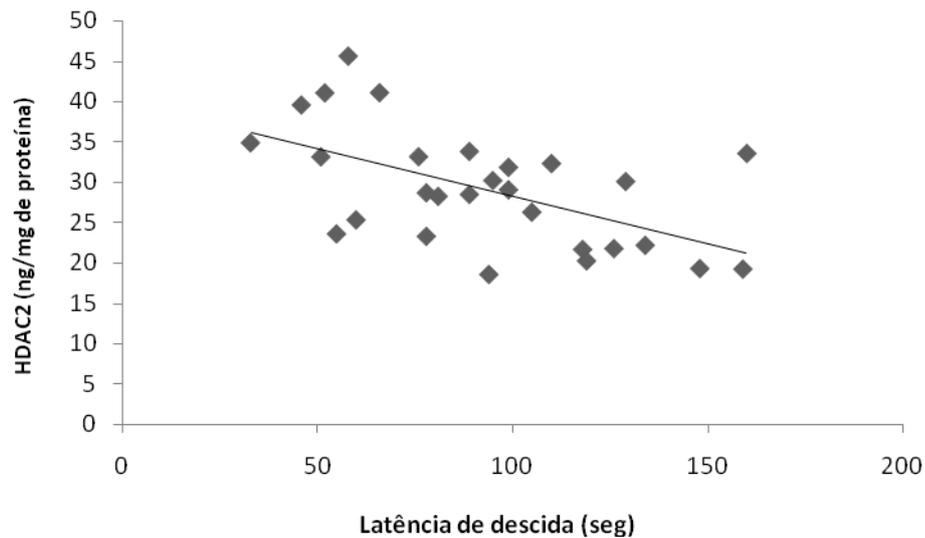


Figura 8. Correlação dos níveis de HDAC2 em córtex de ratos Wistar com o tempo de descida em segundos no paradigma da esQUIVA inibitória. Teste de Pearson ($p=0,002$; $n= 6-8$ animais por grupo).

5.3 NÍVEIS DE BDNF

O protocolo de exercício diário moderado e o envelhecimento não foram capazes de alterar de maneira estatisticamente significativa os níveis de BDNF em córtex pré-frontal de ratos Wistar (Figura 9).

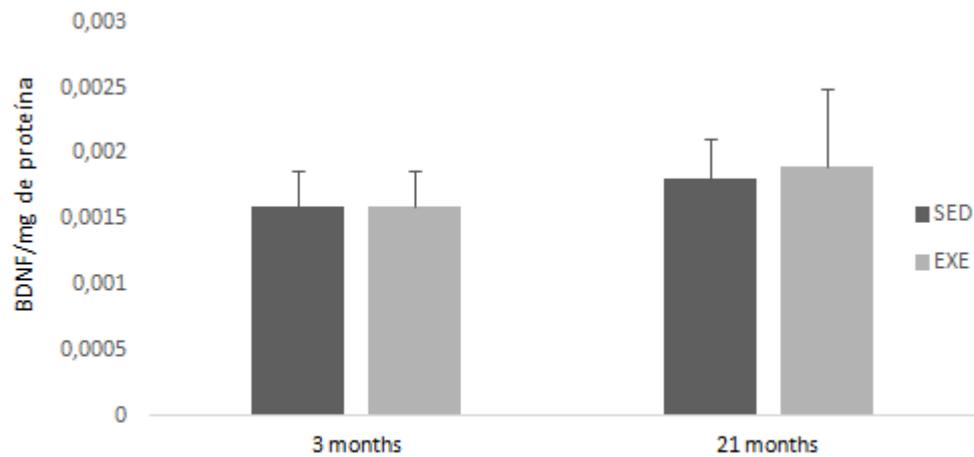


Figura 9. Conteúdo de BDNF em córtex pré-frontal de ratos Wistar de 3 e 20 meses. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA de duas vias. ($p > 0,05$; $n = 6-8$ animais por grupo)

5.4 CORRELAÇÃO DO DESEMPENHO NO TESTE DA ESQUIVA INIBITÓRIA COM OS NÍVEIS DE BDNF.

Considerando dados de memória aversiva publicados anteriormente por Lovatel et al. (2013) e os bioquímicos com amostras de córtex pré-frontal destes animais (acima descritos), foi realizado o teste de correlação de Pearson. Não houve uma correlação significativa entre o conteúdo da BDNF e o tempo de latência para descida em segundos ($R=-0,310$; $p=0,116$) (Figura 10).

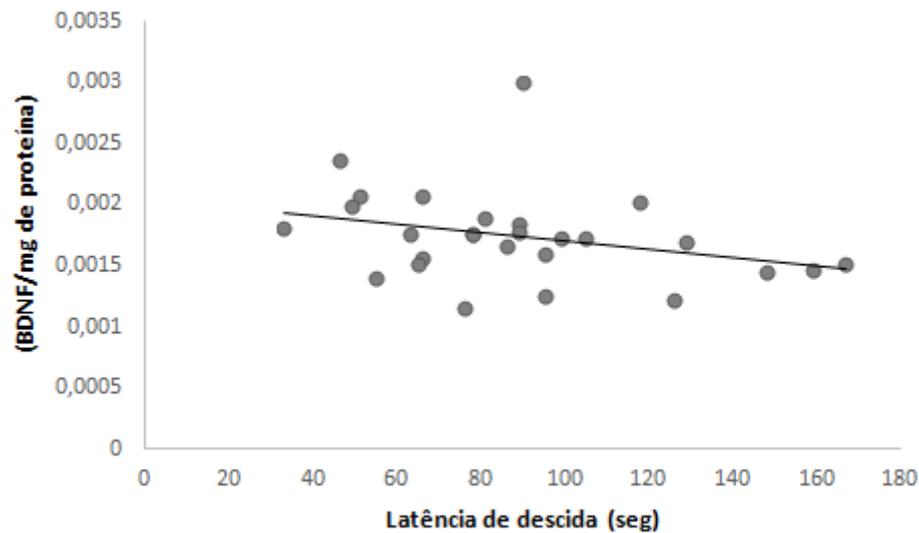


Figura 10. Correlação dos níveis de BDNF em córtex pré-frontal de ratos Wistar de 3 e 20 meses com o tempo de descida em segundos no paradigma da esQUIVA INIBITÓRIA. Teste de Correlação de Pearson ($p=0,116$; $n= 6-8$ animais por grupo).

6 DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação corroboram a hipótese de que o processo de envelhecimento aumenta os níveis da HDAC2 e impacta negativamente no desempenho de ratos no paradigma de memória. Nosso grupo de pesquisa investiga o papel de marcadores epigenéticos no processo de envelhecimento, sem patologias associadas, o envelhecimento saudável.

Os córtices pré-frontais de animais envelhecidos apresentaram níveis mais elevados de HDAC2 do que os animais do grupo jovem. Além disso, evidenciamos um prejuízo na memória de longo prazo associado aos níveis de HDAC2, uma vez que observamos uma correlação negativa entre os níveis desta enzima e a latência no teste de esQUIVA inibitória. O aumento do conhecimento sobre as enzimas HDACs no encéfalo é de extrema relevância tendo em vista a possibilidade de novas estratégias de intervenções terapêuticas de doenças associadas à memória e ao envelhecimento.

É importante destacar que os dados comportamentais anteriormente publicados demonstram que os ratos envelhecidos apresentam um pior desempenho na tarefa de esQUIVA inibitória (LOVATEL et al., 2012). O presente trabalho demonstrou uma correlação negativa entre os níveis de marcadores epigenéticos, especificamente os níveis da enzima HDAC2 em córtex pré-frontal, e o desempenho dos animais no teste de memória aversiva.

Um estudo recente realizado por Guan e colaboradores (2009) demonstrou que a HDAC2 está envolvida em processos de plasticidade sináptica e de formação de memórias. Este estudo relatou que a HDAC2 regula negativamente a formação de memória e a plasticidade neuronal e que camundongos com deficiência da HDAC2 apresentam um melhor desempenho cognitivo. Alguns autores sugerem que a HDAC2 pode afetar a transmissão sináptica e está envolvida na maquinaria molecular que regula a diferenciação e integração de neurônios (AKHTAR et al., 2009; MONTGOMERY et al., 2009). A HDAC2 pode inibir processos cognitivos controlando a plasticidade neural estrutural e funcional (GRÄFF et al., 2014).

Nossos resultados demonstram que os altos níveis corticais de HDAC2 em animais envelhecidos podem estar relacionados ao prejuízo de memória apresentado por estes animais, cujos dados foram publicados em trabalho prévio do

nosso grupo de pesquisa (LOVATEL et al 2012). A hipótese de que as HDACs possuem um papel central no desempenho em paradigmas de memória durante o envelhecimento é corroborada por um estudo que demonstrou que a administração sistêmica do inibidor de HDAC, butirato de sódio, imediatamente após o treino, na esQUIVA inibitória melhorou a consolidação de memória de ratos envelhecidos, sem afetar o desempenho de ratos adultos jovens (BLANK et al., 2015).

É relevante descrever que o hipocampo e a amígdala estão relacionados com a formação da memória, enquanto que, o córtex pré-frontal parece estar envolvido com a consolidação de vários tipos de memória. Por exemplo, a consolidação da memória no teste de condicionamento do medo contextual, e ainda a interferência sobre a plasticidade cortical, após o treino na esQUIVA inibitória, induziu prejuízos de memória (ZHAO et al., 2005; EUSTON et al., 2012). Considerando que Canto-de-Souza e Mattioli (2016) demonstraram que a consolidação da memória aversiva depende de síntese proteica no córtex pré-frontal e não no hipocampo e amígdala, e que as modificações epigenéticas controlam a expressão gênica, podemos sugerir que alterações epigenéticas, como as dos níveis de HDAC2 observadas nos animais envelhecidos, impactem na síntese proteica e conseqüentemente na consolidação da memória (Canto-de-Souza e Mattioli, 2016).

Diversos pesquisadores relataram que o envelhecimento pode provocar alterações epigenéticas e a conseqüente alteração na expressão gênica, influenciar em processos fisiológicos e/ou fisiopatológicos (WALKER et al., 2013; CHISHOLM e SOHRABJ, 2016). Cancela (2007) descreve que devido ao processo de envelhecimento, são desencadeados processos degenerativos em certas regiões do encéfalo, sendo o córtex pré-frontal especialmente afetado.

Estudos desta natureza podem direcionar estratégias farmacológicas, uma vez inibidores de HDACs são propostos como uma nova alternativa preventiva e/ou terapêutica de diversas patologias incluindo algumas associadas ao envelhecimento como a doença de Parkinson e os AVCs (RYU et al., 2003; GUAN et al., 2009; DELCUVE et al., 2012). Guan e colaboradores (2009) demonstraram que ratos apresentaram melhora nos processos de aprendizagem e de memória com o uso de inibidores de HDAC (HDACis).

Ainda, entre os processos fisiopatológicos descritos na literatura relacionados com alterações epigenéticas, o câncer é amplamente estudado. Lakshmaiah e colaboradores (2015) descrevem que muitos cânceres são relacionados a alterações

moleculares, incluindo desequilíbrio entre as atividades das HATs e HDACs. Desta forma, os inibidores das HDACs surgem como uma abordagem antitumoral para algumas linhagens celulares.

Nossa hipótese envolvia também que o exercício físico diário moderado pode modular o conteúdo de HDAC2, atenuando desta forma os efeitos do envelhecimento. Esta hipótese estava baseada em resultados prévios de nosso grupo de pesquisa onde observamos que o mesmo protocolo de exercício foi capaz de diminuir a atividade global da HDAC em córtex cerebral (SPINDLER et al., 2014). Nossos dados refutam a hipótese de que os efeitos do exercício físico sobre a memória seriam relacionados à redução dos níveis de HDAC2, visto que os animais jovens e envelhecidos apresentaram um melhor desempenho no teste aversivo 1 hora após a última sessão de treino (resultados publicados por LOVATEL et al., 2012), sem alterações significativas no conteúdo da HDAC2. É relevante destacar que outras isoformas de HDACs também participam dos processos de formação da memória, estando também as isoformas 1 e 3 já descritas na literatura como integrantes deste processo (DELCUVE et al. 2012). É importante destacar que a formação de homo ou heterodímeros entre as HDAC1 e 2 e a interação destas com outras proteínas formando complexos repressores podem impactar sobre a atividade desacetilase (DELCUVE et al., 2012; KELLY e COWLEY, 2013). As enzimas HDACs 1 e 2 sofrem regulação, por exemplo, via fosforilação e sumoilação. Baseados nestes dados podemos sugerir que outras isoformas de HDAC que atuam sobre a formação dos dímeros e sobre a formação dos complexos repressores, possam ser moduladas pelo exercício físico. Sendo assim novos estudos necessitam ser desenvolvidos na busca do mecanismo epigenético relacionado ao efeito sobre a memória do exercício.

Outros trabalhos demonstram o efeito do exercício físico sobre parâmetros epigenéticos em hipocampus de ratos Wistar. Prévio estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que sessão única em esteira diminuiu a atividade da HDAC hipocampal e aumentou a atividade da HAT na histona H4 aumentando dessa forma a relação HAT/HDAC, sugerindo um estado de hiperacetilação de histonas em ratos (ELSNER et al., 2011). Enquanto que o protocolo de exercício diário moderado (duas semanas) promoveu o aumento da atividade hipocampal da HAT na histona H4 no grupo de animais exercitados quando comparado com o grupo de animais sedentários, fato que pode indicar um aumento da acetilação, porém não alterou a

atividade da HDAC e nem o balanço HAT/HDAC (ELSNER et al., 2011). Lovatel e colaboradores (2013) utilizando o mesmo protocolo de exercício evidenciaram melhora da memória no paradigma de esQUIVA inibitória em ratos jovens e envelhecidos e demonstraram que o exercício reverteu parcialmente a diminuição da acetilação global da histona H4 induzida pelo envelhecimento.

O grupo do prof. Fernando Gomez Pinilla estudou os mecanismos bioquímicos, dentre eles os epigenéticos, pelos quais o exercício voluntário altera os níveis de BDNF e demonstraram que o exercício voluntário reduz a metilação do DNA do promotor IV do gene do BDNF, aumentando os níveis da proteína e do RNA do BDNF (Gomez-Pinilla et al, 2010). O mesmo grupo de pesquisa demonstrou que 7 dias de exercício voluntário alteram o processamento do BDNF, aumentando os níveis do BDNF maduro em hipocampus de ratos (GOMEZ-PINILLA et al., 2011). E apesar de diversos autores sugerirem o aumento do BDNF como mecanismo bioquímico relacionado ao efeito neuroprotetor do exercício físico, nem todos mencionam o intervalo de tempo entre o treinamento e a obtenção das amostras. Berchtold e colaboradores (2010) demonstraram uma melhora na memória espacial e aumento nos níveis de BDNF hipocampal em camundongos induzidos pelo exercício voluntário, sendo que estes efeitos foram verificados 1 e 2 semanas após o término do protocolo de exercício.

Contudo nesta dissertação não demonstramos alterações nos níveis centrais de BDNF induzidas pelo exercício, corroborando estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (CECHETTI et al., 2007). Em estudo prévio do grupo avaliamos os níveis de BDNF em diferentes estruturas encefálicas de ratos 16 horas após a última sessão de treino em esteira, período em que havia sido descrita uma ação neuroprotetora in vitro (Scopel et al., 2006). No entanto, assim como na presente dissertação, onde as avaliações foram feitas 1 hora após a última sessão de treino, não encontramos nenhuma alteração nos níveis de BDNF nas diferentes estruturas analisadas. Desta forma, podemos sugerir que o exercício forçado (em esteira) melhora o desempenho cognitivo sem alterar os níveis de BDNF, diferentemente do exercício voluntário.

Silva e colaboradores (2016) avaliaram o efeito do exercício, durante o período gestacional de ratas, sobre níveis de BDNF e densidade celular em hipocampo e córtex cerebral da prole, e observaram diferentes respostas nas duas estruturas avaliadas. O exercício em esteira durante 20 dias da gestação não alterou

os níveis corticais de BDNF dos filhotes na vida adulta. Contudo, no hipocampo foi observado um aumento significativo nos níveis de BDNF no grupo exercitado quando comparado com o controle. Estes resultados sugerem que diferentes vias participam na formação e plasticidade de diferentes regiões do encéfalo.

Estudos avaliando os níveis de BDNF em estruturas encefálicas em animais de laboratório e em humanos no envelhecimento saudável são raros. Kreinin e colaboradores (2015) não observaram correlação entre os níveis séricos de BDNF e o aumento da idade em humanos. Gunstad e colaboradores (2008) demonstraram que níveis aumentados de BDNF estão associados com uma melhor função neuropsicológica no envelhecimento. Estudos com animais silenciados para o gene BDNF demonstraram alterações sobre os processos de aprendizagem e de memória (GORSKI et al., 2003; MONTEGGIA et al., 2004; HELDT et al., 2007). No entanto, nesta dissertação não foram observadas alterações nos níveis corticais de BDNF induzidas pelo envelhecimento ou correlação entre o desempenho dos animais no paradigma de memória aversiva e os níveis desta neurotrofina. Corroborando nossos dados, um estudo realizado na Polônia com uma população adulta de 150 voluntários, não demonstrou correlação dos níveis séricos de BDNF com um teste de aprendizado (“Auditory-verbal learning Test”) (WILKOSC et al., 2016).

Diversos estudos demonstraram a importância desta neurotrofina nos processos de regulação sináptica e plasticidade neuronal (COSTA et al., 2015). É relevante destacar que a regulação dos níveis de BDNF, pode ser pós-transcricional. Todo mRNA de BDNF é traduzido em pró-BDNF e após clivagem por proteases intracelulares é convertido em BDNF maduro (mBDNF) (NAGAPPAN et al., 2009).

Smiljanic e colaboradores (2014) demonstraram que a dieta de restrição calórica apresentou um efeito idade-dependente sobre os níveis de pró-BDNF e do BDNF maduro. Em animais de 12 meses, a restrição aumentou os níveis de BDNF maduro, enquanto que nos animais de 24 meses, houve um aumento dos níveis do pró-BDNF e uma redução dos níveis do BDNF maduro em córtex. Chen e colaboradores (2015) evidenciaram que ratos tratados com proBDNF obtiveram piores escores no teste de Water Maze e sugerem que o proBDNF atenua a neurogênese no hipocampo e induz déficits em funções de aprendizagem e memória de ratos envelhecidos. Assim, abre-se a perspectiva de avaliar tanto o efeito do envelhecimento quanto do impacto do exercício sobre os níveis do pró-BDNF e do BDNF maduro.

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que os níveis de HDAC2 em córtex pré-frontal de ratos Wistar envelhecidos está aumentado em relação ao grupo adulto jovem e este aumento está correlacionado ao prejuízo no desempenho destes animais no paradigma de memória observado nestes animais. Nossos resultados indicam ainda que o protocolo de exercício físico diário moderado não alterou significativamente os níveis de HDAC2 em córtex pré-frontal de ratos Wistar. O protocolo de exercício utilizado e o processo de envelhecimento não induziram modificações nos níveis de BDNF. Nossos dados permitem sugerir que mais estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados tanto ao envelhecimento normal quanto a neuroproteção induzida pelo exercício físico.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, Mohd W. et al. Histone deacetylases 1 and 2 form a developmental switch that controls excitatory synapse maturation and function. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 25, p. 8288-8297, 2009.
- ANG, Eng-Tat et al. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. **Brain Research**, v. 1113, n. 1, p. 186-193, 2006.
- ARROWSMITH, Cheryl H. et al. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 11, n. 5, p. 384-400, 2012.
- BERCHTOLD, Nicole C.; CASTELLO, Nicholas; COTMAN, Carl W. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. **Neuroscience**, v. 167, n. 3, p. 588-597, 2010.
- BJERLING, Pernilla et al. Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 7, p. 2170-2181, 2002.
- BLANK, Martina et al. Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats. **Neuroscience Letters**, v. 594, p. 76-81, 2015.
- BRACKEN, Adrian P. et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 20, p. 5323-5335, 2003.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BROIDE, Ron S. et al. Distribution of histone deacetylases 1–11 in the rat brain. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 47-58, 2007.
- BRUNMEIR, Reinhard; LAGGER, Sabine; SEISER, Christian. Histone deacetylase 1 and 2-controlled embryonic development and cell differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 53, n. 2-3, p. 275-289, 2009.
- CANTO-DE-SOUZA, L.; MATTIOLI, R. The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 130, p. 44-51, 2016.

- CECHETTI, Fernanda et al. Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. **Brain Research**, v. 1157, p. 121-125, 2007.
- CECHINEL, Laura Reck et al. Treadmill exercise induces age and protocol-dependent epigenetic changes in prefrontal cortex of Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, v. 313, p. 82-87, 2016.
- CENSO, I. B. G. E. Disponível em: < <http://www.censo2010.ibge.gov.br/>>. **Consulta em 06/2016**, v. 12, 2010.
- CHEN, Jia et al. proBDNF Attenuates Hippocampal Neurogenesis and Induces Learning and Memory Deficits in Aged Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 29, n. 1, p. 47-53, 2016.
- CHISHOLM, Nioka C.; SOHRABJI, Farida. Astrocytic response to cerebral ischemia is influenced by sex differences and impaired by aging. **Neurobiology of Disease**, v. 85, p. 245-253, 2016.
- COLES, Kathryn; TOMPOROWSKI, Philip D. Effects of acute exercise on executive processing, short-term and long-term memory. **Journal of Sports Sciences**, v. 26, n. 3, p. 333-344, 2008.
- COSTA, Alberto et al. Brain-derived neurotrophic factor serum levels correlate with cognitive performance in Parkinson's disease patients with mild cognitive impairment. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, 2015.
- DA SILVA, Sérgio Gomes et al. Maternal Exercise during Pregnancy Increases BDNF Levels and Cell Numbers in the Hippocampal Formation but Not in the Cerebral Cortex of Adult Rat Offspring. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0147200, 2016.
- DE RUIJTER, Annemieke JM et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical Journal**, v. 370, n. 3, p. 737-749, 2003.
- DELCUVE, Geneviève P.; KHAN, Dilshad H.; DAVIE, James R. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. **Clinical Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 1, 2012.
- DOS SANTOS SANT'ANNA, Gabriela et al. Histone deacetylase activity is altered in brain areas from aged rats. **Neuroscience Letters**, v. 556, p. 152-154, 2013.
- DUMAN, Ronald S. Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 1, p. 88-93, 2005.
- ELSNER, V. R. et al. Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 192, p. 580-587, 2011.

ELSNER, Viviane Rostirola et al. Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 136-139, 2013.

ERICKSON, Kirk I. et al. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 15, p. 5368-5375, 2010.

EUSTON, David R.; GRUBER, Aaron J.; MCNAUGHTON, Bruce L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. **Neuron**, v. 76, n. 6, p. 1057-1070, 2012.

FEINBERG, Andrew P. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. **Jama**, v. 299, n. 11, p. 1345-1350, 2008.

FISCHLE, Wolfgang et al. Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. **Molecular Cell**, v. 9, n. 1, p. 45-57, 2002.

FLATT, Thomas. A new definition of aging? **Frontiers in genetics**, v. 3, p. 148, 2012.

FOLEY, Debra L. et al. Prospects for epigenetic epidemiology. **American Journal of Epidemiology**, v. 169, n. 4, p. 389-400, 2009.

GALASINSKI, Scott C. et al. Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19618-19626, 2002.

GAO, Lin et al. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25748-25755, 2002.

GOMEZ-PINILLA, F. et al. Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 3, p. 383-390, 2011.

GÓMEZ-PINILLA, Fernando et al. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **Journal of Neurophysiology**, v. 88, n. 5, p. 2187-2195, 2002.

GORSKI, J. A. et al. Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice. **Neuroscience**, v. 121, n. 2, p. 341-354, 2003.

GRÄFF, Johannes et al. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. **Cell**, v. 156, n. 1, p. 261-276, 2014.

GRÄFF, Johannes; MANSUY, Isabelle M. Epigenetic codes in cognition and behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 192, n. 1, p. 70-87, 2008.

GRAVINA, Silvia; VIJG, Jan. Epigenetic factors in aging and longevity. **Pflügers Archiv- European Journal of Physiology**, v. 459, n. 2, p. 247-258, 2010.

GUAN, Ji-Song et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. **Nature**, v. 459, n. 7243, p. 55-60, 2009.

GUNSTAD, John et al. Serum brain-derived neurotrophic factor is associated with cognitive function in healthy older adults. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, 2008.

HANDUNNETTHI, Lahiru; HANDEL, Adam E.; RAMAGOPALAN, Sreeram V. Contribution of genetic, epigenetic and transcriptomic differences to twin discordance in multiple sclerosis. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 10, n. 9, p. 1379-1381, 2010.

HELDT, S. A. et al. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 7, p. 656-670, 2007.

HOPKINS, Michael E.; NITECKI, Roni; BUCCI, David J. Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. **Neuroscience**, v. 194, p. 84-94, 2011.

HORSBURGH, Steven et al. Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation. **Exercise Immunology Review**, v. 21, 2015.

ISHIMARU, Naoki et al. Differential epigenetic regulation of BDNF and NT-3 genes by trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine in Neuro-2a cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, n. 1, p. 173-177, 2010.

JOSEPH, J. et al. Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. **Biochemical Journal**, v. 350, n. 1, p. 199-205, 2000.

JURGENS, Heidi A.; JOHNSON, Rodney W. Dysregulated neuronal–microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 40-48, 2012.

KELLY, Richard DW; COWLEY, Shaun M. The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: complex co-stars with multiple leading parts. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 3, p. 741-749, 2013.

KIEFER, Julie C. Epigenetics in development. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 4, p. 1144-1156, 2007.

KREININ, Anatoly et al. Blood BDNF level is gender specific in severe depression. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. e0127643, 2015.

KUZUMAKI, Naoko et al. Hippocampal epigenetic modification at the doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging. **Synapse**, v. 64, n. 8, p. 611-616, 2010.

LAKSHMAIAH, K. C. et al. Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 469, 2014.

LI, Jiali et al. EZH2-mediated H3K27 trimethylation mediates neurodegeneration in ataxia-telangiectasia. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 12, p. 1745-1753, 2013.

LIMA-COSTA, Maria Fernanda; VERAS, Renato. Saúde pública e envelhecimento. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 3, p. 700-701, 2003.

LIU, Liang et al. DNA methylation impacts on learning and memory in aging. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 4, p. 549-560, 2009.

LOPATINA, Nadejda et al. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 84, n. 2, p. 324-334, 2002.

LOVATEL, Gisele Agustini et al. Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 98, n. 2, p. 182-187, 2012.

LOVATEL, Gisele Agustini et al. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 101, p. 94-102, 2013.

LUI, Julian C. et al. Broad shifts in gene expression during early postnatal life are associated with shifts in histone methylation patterns. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86957, 2014.

LUO, Yi et al. Trans-regulation of histone deacetylase activities through acetylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 50, p. 34901-34910, 2009.

MACDONALD, Jessica L.; ROSKAMS, A. Jane. Histone deacetylases 1 and 2 are expressed at distinct stages of neuro-glial development. **Developmental Dynamics**, v. 237, n. 8, p. 2256-2267, 2008.

MAHNCKE, Henry W.; BRONSTONE, Amy; MERZENICH, Michael M. Brain plasticity and functional losses in the aged: scientific bases for a novel intervention. **Progress in Brain Research**, v. 157, p. 81-109, 2006.

MCCLOSKEY, Daniel P.; ADAMO, David S.; ANDERSON, Brenda J. Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus. **Brain Research**, v. 891, n. 1, p. 168-175, 2001.

MEANEY, Michael J. Epigenetics and the biological definition of gene-environment interactions. **Child Development**, v. 81, n. 1, p. 41-79, 2010.

MEHLER, Mark F. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 86, n. 4, p. 305-341, 2008.

MILADI-GORJI, Hossein et al. Voluntary exercise ameliorates cognitive deficits in morphine dependent rats: the role of hippocampal brain-derived neurotrophic factor. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, n. 3, p. 479-491, 2011.

MONTEGGIA, Lisa M. et al. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 29, p. 10827-10832, 2004.

MONTGOMERY, Rusty L. et al. Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 19, p. 7876-7881, 2009.

MOZZETTA, Chiara; PONTIS, Julien; AIT-SI-ALI, Slimane. Functional crosstalk between lysine methyltransferases on histone substrates: the case of G9A/GLP and polycomb repressive complex 2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 16, p. 1365-1381, 2015.

MULLER, HENRIQUE REICHMANN; PRADO, KARIN BRAUN. Epigenética: um novo campo da genética. **RUBS, Curitiba**, v. 1, n. 3, p. 61-69, 2008.

NAGAPPAN, Guhan et al. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 4, p. 1267-1272, 2009.

ORGANIZATION, W. H. **Global health and Aging**. World Health Organization, 2011.

PARADIES, Giuseppe et al. Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin. **Neurochemistry International**, v. 58, n. 4, p. 447-457, 2011.

PHTLS, Prehospital Trauma Life Support committee of The National Association of Emergency Medical Technicians in cooperation With The Committee on Trauma of The American College of Surgeons, **Basic and Advanced Prehospital Trauma Life Support**, 6^oEd.

RADAK, Zsolt et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochemistry International**, v. 49, n. 4, p. 387-392, 2006.

RODRIGUES, Gelson M. et al. Acute stress affects the global DNA methylation profile in rat brain: modulation by physical exercise. **Behavioural Brain Research**, v. 279, p. 123-128, 2015.

RUSSO-NEUSTADT, A. A. et al. Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 101, n. 2, p. 305-312, 2000.

RYU, Hoon et al. Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 4281-4286, 2003.

SAHA, R. N.; PAHAN, K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, n. 4, p. 539-550, 2006.

SILVA, Maria da Graça da; BOEMER, Magali Roseira. The experience of aging: a phenomenological perspective. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 17, n. 3, p. 380-386, 2009.

SMILJANIC, Kosara et al. Long-term dietary restriction differentially affects the expression of BDNF and its receptors in the cortex and hippocampus of middle-aged and aged male rats. **Biogerontology**, v. 16, n. 1, p. 71-83, 2015.

SOUZA, Rosangela Ferreira de; SKUBS, Thais; BRÊTAS, Ana Cristina Passarella. Envelhecimento e família: uma nova perspectiva para o cuidado de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, 2007.

SPINDLER, Christiano et al. Treadmill exercise alters histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in frontal cortices from wistar rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 34, n. 8, p. 1097-1101, 2014.

STRAHL, Brian D.; ALLIS, C. David. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41-45, 2000.

TAPLICK, Jan et al. Homo-oligomerisation and nuclear localisation of mouse histone deacetylase 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, n. 1, p. 27-38, 2001.

TSENG, B. Y. et al. White matter integrity in physically fit older adults. **Neuroimage**, v. 82, p. 510-516, 2013.

VAN PRAAG, Henriette et al. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 38, p. 8680-8685, 2005.

WAGGONER, Darrel. Mechanisms of disease: epigenesis. In: **Seminars in Pediatric Neurology**. WB Saunders, 2007. p. 7-14.

WALKER, Michael P. et al. Reversible epigenetic histone modifications and Bdnf expression in neurons with aging and from a mouse model of Alzheimer's disease. **Age**, v. 35, n. 3, p. 519-531, 2013.

WANG, Qijun et al. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. **Science**, v. 327, n. 5968, p. 1004-1007, 2010.

WEI, Yongkun et al. CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 87-94, 2011.

WILKOSC, Monika et al. A lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor serum level and verbal memory performance in healthy Polish population. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 10, 2016.

WINTER, Bernward et al. High impact running improves learning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 4, p. 597-609, 2007.

YOO, Christine B.; JONES, Peter A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 5, n. 1, p. 37-50, 2006.

ZHANG, Fang Fang et al. Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. **Epigenetics**, v. 6, n. 3, p. 293-299, 2011.

ZHAO, Ming-Gao et al. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. **Neuron**, v. 47, n. 6, p. 859-872, 2005.