



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

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO NA ATIVIDADE DAS
ENZIMAS HISTONA ACETILTRANSFERASE E HISTONA DESACETILASE EM
HIPOCAMPO DE RATOS**

Viviane Rostirolla Elsner

PORTO ALEGRE

2011

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

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO NA ATIVIDADE DAS
ENZIMAS HISTONA ACETILTRANSFERASE E HISTONA DESACETILASE EM
HIPOCAMPO DE RATOS**

Viviane Rostirolla Elsner

Orientadora: Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Dissertação apresentada ao Curso 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

2011

VIVIANE ROSTIROLLA ELSNER

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO NA ATIVIDADE DAS
ENZIMAS HISTONA ACETILTRANSFERASE E HISTONA DESACETILASE EM
HIPOCAMPO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso 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. Rafael Roesler
UFRGS

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
UFSC

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

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, não somente pelo fato d'Ele ter me concedido a vida, mas principalmente por estar sempre ao meu lado, iluminando meus passos, guiando meus caminhos, me dando sabedoria, força e perseverança a cada dia para enfrentar os desafios e as dificuldades impostas. Tenho convicção de que, sem a fé que possuo seria impossível concluir esta trajetória.

Aos mestres da vida, meus pais, Edson e Dirce, por terem me ensinado princípios e valores fundamentais, por tudo o que representam para mim e por nunca terem poupado esforços para que, incondicionalmente, eu pudesse me dedicar aos estudos e à realização dos meus sonhos. Mesmo à distância, vocês sempre estiveram ao meu lado, me fazendo sentir o cuidado e amor de vocês. Ao Gui, meu irmão, que sempre torce pela minha felicidade e sucesso profissional. Aos queridos que sempre apostaram em meu futuro (Amo vocês).

À Profa. Ionara Rodrigues Siqueira, minha orientadora, por ter me acolhido tão bem em seu laboratório, pela confiança depositada em mim, pelas infinitas horas destinadas ao meu estudo, pelo exemplo profissional, pela competência, paciência, dedicação, crítica, empenho e estímulo. Agradeço também pela amizade e inestimável ajuda em todas as circunstâncias.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e ao CNPq pela oportunidade e pela bolsa concedida. Também, aos professores do Programa de Fisiologia, pelos ensinamentos e pelo crescimento científico a nós proporcionado.

Às secretárias do Curso de Pós-Graduação Alice e Sílvia, bem como às secretárias do Departamento de Farmacologia Ângela e Jane, que sempre estiveram dispostas a ajudar.

Ao grupo de Pesquisa e Pós Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto

(09-123) e por disponibilizar a Unidade de Experimentação Animal (UEA), onde o trabalho foi desenvolvido com qualidade e segurança. Ao pessoal da UEA, em especial a Marta e Fabíola e também ao Everaldo, do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA pela competência e imensa prestatividade.

Ao pesquisador Alysson Renato Muotri, da Universidade da Califórnia, em San Diego, nos EUA, pelas dicas e colaboração fundamental para a realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Fisioterapia da URI Campus de Erechim, por terem sido muito importantes na minha formação profissional. Em especial as professoras Miriam Wisniewski e Silvane Roman por terem despertado meu interesse pela pesquisa e por sempre me instigarem a seguir o caminho acadêmico.

À família Landenberger: Gunther, Marisa, Tiago e Thais, pelo suporte e carinho durante todo o processo de seleção do mestrado.

Aos queridos colegas de laboratório, Kaki, Gi, Felipe, Chris, Cláudia, Paula, Fran, Vera, Jéssica, Eduardo. A ajuda e o companheirismo de vocês me motivaram e me deu muita força nesta jornada. Sinto-me uma pessoa privilegiada em ter amigos como vocês. Aprendi com cada um de vocês e jamais os esquecerei.

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

Todos vocês fizeram parte da realização deste grande sonho da minha vida. Por mais que eu quisesse, nenhuma palavra seria suficiente para expressar o quanto vocês foram importantes para mim. Então, neste momento, gostaria de dividir minha alegria e dizer que a vitória não é só minha, mas principalmente de vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Benefícios do Exercício Físico sobre o SNC.....	2
1.2 Epigenética.....	5
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos Específicos.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Animais.....	12
3.2 Procedimentos.....	12
3.2.1 <i>Protocolo de Exercício Físico</i>	12
3.2.2 <i>Desenho Experimental</i>	14
3.2.2.1 <i>Protocolo 1: Sessão única de exercício</i>	14
3.2.2.2 <i>Protocolo 2: Treinamento Crônico</i>	14
3.3 Dissecção e preparação das amostras.....	15
3.4 Atividade da enzima HDAC.....	15
3.5 Atividade da enzima HAT.....	16
3.6 Estatística.....	17
3.7 Aprovação pelo Comitê de Ética.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Atividade global da HDAC.....	18
4.1.1 <i>Atividade global da HDAC no Protocolo 1</i>	18
4.1.2 <i>Atividade global da HDAC no Protocolo 2</i>	18
4.2 Atividade da HAT.....	20
4.2.1 <i>Atividade da HAT no Protocolo 1</i>	20
4.2.2 <i>Atividade da HAT no Protocolo 2</i>	20
4.3 Balanço entre a atividade HAT/HDAC.....	23

4.3.1 <i>Balanço entre a atividade HAT/HDAC no Protocolo 1</i>	23
4.3.2 <i>Balanço entre a atividade HAT/HDAC no Protocolo 2</i>	23
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÕES	31
7. PERSPECTIVAS	32
8. ARTIGO CIENTÍFICO	33
9. REFERÊNCIAS	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática da estrutura da cromatina	6
FIGURA 2. Representação esquemática das modificações epigenéticas em histonas	7
FIGURA 3. Representação esquemática do estado de acetilação e desacetilação de histonas	8
FIGURA 4. Representação esquemática do balanço HAT/HDAC	9
FIGURA 5. Esteira ergométrica adaptada para ratos	13
FIGURA 6. Esquema do Desenho Experimental	15
FIGURA 7. Efeito do exercício na atividade global da HDAC em hipocampo de ratos	19
FIGURA 8. Efeito do exercício na atividade da HAT na histona H4 e histona H3 em hipocampo de ratos	21
FIGURA 9. Efeito do exercício balanço HAT/HDAC em hipocampo de rato	25

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 desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacetato
EGTA	Ácido tetracético etilenoglicol
EXE	Exercitado
EXEim	Exercitado morto imediatamente após o exercício, início da tarde
EXE1h	Exercitado morto 1h após o exercício, início da tarde
EXE18h	Exercitado morto 18h após o exercício, início da manhã
HAT	Histona Acetiltransferase
HDAC	Histona Desacetilase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
IgG	Imunoglobulina
KCl	Cloreto de Potássio
m/min	Metros por minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaBt	Butirato de Sódio

N₂	Nitrogênio
nm	Nanômetro
pH	Potencial de Hidrogênio
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluoreto
POG	Privação de oxigênio e glicose
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SED	Sedentário
SEDim	Sedentário morto no início da tarde
SED1h	Sedentário morto no início da tarde
SED18h	Sedentário morto no início da manhã
TBS	Tris Buffered Saline
TMB	Tetrametilbenzidina
TSA	Tricostatina A
VPA	Valproato de Sódio
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. Nossa hipótese de trabalho foi que estas propriedades neuroprotetoras estejam relacionadas com o remodelamento da cromatina, especificamente alterando os níveis de acetilação de histonas através da modulação da atividade das enzimas Histona Acetiltransferase (HAT) e Histona Desacetilase (HDAC). O objetivo do estudo foi investigar o efeito do exercício na atividade da Histona Acetiltransferase (HAT) e Histona Desacetilase (HDAC) em hipocampo de ratos em diferentes tempos após o treinamento. Ratos Wistar machos adultos foram distribuídos em um grupo não-exercitado (sedentário) e um grupo exercitado em diferentes protocolos: sessão única de exercício (corrida de 20 min) e treinamento crônico de exercício (corrida de 20 min, uma vez por dia, durante duas semanas). Os efeitos do exercício na atividade da Histona Acetiltransferase (HAT) e Histona Desacetilase (HDAC) foram mensurados imediatamente, 1 h e 18 h após a sessão única ou após a última sessão do treinamento crônico de exercício, utilizando kits ELISA específicos. A sessão única de exercício reduziu a atividade da Histona Desacetilase (HDAC) e aumentou a atividade da Histona Acetiltransferase (HAT), bem como aumentou o balanço HAT/HDAC em hipocampus de ratos, imediatamente e 1 h após o exercício, indicando um estado de hiperacetilação de histonas. O treinamento crônico não alterou a atividade das enzimas Histona Acetiltransferase (HAT) e Histona Desacetilase (HDAC). As atividades das enzimas Histona Acetiltransferase (HAT) e Histona Desacetilase (HDAC) foram influenciadas pelo ritmo circadiano, uma vez que o balanço HAT/HDAC foi significativamente menor durante o período da manhã em comparação ao período da tarde. O exercício físico alterou a atividade das enzimas Histona Acetiltransferase (HAT) e Histona Desacetilase (HDAC) em hipocampus de ratos Wistar, apresentando efeito de curta duração.

ABSTRACT

Regular and moderate exercise has been considered a promising neuroprotective strategy. The mechanisms by which physical exercise alters brain function are not completely clear. Our work hypothesis was that these neuroprotective properties could be related to chromatin remodeling, specifically altering the histone acetylation levels through modulation of Histone Acetyltransferase (HAT) and Histone Desacetylase (HDAC) enzyme activities. The aim of the work was to investigate the effect of exercise on Histone Acetyltransferase (HAT) and Histone Desacetylase (HDAC) activities in rat hippocampus at different times after treadmill exercise. Adult male Wistar rats were assigned to a non-exercised (sedentary) group and an exercised group on different protocols: a single session of exercise (running for 20 min) and a chronic treadmill exercise (running once daily for 20 min, for 2 weeks). The effects of exercise on Histone Acetyltransferase (HAT) and Histone Desacetylase (HDAC) activities were measured immediately, 1 h and 18 h after the single session or the last session of chronic treadmill exercise using specific ELISA kits. The single session of exercise reduced the Histone Desacetylase (HDAC) activity and increased the Histone Acetyltransferase (HAT) activity, as well increased the HAT/HDAC balance in rat hippocampus, immediately and 1 h after exercise, indicative of histone hyperacetylation status. The chronic treadmill did not alter the Histone Acetyltransferase (HAT) and Histone Desacetylase (HDAC) enzymes activity. The Histone Acetyltransferase (HAT) and Histone Desacetylase (HDAC) enzymes activities were influenced by the circadian rhythm, since the HAT/HDAC ratio was significantly decreased in the early morning when compared to the afternoon. The physical exercise altered the Histone Acetyltransferase (HAT) and Histone Desacetylase (HDAC) enzymes activities in Wistar rats hippocampus, presenting short term effects.

1 INTRODUÇÃO

O exercício físico parece ser significativamente favorável à saúde e bem-estar, fornecendo benefícios psicológicos, proporcionando integração social e melhorando a autoestima. Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que o exercício físico regular traz muitos benefícios à saúde, estando relacionado não só com o melhora da qualidade de vida, bem como com a diminuição da incidência de disfunções relacionadas ao estilo de vida (Duman, 2005).

Duman (2005) mostraram os efeitos psicológicos do exercício, os quais incluem ação ansiolítica e antidepressiva e melhor resistência a problemas emocionais e fisiológicos, proporcionando como conseqüência, integração social e melhora da autoestima em pacientes com depressão leve a moderada. Sua prática tem sido usada especialmente no tratamento de pacientes com problemas emocionais que rejeitam ostensivamente diagnósticos psicológicos e seus respectivos tratamentos (Salmon, 2001).

Sabe-se que os efeitos positivos do exercício físico atingem diversos sistemas fisiológicos, alterando variáveis como atividade cardíaca, pressão arterial, freqüência respiratória, temperatura e atividade muscular, o que contribui para um estilo de vida mais saudável (Wilmore e Costill, 2001). Alguns autores sugerem que o exercício também contribui para a redução da incidência de tumores (Mahabir et al., 2004; Patel et al., 2003).

Segundo Lee e Paffenbarger (1998), a prática de exercício físico parece reduzir tanto o risco quanto a mortalidade induzida por Acidente Vascular Cerebral (AVC), além de melhorar a função cerebral, podendo influenciar o comportamento. A participação em programas de atividade física parece restabelecer as habilidades mentais em adultos idosos (Dustman et al., 1984; Elsayed et al., 1980; Kramer et al., 1999).

Frente a todos esses dados, o exercício regular parece ser significativamente benéfico à saúde (Radák et al., 2001), sendo encarado atualmente como um instrumento, tanto preventivo como terapêutico, para vários tipos de doenças (Wilmore e Costill, 2001). No entanto, há um conhecimento restrito sobre os mecanismos de ação pelos quais o exercício físico atua nos diferentes sistemas fisiológicos.

Os animais de experimentação têm sido amplamente utilizados para avaliar

os efeitos do exercício físico. É digno de nota que as respostas fisiológicas associadas ao exercício físico dependem do protocolo de treinamento utilizado, variando conforme frequência, duração e intensidade do esforço (Narath et al., 2001).

O exercício físico pode ser classificado de acordo com a intensidade do esforço em: leve, moderado e intenso, conforme o consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx), ou seja, a taxa máxima que o organismo de um indivíduo tem de captar e utilizar o oxigênio do ar que está inspirando para gerar trabalho. Assim sendo, o teste de VO_2 máx tem sido amplamente utilizado para a prescrição e orientação de programas de exercício físico. Um exercício leve corresponde entre 20 a 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 classificação aplicada ao exercício é relacionada à motivação: exercício forçado ou voluntário. Os modelos voluntários utilizam o livre acesso a uma roda de corrida (Mondon et al., 1985; Russel et al., 1987), e por ser voluntário, o controle das variáveis de treinamento é dificultado (Raglin, 1990). Já o protocolo de treinamento forçado consiste em sessões de corrida em esteira ergométrica ou o nado forçado (Radák et al., 2001), e assim, as variáveis de treinamento podem ser controladas cuidadosamente (Dishman, 2006).

Além disso, os efeitos fisiológicos do exercício físico podem ser classificados em agudos e crônicos. Os efeitos agudos, também denominados respostas, são 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).

1.1 Benefícios do Exercício Físico sobre o Sistema Nervoso Central (SNC)

Os efeitos neuroprotetores do exercício físico ganharam importância na última década, sendo foco de várias pesquisas. Tem sido sugerido que o

exercício físico produz efeitos benéficos em certas regiões cerebrais, além de alterações positivas no balanço homeostático, envolvendo alterações hormonais, metabólicas e imunológicas (Radák et al., 2005). Vissing e colaboradores (1996) mostraram que o hipocampo, o córtex motor e o estriado apresentam alta atividade neuronal durante o exercício, podendo, portanto, sofrer plasticidade cerebral relacionada à atividade física.

A melhora da função cerebral com a prática do exercício físico tem sido verificada tanto em humanos (Winter et al., 2007; Coles e Tomporowski, 2008; Sibley e Beilock, 2007) quanto em animais, especialmente em roedores.

Vários autores têm associado o exercício físico regular com o aprimoramento da função cognitiva em ratos (Kramer et al., 1999; Cotman e Berchthold, 2002; Berchtold et al., 2005; Chen et al., 2007; Van der Borght et al., 2007), o que parece estar relacionado com aspectos como: aumento da neurogênese hipocampal (Doring e Cao, 2006; Fabel et al., 2003; van Praag et al., 1999), redução das variáveis relacionadas ao estresse oxidativo (Ogonovszky et al., 2005; Radak et al., 2006), aumento dos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo ("brain-derived neurotrophic factor", BDNF; Vaynman et al., 2006; Huang et al., 2006; Berchthold et al., 2005; Neeper et al., 1995), incremento da vascularização cerebral (Isaacs et al., 1992) e várias alterações morfológicas (Arida et al., 2004).

Dentro desse contexto, um estudo interessante para ser citado é o de Uysal et al. (2005). Os autores avaliaram os efeitos do exercício aeróbico regular (sessões diárias de corrida-30 minutos durante 8 semanas) em ratos com 22 dias de vida, período equivalente à adolescência, sobre a densidade neuronal, apoptose e memória espacial. Eles mostraram que o exercício induziu significativa melhora cognitiva nos ratos, associado a um aumento no número de neurônios na região CA1 e CA3 do hipocampo.

Van Praag e colaboradores (2005) descreveram uma diminuição (cerca de 50%) da neurogênese em ratos envelhecidos e concluíram que o exercício voluntário é capaz de amenizar algumas alterações morfológicas e comportamentais decorrentes do processo de envelhecimento.

Alguns autores têm reportado também os efeitos favoráveis do exercício, voluntário e forçado, em testes de memória em roedores (Barnes et al., 1991; Uysal et al., 2005; van Praag et al., 2005; Blustein et al., 2006; Ang et al., 2006;

Ogonovsky et al., 2005; Radak et al., 2006; Alaei et al., 2006; Chen et al., 2007). Anderson e colaboradores (2000), por exemplo, demonstraram que ratos exercitados de forma voluntária em rodas de corrida durante sete semanas necessitaram de um menor período de treino para adquirir o critério de desempenho no labirinto radial de oito braços.

O exercício físico parece contribuir tanto na redução do risco, quanto na mortalidade induzida por AVCs (Lee e Paffenbarger, 1998). Modelos experimentais também demonstram que o exercício reduz o dano neuronal induzido por isquemia cerebral focal e global (Stummer et al., 1994; Wang et al., 2001). Stummer e colaboradores (1994) relataram propriedades neuroprotetoras do exercício pré-isquêmico em gerbilos, onde o livre acesso a uma roda de corrida durante 14 dias antes da indução da isquemia global resultou em um aumento na sobrevivência dos animais exercitados quando comparados ao grupo controle. Além disso, a análise histológica quantitativa indicou que o dano isquêmico foi atenuado no hipocampo, neocórtex, estriado e tálamo nos animais exercitados.

Recentemente, resultados obtidos em nosso laboratório mostram que o exercício físico regular, de intensidade moderada (20 minutos diários durante 2 semanas) alterou a susceptibilidade ao evento isquêmico *in vitro*. Fatias hipocámpais de animais exercitados em esteira ergométrica, submetidas à privação de oxigênio e glicose (POG), apresentaram diferente resposta de dano celular de forma dependente da intensidade do exercício. O dano induzido pela POG foi reduzido em animais submetidos ao exercício em intensidade moderada. Por outro lado, o exercício físico com intensidade extenuante induziu dano celular quando comparado ao grupo controle, além de potencializar fortemente a lise causada pela POG (Scopel et al., 2006).

De uma forma geral, tem sido proposto que os efeitos benéficos do exercício na função cerebral estão associados com o aumento da capilarização (Black et al., 1987) e das conexões sinápticas (Pysh e Weiss, 1979), porém, há um restrito conhecimento sobre o seu mecanismo de ação. Alguns autores sugerem a ativação de algumas vias moleculares e celulares que contribuem para a neuroproteção. Sabe-se, por exemplo, que o exercício induz alterações nos níveis de transcrição de diversos genes (Tong et al., 2001).

Vários autores têm demonstrado que o exercício físico pode promover um aumento na expressão de certos fatores tróficos, dentre eles, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (“brain-derived neurotrophic factor”, BDNF), o qual é importante para a diferenciação e sobrevivência neuronal (Gomez-Pinilla et al., 2002; Neeper et al., 1996). É interessante relatar também que um curto período de treinamento já é suficiente para aumentar a expressão de BDNF. Russo-Neustadt e colaboradores (1999, 2000) demonstraram que dois, sete ou vinte dias de exercício voluntário elevaram o conteúdo de RNAm de BDNF hipocampal. Contudo, demonstramos recentemente que um protocolo neuroprotetor não alterou os níveis de BDNF em hipocampus de ratos Wistar, 18 horas após o treinamento de intensidade moderada, sugerindo que o BDNF não está diretamente envolvido com o efeito deste protocolo (Cechetti et al., 2007). No entanto, não podemos descartar a hipótese de que o exercício altere os níveis de BDNF com padrão temporal diferente do testado.

1.2 Epigenética

Tem sido verificado um considerável crescimento na área da epigenética e no impacto que seus mecanismos exercem na biologia (Feinberg, 2008). O termo epigenética, derivado do prefixo grego “epi” significa, literalmente, “sobre os genes” e foi introduzido em 1942 por Conrad Waddington. Inicialmente, a epigenética foi definida como um processo no qual a informação genética de um organismo interagia com o ambiente, e assim, definia seu fenótipo (Murrell et al., 2005).

Atualmente, epigenética é o termo usado para se referir à alteração herdável da expressão gênica de organismos unicelulares e multicelulares que são estáveis ao longo de diversas divisões celulares, mas que não envolvem alteração da sequência de DNA e sim, uma modificação da conformação da cromatina (Bird, 2007).

Nucleossomo é o nome dado, nos seres eucariontes, à unidade fundamental da cromatina (Figura 1A). Consiste em uma unidade de DNA dividida em duas espirais, que se enrolam em torno de um octâmero protéico (Figura 1B) constituído por quatro pares de proteínas chamadas 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).

As histonas são proteínas que apresentam alta proporção de resíduos dos aminoácidos lisina e arginina, os quais são carregados positivamente. Isso é o que ajuda a ligarem-se fortemente ao DNA, que tem um alto conteúdo de 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”. Além disso, cada H2A também possui uma cauda carboxi-terminal (C-terminal) na sua extremidade (Kouzarides, 2007).

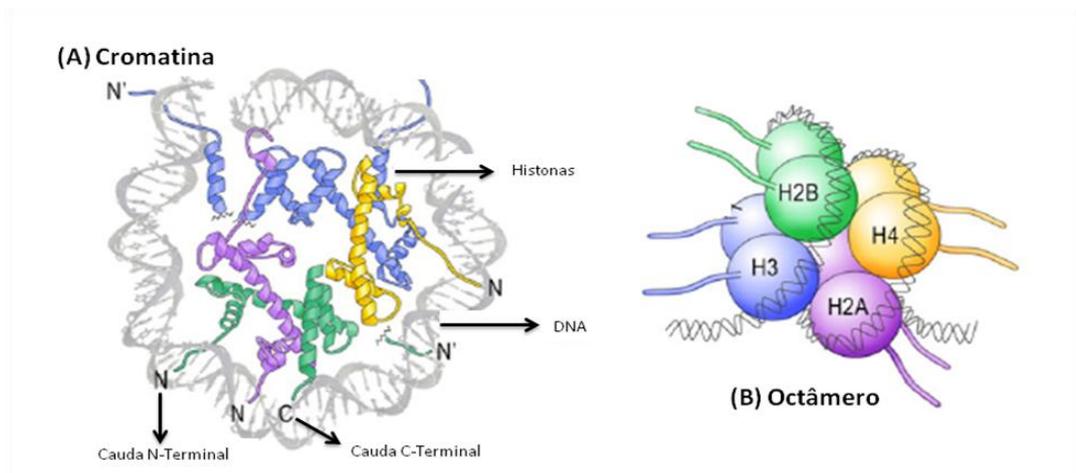


Figura 1 (A) Estrutura da cromatina, formada por histonas envolvidas por duas moléculas de DNA; **(B)** Octâmero central do nucleossomo, formado por quatro pares de histonas (Adaptada de Gräff e Mansuy, 2008).

A posição dos nucleossomos em relação à sequência de DNA é um fator que altera o grau de compactação da cromatina e conseqüentemente sua acessibilidade para o processo transcricional (Lund e Lohuizen, 2004). A cromatina altamente condensada é denominada heterocromatina, sendo relacionada com a repressão e silenciamento gênico. Contrariamente, a eucromatina, com seus nucleossomos mais espaçados, forma uma estrutura "aberta" que facilita a transcrição e conseqüentemente o aumento da expressão gênica (Rodenhiser e Mann, 2006). O estado dinâmico da cromatina pode ser alterado por modificações epigenéticas, envolvendo mecanismos bioquímicos que atuam nas histonas ou no próprio DNA (Tang et al., 2007; Kouzarides, 2007).

As histonas constituem substratos para pelo menos oito tipos diferentes de modificações pós traducionais, como por exemplo, acetilação, fosforilação,

metilação, ubiquitinação e ADP-poli-ribosilação (van Holde, 1988), sendo que a maioria destas ocorre nas caudas N-terminais destas proteínas (Figura 2). Uma vez que as histonas são modificadas, estas são reconhecidas por complexos de remodelamento de cromatina que, então, as modificam, tornando-a acessível ou não aos fatores de transcrição.

Pesquisas recentes têm demonstrado que o ambiente é capaz de induzir estas modificações e conseqüentemente modular a expressão de genes específicos. A maioria desses estudos utiliza modelos animais e mostram que afetam principalmente o hipocampo, podendo influenciar o comportamento (Zhang and Meaney, 2010), os processos fisiológicos e o desenvolvimento de diversas doenças (Feinberg, 2008; Foley et al., 2009; Handel et al., 2010). Entre os fatores que podem induzir as modificações epigenéticas, os mais citados incluem a alimentação, a poluição, os fármacos e o exercício físico (Muller e Prado, 2008).

Apesar da evidente influência do ambiente sobre a modulação epigenética relacionada com a função cerebral, até o presente momento nenhum estudo avaliou se a remodelação da cromatina é sensível aos efeitos do exercício físico.

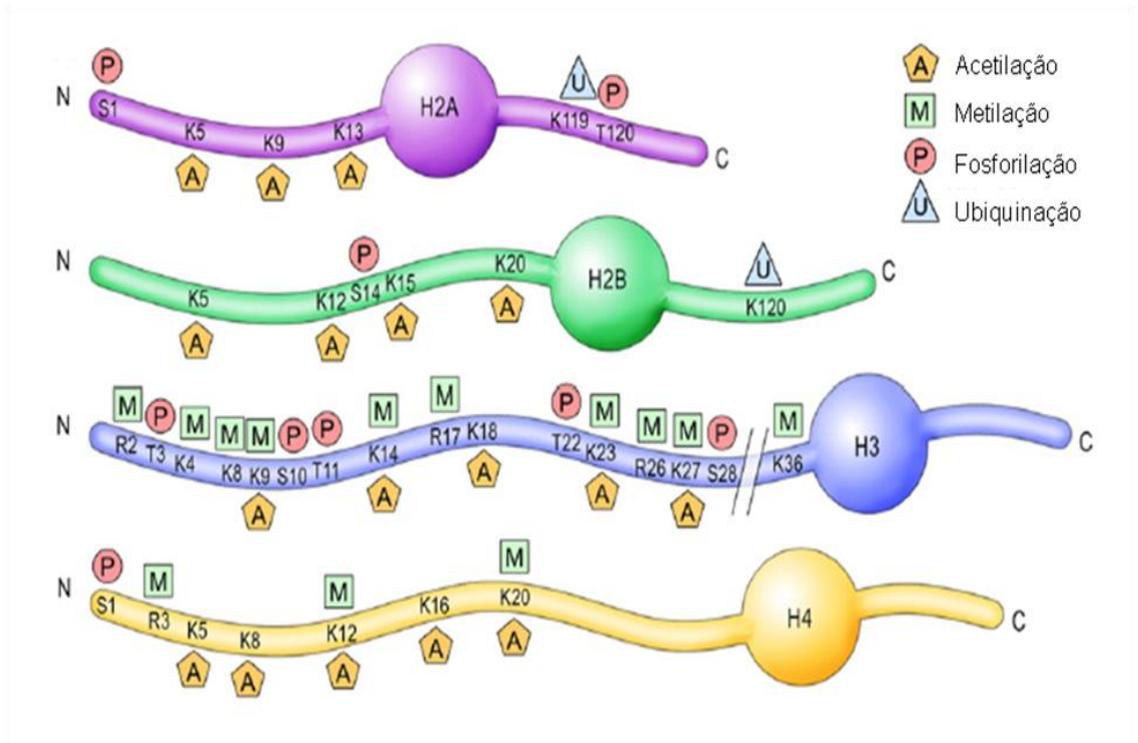
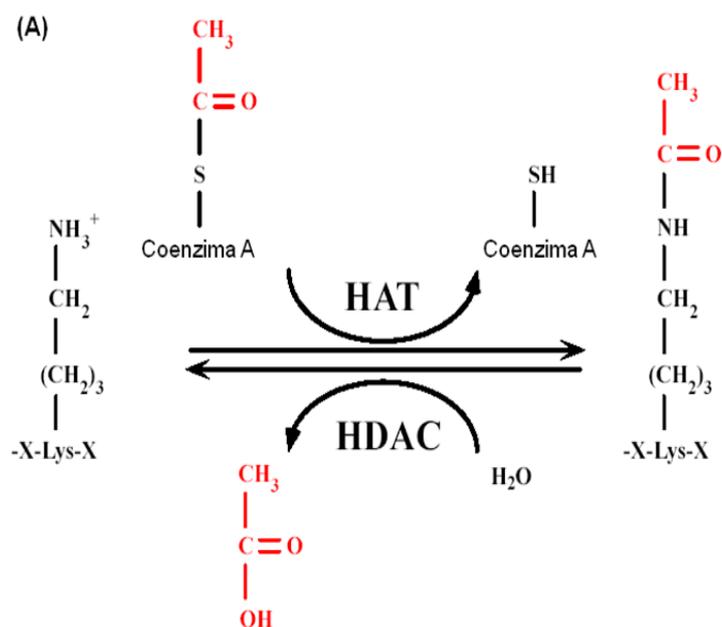


Figura 2 Modificações epigenéticas em histonas (Adaptada de Gräff e Mansuy, 2008).

A acetilação de histonas, descoberta há mais de quatro décadas, é a modificação pós-traducional mais estudada atualmente (Kimura et al., 2005; Choi and Howe, 2009) e vai ser foco do nosso estudo. Estas ocorrem principalmente nas caudas N-terminais das histonas H3 e H4 (Kuo e Allis, 1998) e são reguladas por dois grupos de enzimas, as histonas desacetilases (HDAC) e as histonas acetiltransferases (HAT).

As HAT catalisam a adição do grupo acetil da molécula doadora acetil-coenzima A (acetil-CoA) aos resíduos de lisina das histonas, o que neutraliza a carga positiva das extremidades destas proteínas, enfraquecendo as interações eletrostáticas entre os nucleossomos, bem como entre as histonas e o DNA. Dessa forma, a cromatina adota uma configuração mais aberta, facilitando, conseqüentemente, o processo de transcrição (Waggoner, 2007; Yoo e Jones, 2006). Por outro lado, as HDAC desacetilam as histonas, ou seja, removem o grupo acetil destas proteínas, ligando-se fortemente ao DNA e assim tornando a estrutura da cromatina mais compacta (Strahl e Allis, 2000; Turner, 2002). Isto atenua o processo de transcrição e contribui para o silenciamento gênico.

Em função de sua ação, as HAT são consideradas coativadoras da transcrição, enquanto as HDAC são consideradas co-repressoras da transcrição (Rountree et al., 2001). Dessa forma, fica evidente que o sistema HAT–HDAC é muito importante na regulação do processo de transcrição e conseqüentemente no controle da expressão gênica (Figura 3).



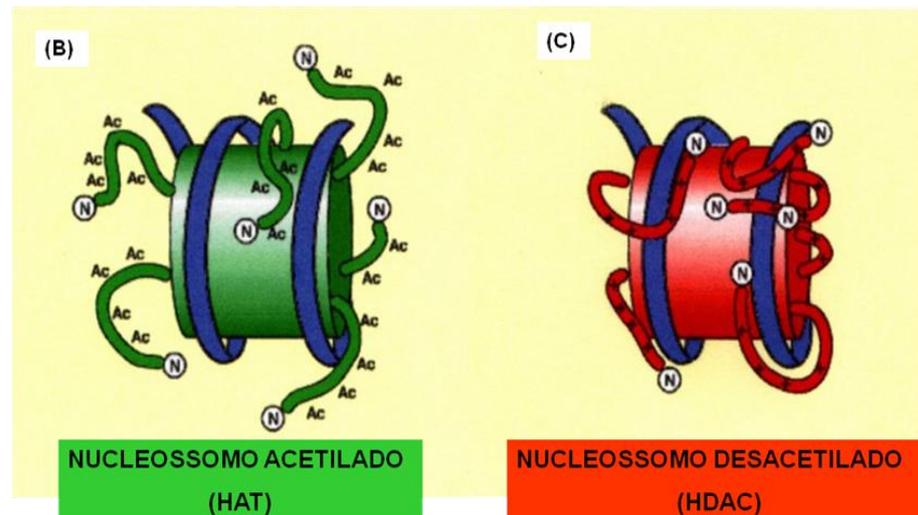


Figura 3 (A) Acetilação e desacetilação de histonas, pela ação da HAT e da HDAC; **(B)** Eucromatina, cromatina “aberta”; **(C)** Heterocromatina, cromatina condensada (Adaptado de <http://bricker.tcnj.edu/Amb/amble9.html>).

É relevante destacar que a perda do balanço entre a atividade das enzimas HAT e HDAC (HAT/HDAC) a favor da HDAC, ou seja, devido a um aumento da atividade da HDAC (Figura 4), parece ser um mecanismo crítico e decisivo envolvido na disfunção e toxicidade neuronal, fatores relacionados a desordens neurodegenerativas (Saha e Pakan, 2006; Steffan et al., 2001; Taylor et al., 2003).

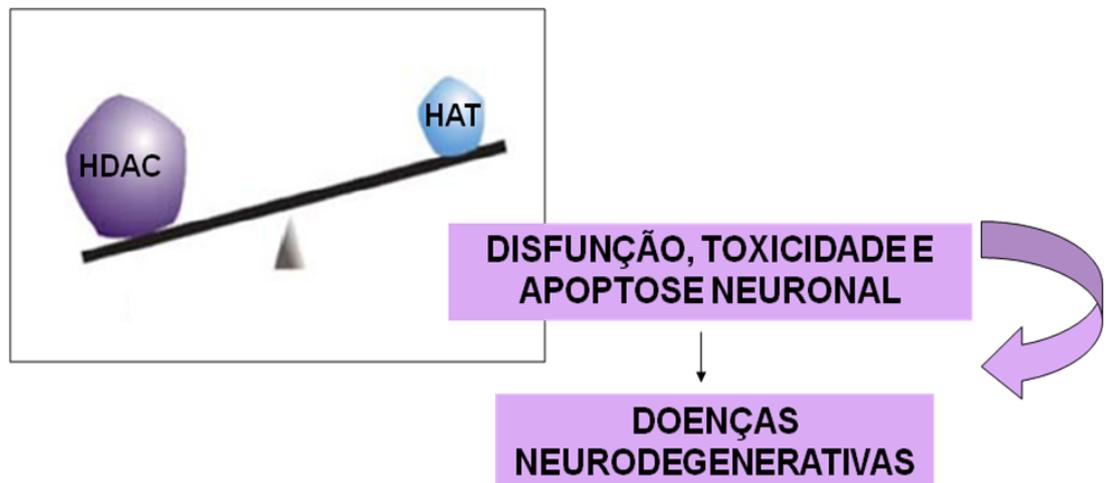


Figura 4 Relação entre a perda do balanço HAT/HDAC e doenças neurodegenerativas (Adaptado de Saha e Pakan, 2006).

Com o crescente aumento na incidência de desordens neurodegenerativas decorrente da maior expectativa de vida mundial, criou-se a necessidade de buscar alternativas terapêuticas que visem melhorar a qualidade de vida destes

pacientes. Neste contexto, agentes que promovam aumento no nível de acetilação de histonas, tais como ativadores da HAT e inibidores da HDAC, parecem ser recursos terapêuticos promissores no tratamento de desordens neurodegenerativas (Saha e Pakan, 2006).

Atualmente, vários grupos têm investigado a eficácia dos inibidores de HDAC, os quais parecem ser favoráveis no manejo da morte neuronal e conseqüentemente na melhora da qualidade de vida de pacientes que sofrem de desordens neurodegenerativas, neuropsiquiátricas e distúrbios de aprendizagem e memória (Bates, 2001; Sugars and Rubinsztein, 2003; Hockly et al., 2003; Ryu et al., 2003). Dentre esses inibidores, pode-se citar a Tricostatina A (TSA), o Valproato de Sódio (VPA) e o Butirato de Sódio (NaBt).

Há relatos que inibidores de HDAC melhoram o desempenho em tarefas de memória (Lubin et al., 2008), e também revertem déficits de memória (Korzus et al., 2004). Fontán-Lozano et al. (2008) mostraram que a inibição de HDAC não somente induziu a acetilação de histonas, como também facilitou a formação da memória em diferentes testes. De fato, outro estudo mostrou que a administração de inibidores de HDAC induziu um aumento global na acetilação em estruturas cerebrais e melhorou significativamente o desempenho motor (Hughes et al., 2001). O tratamento com inibidores de HDAC também apresentam atividade neuroprotetora em modelos de isquemia (Katchanov et al., 2001; Gardian et al., 2005). Kim et al. (2007) verificaram também que inibidores de HDAC apresentaram efeitos anti-inflamatórios após isquemia cerebral. Ainda, Ryu et al (2003), demonstraram que inibidores de HDAC foram capazes de reverter a apoptose neuronal induzida pelo estresse oxidativo, o qual tem sido associado em varias desordens neurodegenerativas tais como doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington, isquemia e Esclerose Múltipla.

Uma extensa literatura evidencia a modulação do processo de transcrição gênica pelo exercício físico, já que sua prática parece aumentar a expressão de genes específicos (Mahoney et al., 2005), inclusive em estruturas cerebrais de ratos adultos (Lou et al., 2008). Assim, é relevante investigar o envolvimento de mecanismos epigenéticos na neuroproteção induzida pelo exercício físico.

2 OBJETIVOS

A hipótese de trabalho é que as propriedades neuroprotetoras do exercício estejam relacionadas com a remodelação da cromatina, especificamente induzindo modificação de histonas, através da atividade das enzimas Histona Acetiltransferase (HAT) e Histona Desacetilase (HDAC).

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do projeto consiste em investigar os efeitos neuroprotetores do exercício físico sobre mecanismos epigenéticos em hipocampo de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

I) Comparar o efeito de dois protocolos de exercício físico, sessão única de exercício e treinamento crônico, sobre a atividade das enzimas HAT e HDAC.

II) Avaliar a atividade das enzimas HAT e HDAC em diferentes tempos após a sessão única de exercício e da última sessão do treinamento crônico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 60 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 (estando as luzes apagadas no período das 19hs as 7hs), com ração padronizada e água “*ad libitum*”.

O máximo de precaução foi tomado com o intuito de minimizar o sofrimento e de reduzir o número de animais utilizados, sendo que todos os experimentos estiveram de acordo com os critérios estabelecidos no “Guide for Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication No. 80-23, revised 1996).

3.2 Procedimentos

3.2.1 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 5), sempre entre as 14hs e 17hs. Nenhum choque elétrico foi utilizado neste estudo.



Figura 5 Esteira ergométrica adaptada para ratos

Para determinar a velocidade de corrida que seria utilizada durante os treinos foi utilizada a medida de consumo máximo de oxigênio indireto (VO_2 máx) recomendada por Brooks e White (1987). Cada animal correu na esteira a uma velocidade inicial baixa seguida por incrementos de 5m/min a cada 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 índice da capacidade de exercício e usados para a mensuração de VO_2 máx 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), pelo mesmo tempo, porém sem realizar a corrida, sendo submetidos à esteira sem movimento durante 5 minutos. 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.

3.2.2 Desenho Experimental

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais: EXE e SED. O efeito do exercício sob a atividade das enzimas HAT e HDAC foi verificado através de diferentes protocolos: Sessão única de exercício e treinamento crônico.

3.2.2.1 Protocolo 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.

3.2.2.2 Protocolo 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.

Em ambos os protocolos, os animais foram mortos em 3 diferentes tempos após o treino: imediatamente (EXEim, SEDim, correspondendo ao período da tarde), 1 hora (EXE1h, SED1h, correspondendo ao período da tarde) e 18 horas (EXE18h, SED 18h correspondendo ao período da manhã), conforme mostra a Figura 6.

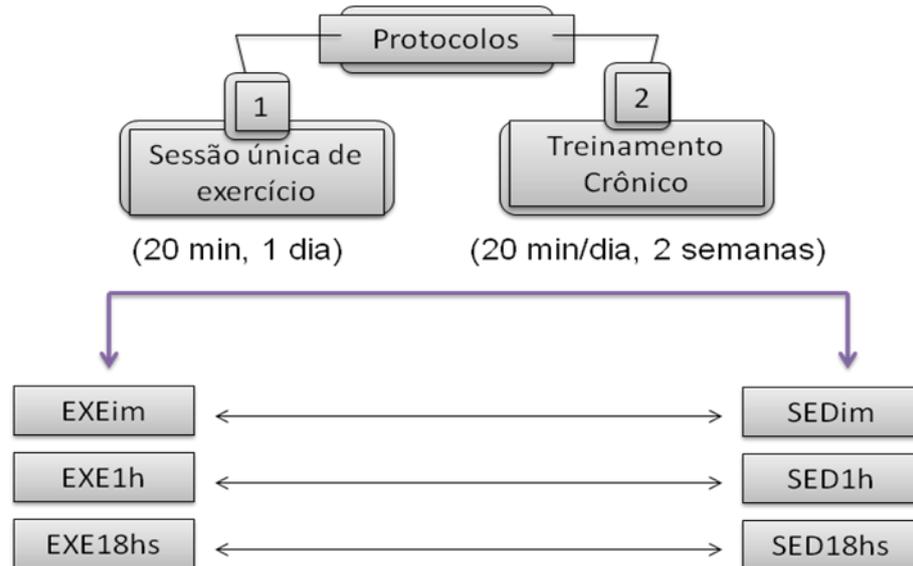


Figura 6 Esquema do Desenho Experimental.

3.3 Dissecação e preparação das amostras

Os ratos foram mortos por decapitação e os hipocampus foram rapidamente dissecados. 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).

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

A concentração de proteína para cada amostra 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 mensurada através de um kit-ELISA disponível comercialmente de acordo com as instruções do fabricante (Detecção Fluorimétrica, catálogo #17-372, Upstate Biotechnology).

Primeiramente, pipetou-se em cada poço 5 μ L de tampão, 5 μ L de amostra e 10 μ L de substrato e incubou-se a placa por 60min a 30°C. Após, placa foi incubada por 15min a temperatura ambiente com 10 μ L de solução ativadora (em cada poço). Finalmente leu-se a placa em um leitor de placas de fluorescência (excitação=360nm, emissão=450nm) durante 60min e expressos como pmoles de HDAC por mg de proteína.

3.5 Atividade da enzima HAT

O efeito do exercício sob a atividade da enzima HAT foi mensurado através de um kit-ELISA disponível comercialmente de acordo com as instruções do fabricante (Detecção Colorimétrica, catálogo #17-279, Upstate Biotechnology). Este kit baseia-se na utilização das histonas H3 e H4 e permite a comparação direta da atividade da enzima HAT em suas respectivas caudas amino-terminais, as quais são suscetíveis a alterações pós traducionais. Primeiramente, uma placa (96 poços) preenchida com estreptavidina foi incubada por 30min a temperatura ambiente com 100 μ L de 1 μ g/mL de histona H3, e outra com 100 μ L de 1 μ g/mL de histona H4. Os poços foram lavados 5 vezes com TBS e incubados com 200 μ L de BSA 3% por 30min a 30°C. Para induzir a acetilação das histonas, os poços foram novamente lavados com TBS, adicionou-se em cada poço 50 μ L da reação de coquetel (composta de 10 μ L tampão, 10 μ L de acetil-CoA, 5 μ L de amostra e 25 μ L de H₂O destilada) e a placa foi incubada por 40min a 30°C. Após 5 lavagens com TBS, pipetou-se em cada poço 100 μ L de anticorpo anti-acetil-lisina (1:2500 diluído em TBS) e a placa foi incubada por 1h30min a temperatura ambiente. Depois disso, lavou-se a placa 5 vezes com TBS, pipetou-se 100 μ L de conjugado IgG com HRP (1:500 diluído em TBS) em cada poço e incubou-se a placa por 30min a temperatura ambiente. Finalmente, adicionou-se 100 μ L de mistura de substrato de TMB em cada poço, incubou-se a placa no escuro por 10min e pipetou-se 50 μ L de H₂SO₄ em cada poço com a finalidade de parar a reação de HPR. As alterações colorimétricas foram mensuradas através de um leitor de placas em dois comprimentos de ondas, 450nm e 570nm e expressos como ng de histona acetilada por mg de proteína.

3.6 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 Duncan, onde os fatores considerados foram a prática de exercício e o tempo 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 erro padrão.

3.7 Aprovação pelo Comitê de Ética

Este trabalho foi apresentado na forma de projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEP/UFRGS) e foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 09-123.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade global da HDAC

4.1.1 Atividade global da HDAC no Protocolo 1: Sessão única de exercício

A sessão única de exercício alterou significativamente a atividade da HDAC no hipocampo dos ratos. O grupo exercitado apresentou menor atividade da HDAC quando comparado com o grupo sedentário imediatamente e 1 hora após o treinamento ($F_{(2,18)} = 38.400$, $P < 0,001$), conforme mostra a figura 7A. Ainda, observou-se a influência do fator tempo após treino na atividade da HDAC, uma vez que esta estava significativamente aumentada em ambos os grupos, SED e EXE, no tempo 18 horas após o treino (correspondendo ao período da manhã em comparação aos tempos imediatamente e 1 hora após o treino (correspondendo ao período da tarde ($F_{(2,18)} = 23.279$, $P < 0,001$; Fig 7A).

4.1.2 Atividade global da HDAC no Protocolo 2: Treinamento crônico

O treinamento crônico não teve efeito na atividade da HDAC no hipocampo dos ratos (Fig 7B).

A ANOVA de duas vias mostrou que não há interação entre os dois fatores, exercício e tempo após treino em ambos os protocolos.

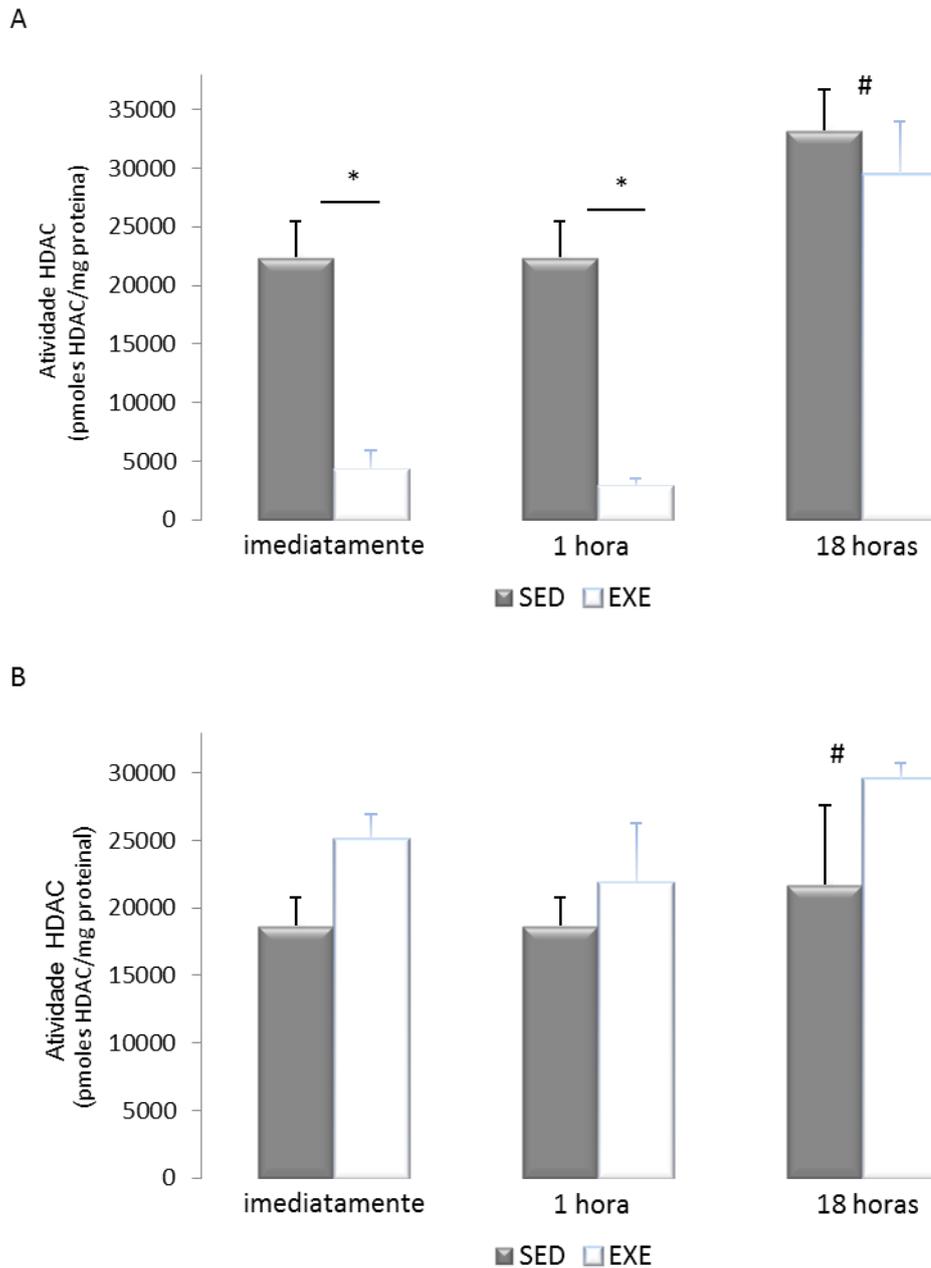


Figura 7 Efeito do exercício na atividade global da HDAC em hipocampo de ratos (Figura A) Sessão única de exercício-20 min (Figura B) Treinamento crônico-2 semanas, 20min/dia. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3-5 animais por grupo). * Valores significativamente diferentes entre os grupos EXE e SED; # Valores significativamente diferentes de imediatamente e 1 hora, determinados por ANOVA seguido do Teste de Duncan ($p < 0,05$).

4.2 Atividade da HAT

Para definir a especificidade das modificações em histonas induzidas pelo exercício, foram avaliadas as atividades de HAT em duas diferentes histonas: histona H3 e histona H4.

4.2.1 Atividade da HAT no Protocolo 1: Sessão única de exercício

A sessão única de exercício alterou significativamente a atividade da histona H4, mas não teve efeito na histona H3 no hipocampo dos ratos (Fig 8A, Fig 8B).

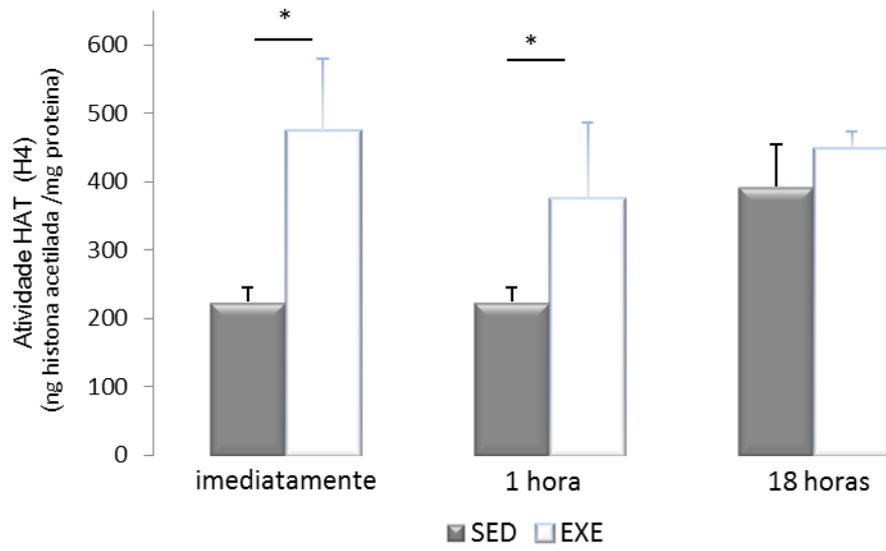
O grupo exercitado apresentou maior atividade da HAT na histona H4 quando comparado com o grupo sedentário imediatamente e 1 hora após o treinamento ($F_{(2,24)} = 8.769$, $P = 0,002$).

4.2.2 Atividade da HAT no Protocolo 2: Treinamento crônico

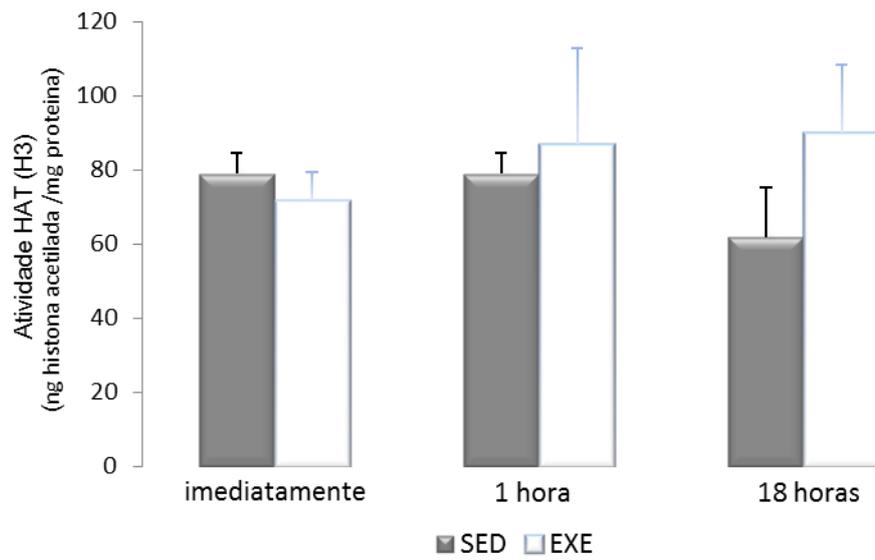
O treinamento crônico não teve efeito na atividade da HAT, tanto na histona H3 quanto na histona H4 no hipocampo dos ratos

Não se observou a influência do fator tempo após treino na atividade da HAT. Além disso, a ANOVA de duas vias mostrou que não há interação entre os dois fatores, exercício e tempo após treino em ambos os protocolos.

A



B



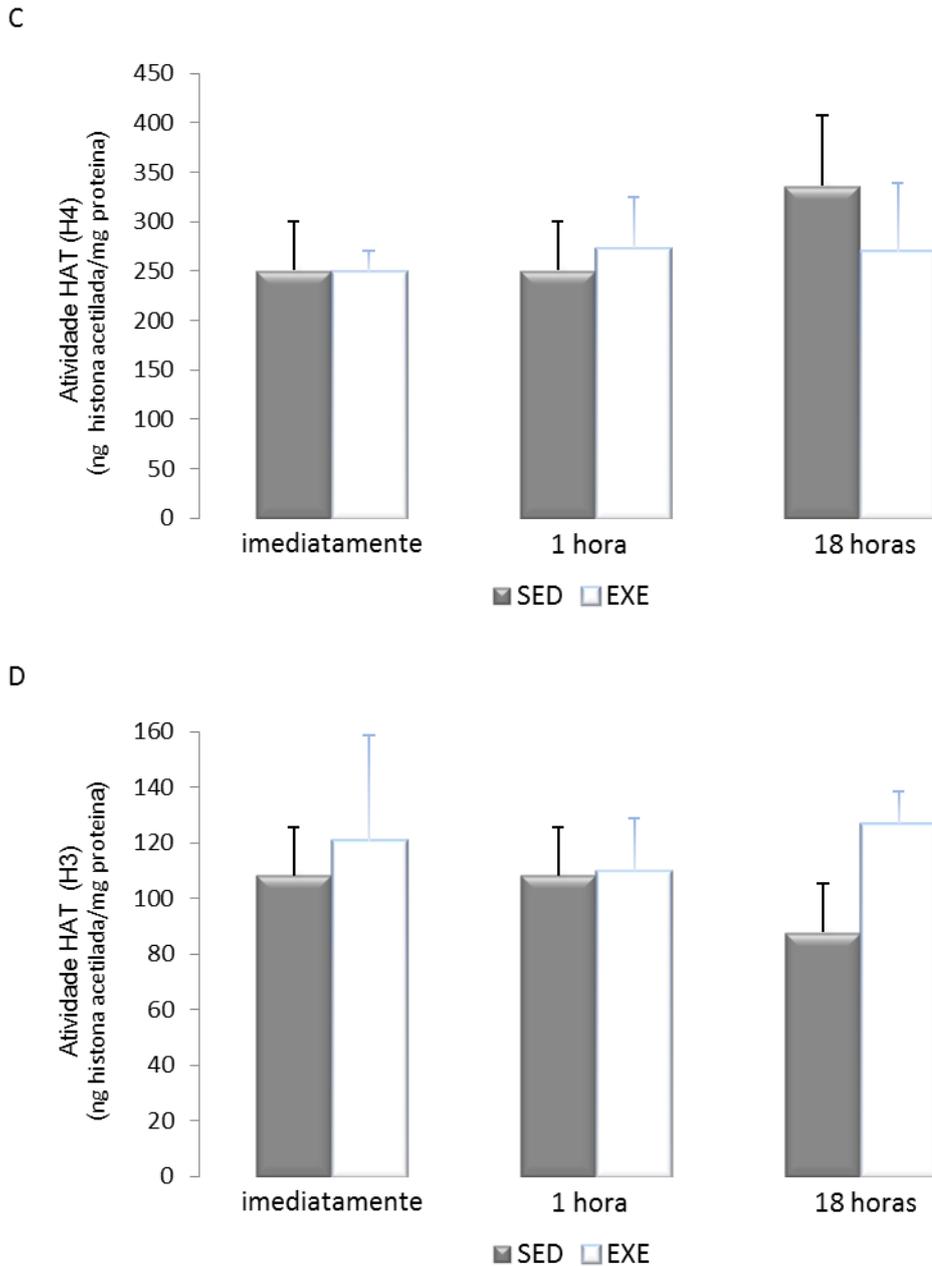


Figura 8 Efeito do exercício na atividade da HAT na histona H4 e histona H3 em hipocampo de ratos (respectivamente Figuras A e B, sessão única de exercício-20 min; e Figuras C e D, Treinamento crônico-2 semanas, 20min/dia. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3-5 animais por grupo). * Valores significativamente diferentes entre os grupos EXE e SED, determinados por ANOVA seguido do Teste de Duncan ($p < 0,05$).

4.3 Balanço entre a atividade HAT/HDAC

4.3.1 Balanço entre a atividade HAT/HDAC no Protocolo 1: Sessão única de exercício

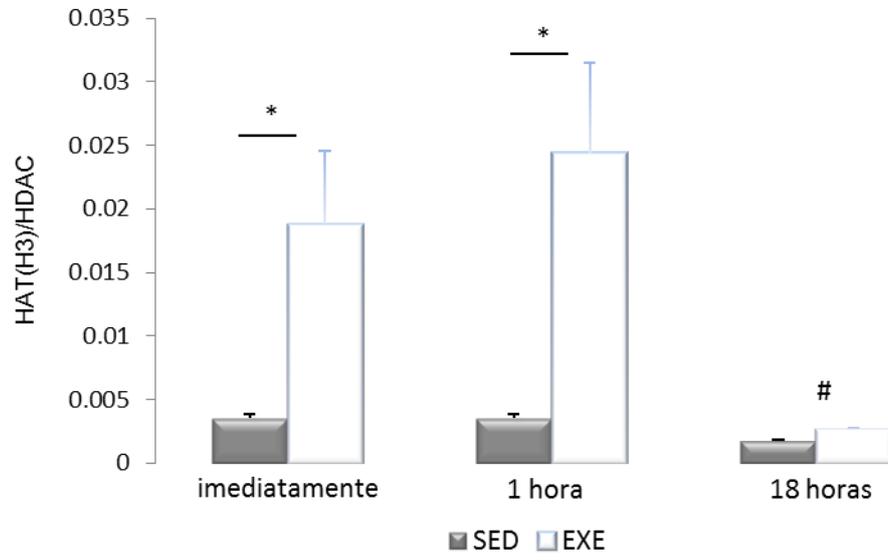
A sessão única de exercício alterou significativamente a relação HAT/HDAC em ambas as histonas, H3 e H4 no hipocampo de ratos. O grupo exercitado apresentou uma maior relação HAT/HDAC quando comparado com o grupo sedentário, imediatamente e 1 hora após o treinamento ($F_{(2,17)} = 15.118$, $P < 0,001$; $F_{(2,19)} = 9.588$, $P = 0,002$; Fig 9A, Fig 9B, respectivamente), um indicativo de hiperacetilação de histonas. Ainda, observou-se a influência do fator tempo após treino no balanço HAT/HDAC, uma vez que a relação estava significativamente diminuída em ambos os grupos, SED e EXE, no tempo 18 horas após o treino em comparação aos tempos imediatamente e 1 hora após o treino ($F_{(2,17)} = 11.923$, $P = 0,001$; $F_{(2,19)} = 7.263$, $P = 0,005$; Fig 9A, Fig 9B, respectivamente).

4.3.2 Balanço entre a atividade HAT/HDAC no Protocolo 2: Treinamento crônico

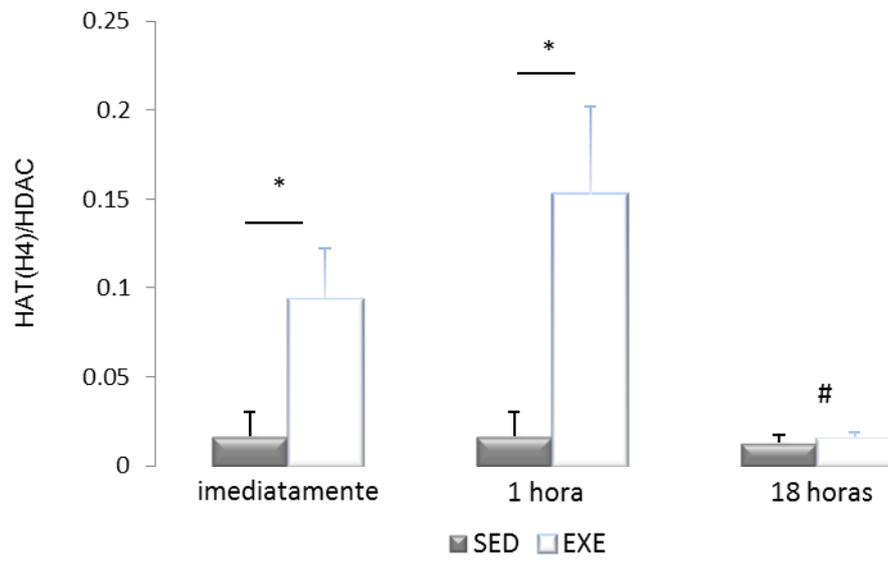
O treinamento crônico não teve efeito na relação HAT/HDAC no hipocampo dos ratos, tanto na histona H3, quanto na histona H4 (Fig 9C, Fig 9D, respectivamente).

A ANOVA de duas vias mostrou que não há interação entre os dois fatores, exercício e tempo após treino em ambos os protocolos.

A



B



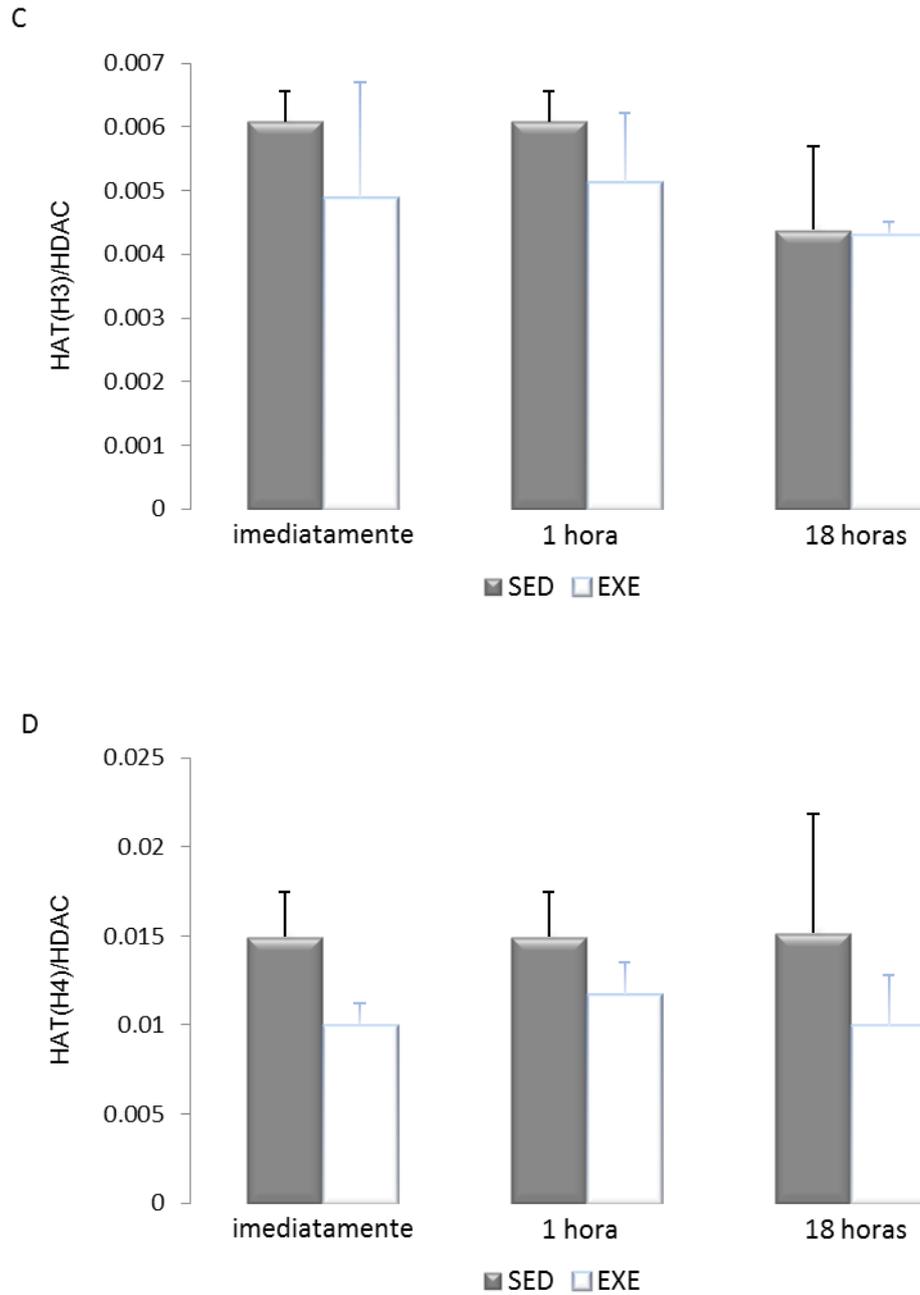


Figura 9 Efeito da sessão única de exercício-20 min (Histona H3, Figura A; Histona H4, Figura B) e do treinamento crônico-2 semanas, 20min/dia (Histona H3, Figura C; Histona H4, Figura D) no balanço HAT/HDAC em hipocampo de ratos. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3-5 animais por grupo). * Valores significativamente diferentes entre os grupos EXE e SED, determinados por ANOVA seguido do Teste de Duncan ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram que o exercício pode modular o estado de acetilação de histonas, uma vez que alterou a atividade das enzimas HAT e HDAC. Especificamente, o exercício parece induzir acetilação de histonas, através do aumento da atividade da HAT em combinação com diminuição na atividade da HDAC em hipocampo de ratos.

É importante ressaltar que avaliamos a atividade dessas enzimas no hipocampo devido à plasticidade neuronal evidente que esta região cerebral está sujeita, bem como ao potencial que o exercício físico tem para modificar eventos moleculares nesta região (Gross, 2000).

Sabe-se que o aumento da acetilação de histonas é associado com alta atividade transcricional, enquanto que o seu decréscimo, com repressão da expressão gênica (Strahl and Allis, 2000; Wade, 2001). Assim, nossos achados podem estar relacionados com obtidos em outros estudos, os quais mostraram um aumento na expressão gênica induzido pelo exercício, inclusive em estruturas cerebrais de ratos adultos (Mahoney et al., 2005, Lou et al., 2008).

Tem sido proposto que as HAT apresentam certo grau de especificidade, podendo ter efeitos diferentes dependendo das histonas em que agem (Turner, 2000). Com base nisso, avaliamos o efeito do exercício na atividade da HAT em diferentes histonas, histona H3 e histona H4. Em concordância, observamos que o exercício aumentou a atividade da HAT na histona H4, mas não teve efeito na histona H3.

Achados recentes vêm demonstrando o envolvimento da enzima HAT na memória e na neuroproteção (Selvi et al., 2010), onde a perda de coativadores que apresentam atividade HAT, como a p300 e a CBP (proteína de ligação ao CREB, que é a Proteína Ligadora ao Elemento Responsivo ao AMPc) está associada a desordens neurodegenerativas. A redução da disponibilidade da CBP tem sido verificada em vários modelos de insulto neuronal (Rouaux et al., 2003; Jiang et al., 2003). Em uma cultura primária de neurônios cerebelares submetido à privação neurotrófica, um clássico modelo de apoptose neuronal *in vitro*, por exemplo, Rouaux e colegas (2003) observaram que além da desacetilação das histonas H3 e H4 precederem a morte neuronal, esta desacetilação estava acompanhada pelo desaparecimento da CBP. Os autores sugerem que a CBP

pode ser seletivamente clivada acima da caspase-6, uma caspase efetora, podendo conseqüentemente levar à apoptose celular.

Em concordância, tem sido proposto que a desacetilação global de histonas parece aumentar no processo inicial de apoptose neuronal na neurodegeneração (Rouaux et al., 2003), além de que uma elevada atividade da HDAC é observada durante o processo de morte neuronal (Saha e Pahan, 2006). Com base nisso, pesquisas vêm demonstrando que o uso de inibidores de HDAC, tais como Valproato de Sódio (VPA), Butirato de Sódio (NaBt) e Tricostatina A (TSA), são alternativas eficientes no tratamento de várias desordens neurodegenerativas e na manutenção e regulação da plasticidade neuronal.

Está descrito que inibidores de HDAC afetam a formação da memória (Fontán-Lozano et al, 2008, Lubin et al., 2008, Korzus et al., 2004) e apresentam atividade neuroprotetora em modelos de isquemia (Katchanov et al., 2001; Gardian et al., 2005). Ainda, Ryu et al (2003) demonstraram que inibidores de HDAC foram capazes de reverter a apoptose neuronal induzida pelo estresse oxidativo, o qual tem sido associado em várias desordens neurodegenerativas tais como doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington, isquemia e Esclerose Múltipla. Com base nisso, a diminuição na atividade da HDAC observada nos animais exercitados em comparação aos sedentários parece ser um promissor mecanismo de ação envolvido com os efeitos neuroprotetores do exercício.

Outro ponto a discutir é que o possível aumento nos níveis de acetilação de histona induzido pelo exercício, refletido através da atividade da HAT e da HDAC, apresentou curta duração, ou seja, foi significativo imediatamente e 1 hora após o treinamento. Até o momento não existiam estudos que avaliassem os efeitos do exercício físico sobre mecanismos epigenéticos no cérebro, em especial, sobre a atividade das enzimas HAT e HDAC. No entanto, nossos achados podem estar relacionados com os de McGee e colegas (2009), os quais verificaram que o exercício pode induzir acetilação de histonas em músculo esquelético de humanos no período imediato após o treino. Estudos prévios também têm demonstrado um padrão semelhante, onde tratamentos alteraram esse parâmetro apenas por um curto período de tempo. Por exemplo, os níveis de acetilação de histona aumentaram significativamente 1 hora, mas não foram alterados 24 horas, após condicionamento contextual de medo (Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2006). Este achado também é suportado pelos resultados de Chandramohan et

al. (2008), onde o nado forçado aumentou os níveis de fosfoacetilação de histona até 4 horas, mas não teve efeito 24 horas após o treino. Ainda, Federman e colegas (2009) constataram que a acetilação de histona aumentou no cérebro de caranguejos 1 hora após o treino, retornando aos níveis basais após 6 horas.

Além de avaliar a atividade da HAT e da HDAC, este estudo também determinou o balanço HAT/HDAC. Demonstramos que a sessão única de exercício pode induzir um estado de hiperacetilação de histonas como resultado do aumento da relação HAT/HDAC (Laberge et al., 2005; Rajendrasozhan et al., 2008), enquanto que o protocolo de exercício crônico não induziu efeito neste parâmetro. Esses dados nos permitem sugerir que a hiperacetilação induzida pelo exercício pode estar envolvida, pelo menos em parte, com os efeitos neuroprotetores do exercício agudo.

As diferenças observadas entre os efeitos causados pelos protocolos, ou seja, pelo exercício crônico e pela sessão única de exercício sobre a atividade da HAT e da HDAC não são surpreendentes, uma vez que já está descrito que as respostas fisiológicas associadas ao exercício físico dependem do protocolo de treinamento utilizado, variando conforme frequência, duração e intensidade do esforço (Narath et al., 2001).

Sabe-se que tanto no exercício agudo quanto no crônico, a atividade hipocampal está aumentada (Holschneider et al., 2007), porém a liberação do neurotransmissor é diferente. Em fases mais agudas, a liberação de glutamato está aumentada (Bland et al., 1999; Leung et al., 2006) enquanto após o sétimo dia sofre queda na concentração (Leung et al., 2006). Em consequência da liberação distinta de glutamato, a ativação de genes relacionados com a plasticidade também é diferente na fase aguda e crônica do exercício. Molteni e colegas (2002) observaram diferentes respostas na expressão de genes em hipocampo de ratos, dependendo do tipo de exercício, agudo ou crônico. O subtipo de receptor glutamato NMDA –NR1, por exemplo, apresentou pico de expressão gênica após 3 dias de corrida, sofrendo decréscimo gradativo após 7 e 20 dias.

Além disso, nossos resultados corroboram achados anteriores, os quais evidenciam que o exercício crônico induz adaptações em muitos sistemas fisiológicos, tais como cardiovascular, muscular e endócrino (Meeusen et al., 1997; Gresch et al., 1994; Dluzen et al., 1995). Como mencionado anteriormente,

não existem outros estudos que avaliem o efeito do exercício sobre as alterações epigenéticas no cérebro. No entanto, McGee e Hargreaves (2011) mostraram recentemente uma estreita relação entre as adaptações do exercício crônico e a modificação de histonas no músculo esquelético de humanos. Todas estas evidências nos fazem pensar na hipótese de que, assim como acontece em vários sistemas fisiológicos, o exercício crônico também parece causar uma adaptação no sistema HAT-HDAC, e conseqüentemente nos níveis de acetilação de histonas.

Conforme já descrito, as atividades de HAT e de HDAC podem regular o estado de condensação da cromatina, o que influencia diretamente o processo de transcrição de genes específicos. Ainda neste contexto, também têm sido descrito níveis de acetilação diminuídos em vários modelos de neurodegeneração, tanto celular quanto *in vivo* (Rouaux et al., 2004; Saha e Pahan, 2006; Sleiman et al., 2009), sendo que este evento é associado com aumento na atividade da HDAC e com diminuição na atividade da HAT (Saha e Pahan, 2006). Todas essas evidências nos remetem a inferir a possibilidade de que a modulação nos níveis de acetilação de histonas, tanto através do uso de ativadores da HAT e inibidores da HDAC, quanto pelo exercício físico, pode restabelecer o balanço transcricional, sugerindo-os como recursos terapêuticos no tratamento de desordens neurodegenerativas.

Outro achado relevante deste estudo é que além do balanço HAT/HDAC ser modulado pelo exercício, ele também pode sofrer influência do fator tempo após treino, uma vez que a relação foi significativamente menor em ambos os grupos, SED e EXE, no tempo 18 horas após o treino (correspondendo ao período da manhã em comparação aos tempos imediatamente e 1 hora após o treino (correspondendo ao período da tarde). Este achado pode estar relacionado à cronobiologia, onde a organização circadiana permite que o organismo mantenha a homeostase em resposta a variações diárias decorrentes do ambiente externo e do próprio corpo (Moore-Ede, 1986; Sharma, 2003). Cabe descrever que os ratos, por exemplo, são animais notívagos, onde o período da manhã é o início do período de sono; assim, poderíamos sugerir uma redução da acetilação e uma conseqüente redução na expressão gênica nesse período.

Além disso, tem sido descrito que o ritmo circadiano pode influenciar na potência e toxicidade de drogas, cujos efeitos variam conforme a hora do dia que

são administradas (Ohdo, 2003; Debon et al., 2004). Assim, nossos dados permitem acreditar que os efeitos dos inibidores de HDAC também possam variar conforme a hora de administração destes fármacos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo permitem concluir que:

- O exercício pode modular o nível de acetilação de histonas, uma vez que aumentou a atividade da Histona Acetiltransferase (HAT) e diminuiu a atividade da Histona Desacetilase (HDAC), bem como aumentou o balanço da relação HAT/HDAC, um indicativo de hiperacetilação de histonas em hipocampos de ratos Wistar;

- A modulação da atividade da HAT e da HDAC depende do tipo de protocolo de exercício utilizado, uma vez que os exercícios agudos e crônicos apresentaram diferentes efeitos na atividade destas enzimas;

- O efeito do exercício sobre a atividade da HAT e da HDAC teve início rápido e apresentou curta duração;

-A hora do dia pode influenciar na atividade da HAT e da HDAC;

- Não houve interação entre os dois fatores, exercício e hora do dia em ambos os protocolos de exercício.

De uma forma geral, nossos resultados apóiam a hipótese de que a neuroproteção causada pelo exercício de intensidade moderada em esteira ergométrica pode estar relacionado, pelo menos em parte, com os níveis de acetilação de histonas através da modulação da atividade da HAT e HDAC.

Outros estudos são necessários para esclarecer os mecanismos detalhados pelos quais o exercício pode modular a acetilação de histonas e as atividades das enzimas HAT e HDAC.

7 PERSPECTIVAS

- Verificar a modulação das atividades das enzimas HAT e HDAC em diferentes estruturas encefálicas (tais como córtex e estriado) de ratos submetidos ao protocolo neuroprotetor de exercício físico;

- Investigar a influência do ritmo circadiano sobre os efeitos neuroprotetores do exercício através de padrões temporais diferentes de treinamento;

- Quantificar os níveis de BDNF e da acetilação de histonas nas estruturas encefálicas;

- Correlacionar a atividade das enzimas HAT e HDAC com os níveis de BDNF da acetilação de histonas.

9 REFERÊNCIAS

- Alaei H, Borjeian L, Azizi M, Orian S, Pourshanazari A, Hanninen O (2006), Treadmill running reverses retention deficit induced by morphine. *Eur J Pharmacol* 536: 138–141.
- Anderson JB, Rapp ND, Baek HD, McCloskey PD, Coburn-Litvak SP, Robinson KJ (2000), Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiol & Behav* 70:425-429.
- Ang ET, Dawe GS, Wong PTH, Moochhala S (2006), Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res* 1113: 186–193.
- Angelov D, Vitolo JM, MutskovV, Dimitrov S, Hayes JJ (2001), Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 98: 6599–6604.
- Anisman H, Merali Z, Stead J D (2008), Experiential and genetic contributions to depressive- and anxiety-like disorders: clinical and experimental studies. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1185-1206.
- Arida RM, Scorza FA, dos Santos NF, Peres CA, Cavalheiro EA (1999), Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res* 37:45–52.
- Barnes CA, Forster MJ, Fleshner M, Ahanotu EN, Laudenslager ML, Mazzeo RS, Maier SF, LAL H. (1991), Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody response in aged F-344 rats. *Neurobiol Aging* 12: 47-53.
- Bates GP (2001), Huntington's disease. Exploiting expression. *Nature* 413:691-694.
- Berchtold NC, Chinn G, Choum, Kessler JP, Cotman CW (2005), Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the

- rat hippocampus. *Neurosci* 133: 853–861.
- Bird A. (2007), Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396–398.
- Black JE, Greenough WT, Anderson BJ, Isaacs KR (1987), Environment and the aging brain. *Can Journal Psychol* 41: 111-130.
- Blustein JF, Mclau Ghlin M, Holfman JR (2006), Exercise effects stress-induced analgesia and spatial learning in rats. *Physiol Behav* 89: 582–586.
- Boutillier AL, Trinh E, Loeffler JP (2003), Selective E2F-dependent gene transcription is controlled by histone deacetylase activity during neuronal apoptosis. *J Neurochem* 84:814–828.
- Bradford MM (1976), A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:218–254.
- Brooks GA, White TP (1978), Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 45:1009–1015.
- Cechetti F, Rhod A, Simão F, Santin K, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR (2007), Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* 1157: 121–125.
- Chandramohan Y, Droste SK, Arthur JS, Reul JM (2008), The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-d-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *Eur J Neurosci* 27:2701–2713.
- Chen HI, Lin LC, Yu L, Liu YF, Kuo YM, Huang AM, Chuang JI, Wu FS, Liao PC, Jen CJ (2007), Treadmill exercise enhances passive avoidance learning in rats: the role of down-regulated serotonin system in the limbic system. *Neurobiol Learn*

Mem 89:489-496.

Chennaoui M, Drogou C, Gomez-Merino D, Grimaldi B, Fillion G, Guezennec CY (2001), Endurance training effects on 5-HT_{1B} receptors mRNA expression in cerebellum, striatum, frontal cortex and hippocampus of rats. *Neurosci* 307:33-36.

Choi JK, Howe LJ (2009), Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem Cell Biol* 87:139–150.

Chwang WB, O’Riordan KJ, Levenson JM, Sweatt JD (2006), ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem* 13:322–328.

Coles K, Tomporowski PD (2008), Effects of acute exercise on executive processing, short-term and long-term memory. *J Sports Sci* 26: 333–344.

Cotman CW, Berchtold NC (2002), Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25: 295–30.

Debon R, Boselli E, Guyot R, Allaouchiche B, Lemmer B, Chassard D (2004), Chronopharmacology of intrathecal sufentanil for labor analgesia: daily variations in duration of action. *Anesthesiol* 101:978–982.

Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW (2006), Neurobiology of exercise. *Obesity* 14: 345-356.

Dluzen D, Liu B, Chen C, DiCarlo S (1995), Daily spontaneous running alters behavioral and neurochemical indexes of nigrostriatal function. *J Appl Physiol* 78:1219-1224.

Drummond MJ, Vehrs PR, Schaalje GB, Parcell AC (2005), Aerobic and resistance exercise sequence affects excess postexercise oxygen consumption. *J Strength Cond Res* 19:332-7.

Duman RS (2005), Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet

and metabolism. *Neurobiol Aging* 1:88-93.

During MJ, Cao L (2006), VEGF a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. *Curr Alzheimer Res* 3: 29–33.

Dustman RE, Ruhling RO, Russell EM, Shearer DE, Bonekat HW, Shigeoka JW, Wood JS, Bradford DC (1984), Aerobic exercise training and improved neuropsychological function of older adults. *Neurobiol of Aging* 35-42.

Elsayed M, Ismail AH, Young RJ (1980), Intellectual differences of adult men related to age and physical fitness before and after an exercise program. *J Gerontol* 35:383-7.

Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmon SN, Kuo CJ, Palmer TD (2003), VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18: 2803–2812.

Federman N, Fustiñana, MS, Romano A (2009), Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. *Learn Mem* 16:600–606.

Feinberg AP (2008), Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA* 299:1345-50.

Feng J, Fouse S, Fan G (2007), Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. *Pediatr Res* 61 (5 Pt 2): 58R-63R.

Foley DL, et al. (2009), Prospects for epigenetic epidemiology. *Am J Epidemiol* 169:389–400.

Fontán-Lozano A, Romero-Granados R, Troncoso J, Múnera A, Delgado-García JM, Carrión AM (2008), Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Mol Cell Neurosci* 39:193–201.

- Fordyce DE, Farrar RP (1992), Physical activity effects on hippocampal and parietal cortical cholinergic function and spatial learning in F344 rats. *Behav Brain Res* 43:115-2.
- Gardian G, Browne SE, Choi DK, Klivenyi P, Gregorio J, Kubilus JK, Ryu H, Langley B, Ratan RR, Ferrante RJ, Beal MF (2005), Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Biol Chem* 280:556–563.
- Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR 2002, Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol* 88: 2187-95.
- Gräff, J, Mansuy IM (2008), Epigenetic codes in cognition and behavior. *Behav Brain Res* 70:87.
- Gresch P, Sved A, Zigmond M, Finlay J (1994), Stress-induced sensitization of dopamine and norepinephrine in medial prefrontal cortex of the rat. *J Neurochem* 63:575-583.
- Gross CG (2000), Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Rev Neurosci* 1:67-73.
- Håheim Holme LL, Hjermann II, Leren P (1993), Risk factors of stroke incidence and mortality: a 12-year follow-up of the Oslo Study. *Stroke* 24:1484–1489.
- Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan SV (2010), Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol Med* 16:7–16.
- Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden PA et al (2003), Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2041-2046.

- Holschneider DP, Yang J, Guo Y, Maarek J-MI. (2007), Reorganization of Functional Brain Maps After Exercise Training: Importance of Cerebellar-Thalamic-Cortical Pathway, *Brain Res* 1184:96-107.
- Huang AM, Jen CJ, Chen HF, Yu L, Kuo YM, Chen HI (2006), Compulsive exercise Acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neural transm* 113: 803–811.
- Hughes RE, Lo RS, Davis C, Strand AD, Neal CL, Olson JM, Fields S (2001), Altered transcription in yeast expressing expanded polyglutamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13201–13206.
- Ichikawa T (2001), Mutual coupling among insect neurosecretory cells with an ultradian firing rhythm. *Neurosci Lett* 299:73-76.
- Isaac s KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Black JE, Greenough WT (1992), Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 110–119.
- Jiang H, Nucifora FC, Jr, Ross CA, DeFranco DB (2003), Cell death triggered by polyglutamine-expanded huntingtin in a neuronal cell line is associated with degradation of CREB-binding protein. *Hum Mol Genet* 12:1–12.
- Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Bruck W, Hortnagl H, Dirnagl U, Bhide PG and Endres M (2001), Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci* 21: 5045–5053.
- Kim HJ, Rowe M, Ren M, Hong JS, Chen PS, Chuang DM (2007), Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther* 321:892–901.

- Kimura A, Matsubara K, Horikoshi M (2005), A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *J Biochem* 138:647–662.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004), CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 42:961–972.
- Kouzarides T (2007), Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705.
- Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A (1999), Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400:418–419
- Kuo M H, Allis C D (1998), Role of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 20:615-26.
- Laberge RM, Boissonneault G (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* 73:289–296.
- Lee IM, Paffenbarger RS (1998), Jr. Physical activity and stroke incidence: the Harvard Alumni Health Study. *Stroke* 29:2049-54.
- Leung LY, Tong KY, Zhang SM, Zeng XH, Zhang KP, et al. (2006), Neurochemical effects of exercise and neuromuscular electrical stimulation on brain after stroke: a microdialysis study using rat model. *Neurosci Lett* 397: 135–139.
- Levenson JM, O’Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD (2004), Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279:40545–40559.
- Lou SJ, Liu JY, Chang H, Chen PJ (2008), Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. *Brain Res* 1210:48–55.
- Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2008), Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 28:10576–10586.
- Lund and Lohuizen (2004), Lund A H, Lohuizen M V. Epigenetics and cancer. *Genes*

Dev 18:2315-3.

MacDonald JL, Roskams AJ (2009), Epigenetic regulation of nervous system development by DNA methylation and histone deacetylation. *Prog Neurobiol* 88: 170–183.

Mahabir S, Leitzmann MF, Pietinen P, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR (2004), Physical activity and renal cell cancer risk in a cohort of male smokers. *Int J Cancer* 108:600-5.

Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA (2005), Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *Faseb J* 19: 1498-1500.

Mattson MP (2000), Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res* 886:47-53.

Meeusen R, Smolders I, Sarre IS, Meirleir K de, Keizer H, Serneels M, Ebinger G, Y. Michotte, Endurance training effects on neurotransmitter release in rat striatum: an in vivo microdialysis study, *Acta Physiol Scand* 159 (1997) 335–341.

McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M (2009), Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *J Physiol* 587:5951-8

Mcgee SL, Hargreaves M (2011), Histone modifications and exercise adaptations. *J App Physiol* 110: 258-263

McKinsey CL, Zhang and EN (2001) Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 11:497–504.

Molteni R. et al. (2002), Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur J Neurosci* 16: 1107–1116.

Mondon CE, Dolkas CB, Sims C, Reaven GM (1985), Spontaneous running activity in

- male rats: effect of age. *J Appl Physiol* 58:1553-1985.
- Moore-Ede MC (1986), Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am J Physiol* 250:R737-752.
- Muller JE (1999), Circadian variation in cardiovascular events. *Am J Hypertens* 12:35S-42S.
- Murrell A, Rakyan VK, Beck S (2005), From genome to epigenome. *Hum Mol Genet* 14 Spec 1:3-10.
- Narath E, Skalicky M, Viidik A (2001), Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Exp Gerontol* 36:1699 –1711.
- Neeper S, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C (1996), Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res* 726:49–56.
- Nóbrega ACL, Araújo CGS (1988), Medicina do exercício: o que é ensinado nos cursos de graduação médica brasileiros. *Rev Bras Educ Méd* 12:69–72.
- Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, Radák Z (2005), The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem Int* 46: 635–640.
- Ohdo S (2003), Changes in toxicity and effectiveness with timing of drug administration: implications for drug safety. *Drug Saf* 26:999-1010.
- Patel AV, Press MF, Meeske K, Calle EE, Bernstein L (2003), Lifetime recreational exercise activity and risk of breast carcinoma in situ. *Cancer* 98:2161-9.
- Pavlova MK, Shea SA, Bromfield EB (2004), Day/night patterns of focal seizures. *Epilepsy Behav* 5:44-9.
- Pysh JJ, Weiss GM (1979), Exercise during development induces and increases in

- Purkinje cell dendritic tree size. *Science* 206:230-231
- Radák Z, Kaneco T, Tahara S, Nakato H, Pucsok J, Sasvári M, Nyakas C, Goto S (2001), Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int* 38:17–23.
- Radák Z, Goto S, Tahara S, Kaneco T, Kumagai S, Berkes I, Ogonovszky H (2005), The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem Int* 46:635-640.
- Radák Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S (2006), The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int* 49:387-392.
- Raglin JS (1990), Exercise and mental health. Beneficial and detrimental effects. *Sports Med* 9:323-9.
- Rajendrasozhan S, Yang S, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I (2008), Deacetylases and NF- κ B in Redox Regulation of Cigarette Smoke induced Lung Inflammation: Implications in Pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal* 4:799–811.
- Rodenhiser D, Mann M. (2006), Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CAMJ* 174:341-48.
- Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, Boutillier AL (2003), Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J* 22:6537–6549.
- Rouaux C, Loeffler JP, Boutillier AL (2004), Targeting CREB-binding protein (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders, *Biochem Pharmacol* 68:1157–1164.
- Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB (2001), DNA methylation,

- chromatin inheritance, and cancer. *Oncog* 20:3156-3165.
- Russel JC, Epling WF, Perce D, Amy RM, Boer DP (1987), Induction of voluntary prolonged running by rats. *J Appl Physiol* 63:2549-2553.
- Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW (1999), Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain-derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacol* 21:679-682.
- Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW (2000), Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. *Neurosci* 101:305-312.
- Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD (1996), Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Ryu H, Lee J, Olofsson BA, Mwidau A, Dedeoglu A, Escudero M, Flemington E, Azizkhan-Clifford J, Ferrante RJ, Ratan RR (2003), Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4281–4286.
- Sacco RL, Gan R, Boden-Albala B, Lin IF, Kargman DE, Hauser A, Shea S, Paik MC (1998), Leisure-time physical activity and ischemic stroke risk: the Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke* 29:380-387.
- Saha RN, Pahan K (2006), HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ* 13:539–550.
- Salmon P (2001), Effect of physical exercise on anxiety, depression and sensitivity to stress: a unifying theory. *Clin Psychol Rev* 21:33-61.
- Salonen P, Puska P, Tuomilehto J (1982), Physical activity and risk of myocardial infarction, cerebral stroke and death. *Am J Epidemiol* 115:526–537.
- Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Belló-Klein A, Salbego C, Netto CA,

- Siqueira IR (2006), Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 71:155–159.
- Selvi RB, Cassel JC, Kundu TK, Boutillier AL (2010), Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Acta* 1799:840-53.
- Sharma VK (2003), Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiol Int* 20:901–919.
- Shea SA, Scheer FA, Hilton MF (2007), Predicting the daily pattern of asthma severity based on relative contributions of the circadian timing system, the sleep-wake cycle and the environment. *Sleep* 30:A65.
- Sibley BA, Beilock SL (2007), Exercise and working memory: An individual differences investigation. *J Sport Exerc Psycho* 29:783-791
- Sleiman SF, Basso M, Mahishi L, Kozikowski AP, Donohoe ME, Langley B et al (2009), Putting the 'HAT' back on survival signalling: the promises and challenges of HDAC inhibition in the treatment of neurological conditions. *Expert Opin Investig Drugs* 18: 573-584.
- 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 (2001), Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413:739–743.
- Strahl BD, Allis CD (2000), The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41–45.
- Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O (1994), Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke* 25:1862–1869.

- Sugars KL, Rubinsztein DC (2003), Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* 19:233-238.
- Tang WY, Ho S M (2007) Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Rev Endocr Metab Disord* 8:173-82.
- Taylor JP, Taye AA, Campbell C, Kazemi-Esfarjani P, Fischbeck KH, Min KT (2003), Aberrant histone acetylation, altered transcription, and retinal degeneration in a *Drosophila* model of polyglutamine disease are rescued by CREB-binding protein. *Genes Dev* 17:1463–1468.
- Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL (1996), A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272:408–411.
- Tong L, Shen H, Perreau VM, Balazs R, Cotman CW (2001), Effects of Exercise on GeneExpression Profile in the Rat Hippocampus. *Neurobiol Dis* 8:1046-1056.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006), Sustained hippocampal chromatin regulation in hippocampus in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nature Neurosci* 9:519-525.
- Turner BM (2000), Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* 22:836–845.
- Uysal N, Tugyan K, Kayatekin BM, Acikgoz O, Bagriyanik HA, Gonenc S, et al (2005), The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci Lett* 5:241–5.
- Vaynman S , Ying Z, Yin D, Gomez-Pinilla F (2006), Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res* 1070:124-130.
- Van der Borght K, et al (2007) Exercise improves memory acquisition and retrieval in the Y-maze task: relationship with hippocampal neurogenesis. *Behav Neurosci* 121:324-34

- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999), Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266–270.
- Van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005), Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680–5
- Vissing J, Anderesen M, Diemer NH (1996), Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:729-736.
- Zhang TY, Meaney MJ (2010), Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annu Rev Psychol* 61:439–66.
- Wade PA (2001), Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays* 23: 1131–1137.
- Waggoner D (2007), Mechanisms of disease: epigenesis. *Semin Pediatr Neurol* 14:7-14
- Wang RY, Yang YR, Yu SM (2001), Protective effects of treadmill training on infarction in rats. *Brain Res* 922:140–143.
- Wilmore JH, Costil DL (2001), Fisiologia do Esporte e do Exercício. 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 (2007), High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem* 4:597-609.
- Yoo CB, Jones PA (2006), Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 5:37-50.