



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE OS NÍVEIS DE FOSFO-ACETILAÇÃO DE  
HISTONAS EM HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR**

Louisiana Carolina Ferreira de Meireles

Orientadora: Prof. Dra. Ionara Rodrigues de Siqueira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas como  
requisito parcial para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Médicas

Porto Alegre, 10 de Novembro de 2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Ferreira de Meireles, Louisiana Carolina  
EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE OS NÍVEIS DE  
FOSFO-ACETILAÇÃO DE HISTONAS EM HIPOCAMPO DE RATOS  
WISTAR / Louisiana Carolina Ferreira de Meireles. --  
2013.  
35 f.

Orientadora: Ionara Rodrigues de Siqueira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Epigenética. 2. Exercício Físico. 3. Contexto de  
Aprendizado. 4. Esquiva Inibitória. I. Rodrigues de  
Siqueira, Ionara , orient. II. Título.

### **Dedicatória**

Dedico essa dissertação aos meus pais Maria do Carmo Lisboa de Meireles e a Jairo Policarpo de Meireles, pelo amor e apoio incondicional durante toda a minha vida.

## Agradecimentos

A minha orientadora **Prof. Dra. Ionara** pela confiança ao ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, pela dedicação, conhecimentos e paciência. Nesses dois anos cresci bastante, e acredite, muito devo a você!

A minha mãe **Maria do Carmo** meu modelo de mulher, profissional e ser humano.

Aos meus irmãos que amo tanto, **Poliana, Fábio, Ivanna e Pedro**, em especial ao **André** pela paciência no dia-a-dia e força sempre!

Aos meus queridos amigos do laboratório 204: **Arthie, Carlinha, Chris, Felipe, Laura, Kaki**, e **Vivi** que me ensinaram tudo que sei hoje com muito bom humor! A **Gisele Lovatel** por ter me ajudado tanto, és uma pessoa incrível que levarei para sempre.

Aos meus grandes amigos de Porto Alegre: **Nialita, Zé, Rafa, Carlinha, Vicente, Nati, Martin, Osman, Núbia entre tantos!** Vocês foram essenciais, minha família aqui em Porto Alegre. Se nada me faltou, foi porque vocês estavam comigo. A turma da **Escola de Dança Baka** que entre passos e danças fizeram tudo aqui muito alegre!

Aos meus amigos da vida toda: **Iorrane, Alan, Meirylanne, Paty, Marcelinha, Juju e Edmário**. Mesmo existindo essa distância terrível nos separando fisicamente, sempre recebi a energia boa e os pensamentos positivo de vocês. Um obrigado especial para o **Marcel Moura** que mesmo do outro lado do mundo se preocupa tanto comigo e se esforça para me ajudar nos momentos mais difíceis.

A **todos os meus professores**. Em especial as professoras **Lícia Vasconcelos, Natália Ferraz e Adriana Siqueira**, que me incentivaram a atravessar o país em busca dos meus objetivos.

Ao programa de **Pós Graduação em Ciências Médicas** pela oportunidade de realização do Mestrado e a **CAPES** pelo auxílio financeiro nesses dois anos.

“Fracassado é aquele que abandona a luta ou nega-se a travá-la. Dificilmente logrará vitória quem se recusa a enfrentar os desafios do cotidiano. Quedas e aparentes insucessos são experiências que, repetidas, favorecem o homem com o êxito que deve perseguir até o fim. Desistir do empreendimento porque se apresenta difícil, significa abandonar-se a contínuos insucessos. Não recear jamais, nem ceder à tentação da desistência na luta de ascensão. “Se tu queres, podes.”

*Joanna de Angelis*

### Resumo

A fosforilação da histona 3 na serina 10 (H3S10) e a acetilação da histona 3 lisina 14 (H3K14) tem sido relacionadas com a formação da memória em paradigmas de medo condicionado. Estudos demonstram que o exercício é capaz de melhorar o desempenho em testes de memória além de modular marcadores epigenéticos. O objetivo desse estudo foi investigar o efeito de um protocolo de corrida em esteira (20min/dia durante 2 semanas) sobre os níveis de acetilação da H3K14 e de fosforilação da H3S10 em hipocampo de ratos expostos ou não expostos a um contexto de aprendizado. Ratos Wistar de 3 meses de idade foram submetidos a um protocolo de exercício crônico (grupo exercitado) ou submetidos a esteira desligada (grupo sedentário) e após parte dos animais foram expostos a um contexto de aprendizado (esquiva inibitória). Os animais foram eutanasiados por decapitação e os níveis da fosforilação da serina 10 e da acetilação da lisina 14 na histona 3 (H3) foram avaliados em hipocampus. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo dos fatores “contexto de aprendizado” e “exercício” nos níveis de acetilação da H3K14, assim como uma interação entre esses fatores. Houve uma diminuição nos níveis de acetilação 24h após o treino da esquiva inibitória (30 minutos após o teste) no hipocampo do grupo submetido ao contexto de aprendizado. Além disso, o exercício crônico aumentou os níveis de acetilação no hipocampo dos ratos expostos ao contexto de aprendizado. Os níveis de fosforilação da H3S10 não foram alterados pelo contexto de aprendizado nem pelo exercício. Nossos dados apoiam a hipótese de que a modulação da acetilação na H3K14 em hipocampo de ratos pode estar relacionada, pelo menos em parte, aos efeitos do exercício sobre memória aversiva.

**PALAVRAS-CHAVE:** Epigenética, exercício e contexto de aprendizado.

### **Abstract**

The phosphorylation of histone H3 at serine 10 (H3S106) and acetylation of histone 3 at lysine 14 (H3K14) have been linked to memory processes in fear conditioning paradigms. Some studies demonstrated that exercise was able to improve the performance in memory tasks and modulate epigenetic markers. The aim of this study was to investigate the effect of treadmill exercise protocol (20min/day during 2 weeks) on H3K14 acetylation and H3S10 phosphorylation levels in hippocampi from rats exposed or not exposed to learning context. Wistar rats with 3-months-old were submitted to chronic exercise protocol (exercised group) or left on the treadmill turned off (sedentary group) and after it, some animal were exposed to learning context (inhibitory avoidance). Rats were euthanized by decapitation and the levels of serine 10 phosphorylation and lysine 14 acetylation on histone 3 (H3) were evaluated in hippocampi. Two-way ANOVA showed a significant effect of “learning context” and “exercise factors” on acetylation levels of H3K14, as well as an interaction between these factors. There was a decrease in acetylation levels twenty four hours after inhibitory avoidance training (30 minutes after test), in hippocampus from exposed to learning context groups. Besides, the chronic exercise increased acetylation levels in hippocampi from rats exposed to learning context. The H3S10 phosphorylation levels were not altered by of learning context and exercise. Our data support the hypothesis that the modulation on acetylation levels of H3K14 acetylation in hippocampus might be related, at least partially, to exercise effects on aversive memory.

**KEY WORDS:** epigenetic, physical exercise and learning context

**Lista de Figuras**

Figura 1 - Estrutura da Cromatina.....	13
Figura 2 - Estrutura das Histonas.....	13
Figura 3 - Enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC).....	14
Figura 4 - Hipótese do Código das Histonas.....	15



**Lista de Abreviaturas**

SIGLA    SIGNIFICADO

VO<sub>2</sub>máx    Consumo Máximo de Oxigênio

SNC        Sistema Nervoso Central

BDNF      Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

AKT        Proteína serina-treonina quinase

CREB      Elemento de resposta ao monofosfato cíclico de adenosina

COX2      Ciclooxygenase tipo 2

EP4        Receptores prostanóides tipo 4

DNA        Ácido desoxirribonucleico

RNA        Ácido ribonucleico

HAT        Enzima histona acetiltransferase

HDAC      Enzima histona desacetilase

NMDA      Receptores glutamatérgicos n-metil-D-aspartato

Ca<sup>2+</sup>      Íon Cálcio

PKA        Proteína adenilatociclase A

ERK        Proteínas cinases ativadas por mitógenos

LTP        Potenciação de longa duração

## Sumário

1. Introdução.....	10
2. Objetivos Gerais.....	17
3. Objetivos Específico.....	17
4. Referências bibliográficas da Introdução.....	18
5. Artigo.....	24
6. Considerações Finais .....	38

## **1. Introdução**

### **1.1 Exercício Físico**

A prática do exercício físico tem sido relacionada com a redução no número de doenças físicas e mentais, desta forma, trazendo benefícios à saúde e qualidade de vida ao indivíduo (Berger and Motl, 2000; Duman, 2005; Gaz and Smith, 2012; Guiney and Machado, 2013; Mahabir et al., 2004; Yamazaki et al., 2013). Estudos clínicos e experimentais demonstraram os efeitos benéficos do exercício, tais como: aumento da sensibilidade à insulina, aumento do metabolismo, melhora da função cardíaca, aumento de fatores de crescimento e melhora do sistema imunológico, mostrando que este tem um papel importante tanto na prevenção quanto no tratamento de doenças metabólicas e cardiorrespiratórias (Botero et al., 2013; Caponi et al., 2013; Galassetti and Riddell, 2013; Grisóla et al., 2013; Joshi, 2007; Williams, 2013).

Há diversos trabalhos que evidenciam os efeitos de diferentes protocolos de exercício no sistema nervoso central (SNC). Estes sugerem que o exercício mantém a integridade cerebrovascular através do aumento da rede capilar, das conexões sinápticas, aumento de fatores neurotróficos, melhora da cognição e neurogênese, além de melhorar a eficiência dos processos e funções do sistema nervoso central (Cotman and Berchtold, 2002; Radak et al., 2001; Vivar et al., 2012).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado o efeito neuroprotetor e os mecanismos de ação do exercício físico, especificamente o treinamento em esteira ergométrica adaptada para ratos. Observamos que o exercício moderado de corrida, 20 minutos diariamente por duas semanas a 60% do  $VO_2$ máx, reduziu o dano induzido por isquemia *in vitro* em fatias hipocámpais de ratos Wistar, sugerindo este protocolo como neuroprotetor enquanto um protocolo intenso (60min/dia) aumentou o dano, sugerindo que os efeitos benéficos do exercício podem estar associados às variáveis de treinamento (Scopel et al., 2006).

Nesse contexto, o uso de animais de experimentação tem sido empregado na busca dos mecanismos e respostas biológicas ao exercício, sendo importante destacar que estas variam de acordo com a modalidade, intensidade, duração, frequência e protocolo utilizados (Narath et al., 2001).

### **1.2 Classificação do Exercício**

O exercício pode ser classificado de acordo com a sua intensidade em leve, moderado e intenso, sendo essa classificação determinada pela taxa de consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ 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, os animais tem 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 and Woodruff-Pak, 2012; Mondon et al., 1985). Por outro lado, 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). Alguns trabalhos distinguem os efeitos do exercício agudo e do crônico, sendo os efeitos agudos aqueles associados diretamente com uma sessão única de exercício e os crônicos como sendo as adaptações dos sistemas biológicos a uma exposição frequente ou regular ao exercício (Thompson et al., 2001).

### **1.3 Efeitos do Exercício Físico sobre a Memória e Cognição**

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 alguns aspectos da função executiva, diminuiu a perda neuronal relacionada à idade, melhorou o controle motor e a memória de trabalho em adultos (Tseng et al., 2013). Roig et al (2013) em uma metanálise envolvendo humanos saudáveis, sugere que o exercício fornece os estímulos necessários para otimizar as respostas da maquinaria molecular responsável pelo processamento da memória. Em estudo controlado com idosos com amnésia moderada, observou-se após um protocolo de exercício de 12 meses, melhoras na cognição geral, memória de curto prazo e nas habilidades linguísticas (Suzuki et al., 2012). Erickson et al (2011) comparou idosos sem nenhum tipo de demência, exercitados e sedentários e constatou via ressonância magnética um aumento nos lobos temporais e hipocampo além de um incremento nos níveis séricos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), sugerindo esse como um dos mecanismos pelo qual o exercício pode melhorar a memória em adultos.

Em estudos pré-clínicos, os protocolos voluntários de exercício tem se mostrado eficientes na melhora do desempenho em testes de memória. Alomari et al (2013) observaram em ratos *Wistar* machos, após uma semana de prática de exercício físico voluntário ou forçado, um aumento nos níveis de BDNF associado à melhora da performance no labirinto aquático. Berchtold et al (2011) encontrou resultados semelhantes em hipocampus de roedores, em protocolos de exercício voluntário de 1, 2 ou 3 semanas, os quais também foram relacionados

com aumento nos níveis de BDNF e melhora na performance no mesmo paradigma de memória (Berchtold et al., 2005; Berchtold et al., 2010).

Radak e colaboradores (2001), observaram que ratos *Wistar* submetidos a um protocolo de nado forçado por 9 semanas, tiveram melhora na performance em um teste de memória aversiva relacionado a atenuação no dano oxidativo. O exercício em esteira regular, em uma intensidade moderada durante 28 dias, melhorou o desempenho no teste de memória espacial do labirinto aquático em camundongos de 3 meses (Li et al., 2013). Além disso, o exercício em esteira moderado diariamente durante 5 semanas melhorou o desempenho no labirinto aquático acompanhado pela ativação da proteína serina-treonina quinase (AKT) e do elemento de resposta ao monofosfato cíclico de adenosina (CREB), culminando com incremento do BDNF em hipocampo de ratos *Wistar* durante o processo de envelhecimento (Aguilar-Jr et al., 2011). Resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que o protocolo neuroprotetor de corrida em esteira por 20 minutos diariamente, durante duas semanas a 60% do  $VO_2$ máx, aumentou agudamente os níveis de ciclooxigenase-2 (COX2) e do receptor prostanóide (EP4), sendo esse incremento relacionado com melhora da memória aversiva em ratos *Wistar* de 3 meses (Lovatel et al., 2012).

Um protocolo de exercício moderado de corrida em esteira, 3 vezes por semana, durante 12 semanas foi capaz de regular o dano oxidativo no hipocampo de ratos após hipoperfusão cerebral além de reduzir o dano sobre a memória espacial (Cechetti et al., 2012). Fernandes et al (2012) relatou atenuação dos efeitos deletérios sob a memória da privação paradoxal do sono em ratos de dois meses submetidos a 4 semanas de exercício de corrida em esteira.

Todos esses estudos sugerem um forte potencial do exercício como modulador do processo de formação e manutenção da memória em mamíferos, no entanto o mecanismo pelo qual o exercício exerce seus efeitos benéficos ainda não está totalmente elucidado. Estudos recentes sugerem que mecanismos epigenéticos parecem estar envolvidos nesse processo.

#### **1.4 Epigenética**

Fenômenos epigenéticos referem-se ao processo de modificações na cromatina que podem gerar alterações na expressão gênica, sem alterar a sequência do DNA (Gravina and Vijg, 2010; Jaenisch and Bird, 2003; Yoo and Jones, 2006). Tais mecanismos têm papel fundamental na codificação de estímulos ambientais em rotas celulares durante o desenvolvimento e adaptações comportamentais no decorrer da vida de um indivíduo (Feng and Nestler, 2013). A estrutura da

cromatina consiste em quatro pares de proteínas denominadas histonas (H2B, H4, H3 e H2A), as quais estão envolvidas pelo DNA (Figura 1). As principais alterações epigenéticas são a metilação do DNA e a acetilação, a fosforilação, a metilação e a ubiquitinação das histonas (Graff and Mansuy, 2009; Strahl and Allis, 2000), sendo a acetilação e a fosforilação das histonas o assunto foco deste trabalho.

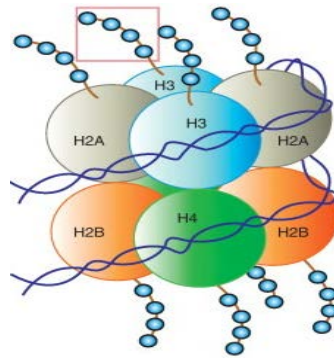


Figura 1 - Estrutura da Cromatina (Adaptada de Nestler, 2013).

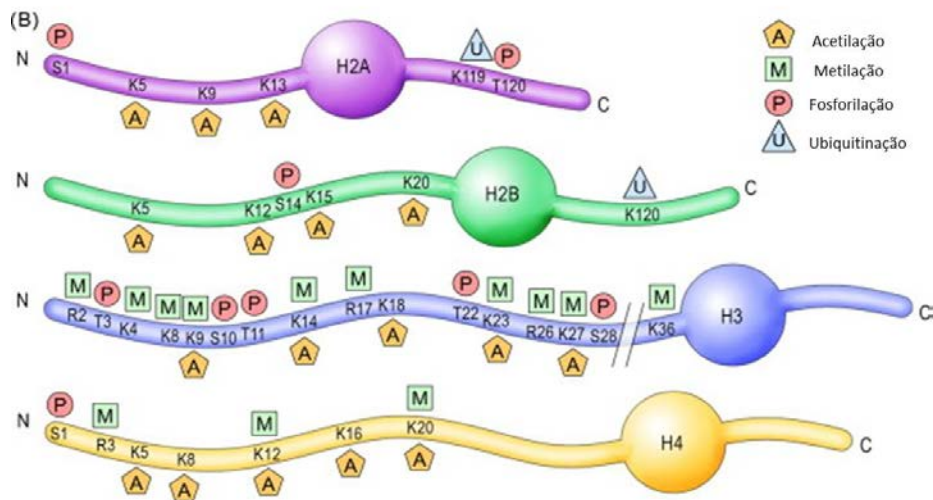


Figura 2 - Estrutura das Histonas (Adaptada de Gräff e Mansuy, 2008).

A acetilação de histonas ocorre em sítios específicos denominados lisinas (K) (Figura 2) e é catalisada por dois grupos enzimáticos denominados histona acetiltransferases (HATs) e histona desacetilases (HDACs) (Arrowsmith et al., 2012; Yoo and Jones, 2006). As HATs usam a acetil-CoA como doadora de grupamento acetil para as histonas (Gräff and Mansuy, 2008; Strahl and Allis, 2000). A acetilação neutraliza a carga positiva, enfraquecendo as interações eletrostáticas da histona com o DNA, o que torna a cromatina menos compacta, facilitando a

transcrição gênica (Arrowsmith et al., 2012; Yoo and Jones, 2006). Enquanto que, as HDACs retiram o grupamento acetil, deixando a estrutura da cromatina mais compacta, e assim, reprimindo a transcrição gênica (Figura 3) (Kiefer, 2007; Strahl and Allis, 2000).

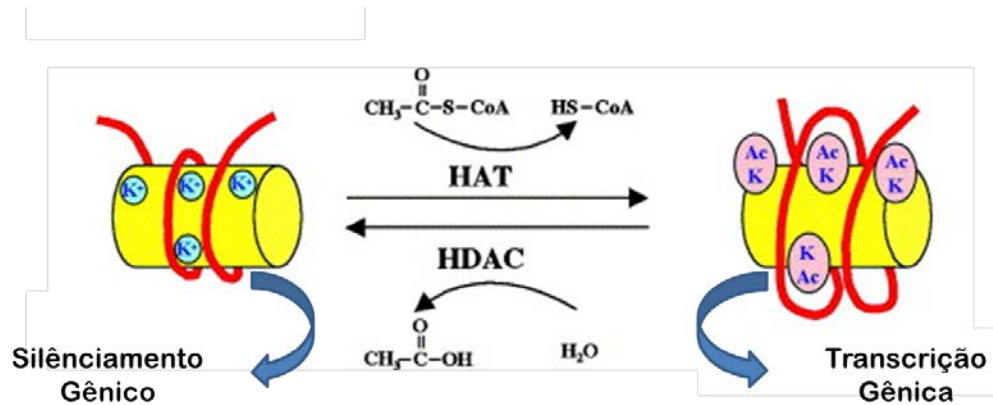


Figura 3 - Enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC) (Adaptado de Chang et al, 2002)

Os efeitos da fosforilação nas histonas parecem ser histona-dependente e sensível às demais modificações epigenéticas que acontecem na cromatina, interagindo com elas dinamicamente (Strahl and Allis, 2000). Esta está geralmente associada ao aumento da transcrição por conta da interação repulsiva entre as cargas negativas do grupamento fosfato na histona e no DNA, sendo essa repulsão responsável por um aumento na acessibilidade da maquinaria transcricional (Gräff and Mansuy, 2008; Strahl and Allis, 2000). No entanto, existem evidências de que a fosforilação das histonas H1 e H3 também estaria envolvida na condensação cromossômica durante a mitose (Goto et al., 1999 ; Wei et al., 1999). Esse paradoxo tenta ser explicado pela *hipótese do código das histonas* (Figura 4), o qual sugere que o padrão combinatório de modificações n-terminais resulta em uma identidade heterogênea, onde a remodelação da cromatina pelas interações biofísicas e o recrutamento de complexos de sinalização criam uma combinação única de padrões de expressão gênica (Penner et al., 2010; Sawicka and Seiser, 2012). Logo, ainda não é possível avaliar precisamente quais enzimas regulam a fosforilação das histonas uma vez que apesar da participação de fosfatases e quinases, diferentes vias de sinalização são ativadas nessa modificação (Kouzarides, 2007).

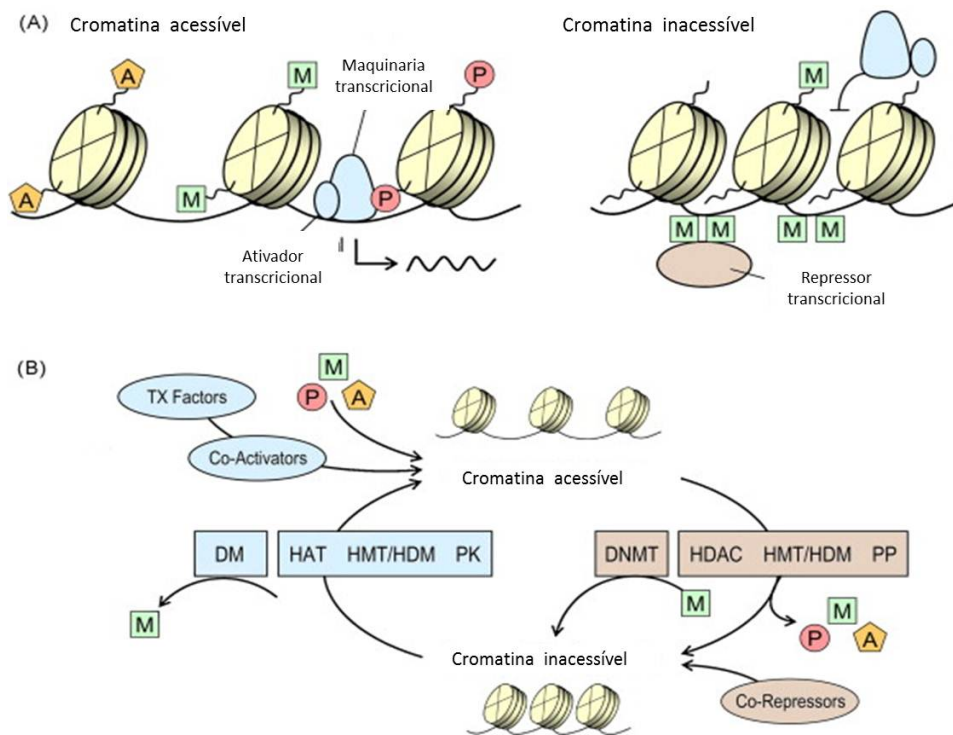


Figura 4 - Hipótese do Código das Histonas onde M significa metilação, P fosforilação e A acetilação (Adaptada de Gräff e Mansuy, 2008).

#### 1.4 Fosfoacetilação da histona 3 e sua relação com a formação da memória.

Considerando apenas as interações eletrostáticas para o estabelecimento de um padrão de acessibilidade à cromatina, a acetilação de histonas através da neutralização da carga positiva e a fosforilação através da adição de cargas negativas, causam descondensação da cromatina, facilitando a transcrição gênica (Kouzarides, 2007). Logo a combinação de ambos os mecanismos poderia amplificar a leitura de vias de sinalização causando um montante maior de mudanças na densidade total das cargas nas caudas N-terminais que conduziriam a maiores mudanças na estrutura da cromatina dos genes-alvo (Strahl and Allis, 2000). A relação entre a acetilação em concomitância com a fosforilação da H3 e aumento da transcrição gênica no processo de formação da memória já tem embasamento experimental (Borrelli et al., 2008; Nowak and Corces, 2004).

A formação da memória é um processo complexo, que envolve sinalização intracelular, regulação da transcrição gênica e mudanças translacionais em proteínas pós-sinápticas (Radulovic and Tronson, 2008). Estes processos ocorrem de forma distinta entre a formação de memória de curta e longa duração. Memória de curta duração é formada nos primeiros momentos após a aquisição e fica retida por minutos ou horas, e este processo depende de



modificações em proteínas já existentes (Gold, 2008). Por outro lado, memória de longo prazo é formada em uma segunda fase podendo permanecer por mais tempo e está relacionada à síntese de novas proteínas em regiões específicas do encéfalo. Esta regulação da expressão gênica inclui padrões de alta frequência de atividade sináptica, ativação de receptores n-metil-D-aspartato (NMDA), sensíveis a glutamato e influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) no hipocampo (Levenson et al., 2004). Esse aumento no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  regula a sinalização de proteínas quinase C (PKC) e proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA), desencadeando uma série de acontecimentos que convergem para ativação das proteínas cinases ativadas por mitógenos (ERK), regulando a transcrição de genes das proteínas a serem sintetizadas para a consolidação da memória, sendo esse modelo celular chamado de: potenciação de longa duração (LTP) (Davis et al., 2000; Erickson and Barnes, 2003; Izquierdo et al., 1998; Vecsey et al., 2007).

Alguns trabalhos relacionam a fosfoacetilação da H3 na cascata de formação da memória. Chandramohan et al (2012), utilizando o nado forçado como contexto de aprendizado, observaram um aumento da fosforilação da serina 10 (S10) em concomitância com a acetilação da lisina 14 (K14) no giro dentado de ratos Wistar. No mesmo estudo, a administração de antagonistas dos receptores NMDA e das ERK1/2 bloquearam a fosfoacetilação anterior além de afetar o parâmetro comportamental de memória estudado. Esse trabalho corrobora Chwang et al (2006), que encontrou resultados semelhantes em hipocampo utilizando o condicionamento de medo. Além disso, Chwang et al (2007) utilizando ratos nocaute para a proteína quinase 1 ativada por mitógenos e estresse (MSK1) observou uma piora na memória em paradigmas de memória avaliados, relacionados com uma diminuição da fosfoacetilação da S10 e K12, efeito esse revertido na utilização de inibidores da HDAC. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o protocolo neuroprotetor do exercício melhorou a memória aversiva de ratos Wistar no processo de envelhecimento e esta foi relacionada com aumento nos níveis de acetilação da H4 (Lovatel et al., 2013). Ainda, outros trabalhos com diferentes protocolos de exercício físico mostram melhora da memória por mediação epigenética. Gomez-Pinilla e colaboradores (2011) demonstraram que o exercício de corrida voluntário induziu um aumento na acetilação da histona H3 na região promotora IV do gene BDNF em hipocampo de ratos Wistar de 3 meses. Além disso, o exercício voluntário aumenta a expressão de genes relacionados a fatores de crescimento e plasticidade sináptica, associado a um aumento da acetilação de histonas (Collins et al., 2009). Outros estudos mostram que o exercício físico é um fator ambiental que influencia importantes fenômenos epigenéticos no hipocampo de roedores (Elsner et al., 2011; Elsner et al., 2013), no entanto até o momento, ao nosso conhecimento, não existem trabalhos relacionados os efeitos benéficos do exercício físico e a fosfoacetilação da histona 3 sobre a memória aversiva.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Estudar o efeito do exercício físico moderado em esteira ergométrica na fosfoacetilação de histonas em hipocampo de ratos Wistar adultos jovens.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito do exercício físico sobre os níveis de fosforilação da serina 10 na histona específica (H3) em hipocampo de ratos Wistar de 3 meses.

- Avaliar o efeito do exercício físico sobre os níveis de acetilação da lisina 14 na histona específica (H3) em hipocampo de ratos Wistar de 3 meses.

- Analisar a relação entre a exposição ao contexto de aprendizado (esquiva inibitória) e os níveis de fosfoacetilação de histonas.

### 3. Referências Bibliográficas da Revisão

- Aguiar-Jr, A.S., Castro, A.A., Moreira, E.L., Glaser, V., Santos, A.R.S., Tasca, C.I., Latini, A., Prediger, R.D.S., 2011. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mechanisms of Ageing and Development*. 132, 560-567.
- Alomari, M.A., Khabour, O.F., Alzoubi, K.H., Alzubi, M.A., 2013. Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. *Behavioural Brain Research*. 247, 34-39.
- Arrowsmith, C.H., Bountra, C., Fish, P.V., Lee, K., Shapira, M., 2012. Epigenetic protein families a new frontier for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. Advanced online publication.
- Berchtold, N.C., Chinn, G., Chou, M., Kesslak, J.P., Cotman, C.W., 2005. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 133, 853-861.
- Berchtold, N.C., Castello, N., Cotman, C.W., 2010. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*. 167, 588-597.
- Berger, B.G., Motl, R.W., 2000. Exercise and mood: A selective review and synthesis of research employing the profile of mood states. *Journal of Applied Sport Psychology*. 12.
- Borrelli, E., Nestler, E.J., Allis, D., Sassone-Corsi, P., 2008. Decoding the Epigenetic Language of Neuronal Plasticity. *Neuron* 60.
- Botero, J.P., Prado, W.L., Guerra, R.L., Speretta, G.F., Leite, R.D., Prestes, J., Sanz, A.V., Lyons, S., Azevedo, P.B., Baldissera, V., Perez, S.E., Dâmaso, A., Silva, R.G., 2013. Does aerobic exercise intensity affect health-related parameters in overweight women? *ClinPhysiolFunct Imaging*. . [Epub ahead of print].
- Caponi, P.W., Lehnen, A.M., Pinto, G.H., Borges, J., Markoski, M., Machado, U.F., Schaan, B.D.A., 2013. Aerobic exercise training induces metabolic benefits in rats with metabolic syndrome independent of dietary changes. *Clinics*. 68, 1010-101.
- Cechetti, F., Worm, P.V., Elsner, V.R., Bertoldi, K., Sanches, E., Ben, J., Siqueira, I.R., Netto, C.A., 2012. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*. 97, 90-96.
- Chandramohan, Y., Droste, S.K., Arthur, S.C., Reul, J.M.H.M., 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. *European Journal of Neuroscience*. 27, 2701-2713.
- Chwang, W.B., O'Riordan, K.J., Levenson, J.M., Sweatt, J.D., 2006. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem.* . 13, 322-8.
- Chwang, W.B., Arthur, J.S., Schumacher, A., Sweatt, J.D., 2007. The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J Neurosci.* . 27, 12732-42.
- Collins, A., Hill, L.E., Chandramohan, Y., Whitcomb, D., Droste, S.K., Reul, J.M.H.M., 2009. Exercise Improves Cognitive Responses to Psychological Stress through Enhancement

- of Epigenetic Mechanisms and Gene Expression in the Dentate Gyrus. *PLoS ONE*.4, 4330.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences*. 25, 295-301.
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., Laroche, S., 2000. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*. 20, 4563-4572.
- Drummond, M.J., Vehrs, P.R., Schaalje, G.B., Parcell, A.C., 2005. Aerobic and Resistance Exercise Sequence Affects Excess Postexercise Oxygen Consumption. *J Strength Cond Res*. 19, 332-7.
- Duman, R.S., 2005. Neurotrophic factors and regulation of mood: Role of exercise, diet and metabolism. *Neurobiology of Aging*. 26, 88-93.
- Elsner, V.R., Lovatel, G.A., Bertoldi, K., Vanzella, C., Santos, F.M., Spindler, C., de Almeida, E.F., Nardin, P., Siqueira, I.R., 2011. Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neuroscience*. 192, 580-587.
- Elsner, V.R., Lovatel, G.A., Moysés, F., Bertoldi, K., Spindler, C., Cechinel, L.R., Muotri, A.R., Siqueira, I.R., 2013. Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: A preliminary study. *Experimental Gerontology*. 48, 136-139.
- Erickson, C.A., Barnes, C.A., 2003. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Experimental Gerontology*. 38, 61-69.
- Erickson, K.I., Voss, M.W., Prakash, R.S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., Kim, J.S., Heo, S., Alves, H., White, S.M., Wojcicki, T.R., Mailey, E., Vieira, V.J., Martin, S.A., Pence, B.D., Woods, J.A., McAuley, E., Kramer, A.F., 2011. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *PNAS*. 108, 3017–3022.
- Feng, J., Nestler, E.J., 2013. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Current Opinion in Neurobiology*. 23, 521-528.
- Fernandes, J., Baliego, L.G.Z., Peixinho-Pena, L.F., de Almeida, A.A., Venancio, D.P., Scorza, F.A., de Mello, M.T., Arida, R.M., 2013. Aerobic exercise attenuates inhibitory avoidance memory deficit induced by paradoxical sleep deprivation in rats. *Brain Research*. 1529 66–73
- Galassetti, P., Riddell, M.C., 2013. Exercise and Type 1 Diabetes (T1DM). *Compr Physiol*. 3, 1309-36.
- Gaz, D.V., Smith, A.M., 2012. Psychosocial Benefits and Implications of Exercise. *PM&R*. 4, 812-817.
- Gold, P.E., 2008. Protein synthesis inhibition and memory: Formation vs amnesia. *Neurobiology of Learning and Memory*. 89, 201-211.
- Gomez-Pinilla, F., Zhuang, Y., Feng, J., Ying, Z., Fan, G., 2011. Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. *Eur J Neurosci*. 33, 383-90.
- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakura, Okawa, K., Wmatsu, A., Oigaki, T., Takahashi, T., Inagaki, M., 1999 Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem*. 274, 25543-9.

- Graff, J., Mansuy, I.M., 2009. Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1-8.
- Gräff, J., Mansuy, I.M., 2008. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural Brain Research.* 192, 70-87.
- Gravina, S., Vijg, J., 2010. Epigenetic factors in aging and longevity. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 459, 247-258.
- Grisolía, J.M., Longo, A., Boeri, M., Hutchinson, G., Kee, F., 2013. Trading off dietary choices, physical exercise and cardiovascular disease risks. *Social Science & Medicine.* 93, 130-138.
- Guiney, H., Machado, L., 2013. Benefits of regular aerobic exercise for executive functioning in healthy populations. *Psychon Bull Rev.* 20, 73-86.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Souza, T.M.e., Souza, M.M.d., Izquierdo, L.A., Medina, J.H., 1998. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393, 635-636.
- Jaenisch, R., Bird, A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 33, 245-254.
- Joshi, S.B., 2007. Exercise Training in the Management of Cardiac Failure and Ischaemic Heart Disease. *Heart, Lung and Circulation.* 16, Supplement 3, S83-S87.
- Kasch, F.W., Wallace, J.P., Huhn, R.R., Krogh, L.A., Hurl, P.M., 1976. VO<sub>2</sub>max during horizontal and inclined treadmill running. *J Appl Physiol.* 40, 982-3.
- Ke, Z., Yip, S.P., Li, L., Zheng, X.-X., Tong, K.-Y., 2011. The Effects of Voluntary, Involuntary, and Forced Exercises on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Motor Function Recovery: A Rat Brain Ischemia Model. *PLoS ONE.* 6.
- Kennard, J.A., Woodruff-Pak, D.S., 2012. A comparison of low- and high-impact forced exercise: Effects of training paradigm on learning and memory. *PhysiolBehav* 106, 23-427.
- Kiefer, J.C., 2007. Epigenetics in Development. *Developmental Dynamics.* 236, 1144-1156.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693-705.
- Levenson, J.M., O’Riordan, K.J., Brown, K.D., Trinh, M.A., Molfese, D.L., Sweatt, J.D., 2004. Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus. *The Journal of Biological Chemistry.* 279 14.
- Li, H., Liang, A., Guan, F., Fan, R., Chi, L., Yang, B., 2013. Regular treadmill running improves spatial learning and memory performance in young mice through increased hippocampal neurogenesis and decreased stress. *Brain Research.* 1531, 1-14.
- Lovatel, G.A., Bertoldi, K., Elsner, V.R., Vanzella, C., Moysés, F.d.S., Spindler, C., Funck, V.R., Pereira, L.M., de Oliveira, C.V., Oliveira, M.S., Netto, C.A., Siqueira, I.R., 2012. Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function. *Neurobiology of Learning and Memory.*
- Lovatel, G.A., Elsner, V.R., Bertoldi, K., Vanzella, C., Moysés, F.d.S., Vizuete, A., Spindler, C., Cechinel, L.R., Netto, C.A., Muotri, A.R., Siqueira, I.R., 2013. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory.* 101, 94-102.
- Mahabir, S., Leitzmann, M.F., Pietinen, P., Albanes, D., Virtamo, J., Taylor, P.R., 2004. Physical activity and renal cell cancer risk in a cohort of male smokers. *International Journal of Cancer.* 108, 600-605.
- Mondon, C.E., Dolkas, C.B., Sims, C., Reaven, G.M., 1985. Spontaneous running activity in male rats: effect of age. *J Appl Physiol.* 58, 1553-1985.

- Narath, E., Skalicky, M., Viidik, A., 2001. Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Experimental Gerontology*. 36, 1699-1711.
- Nowak, S.J., Corces, V.G., 2004. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics*. 20, 214-220.
- Penner, M.R., Roth, T.L., Barnes, C.A., Sweatt, J.D., 2010. An epigenetic hypothesis of aging-related cognitive dysfunction. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2, 1-11.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucsok, J., Sasvari, M., Nyakase, C., Gotoc, S., 2001. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemistry International* ). 38, 17-23.
- Radulovic, J., Tronson, N.C., 2008. Protein synthesis inhibitors, gene superinduction and memory: Too little or too much protein? *Neurobiology of Learning and Memory*. 89, 212-218.
- Roig, M., Nordbrandt, S., Geertsens, S.S., Nielsen, J.B., 2013. The effects of cardiovascular exercise on human memory: A review with meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 37, 1645-1666.
- Sawicka, A., Seiser, C., 2012. Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie*. 94, 2193-2201.
- Scopel, D., Fochesatto, C., Cimarosti, H., Rabbo, M., Belló-Klein, A., Salbego, C., Netto, C.A., Siqueira, I.R., 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Research Bulletin*. 71, 155-159.
- Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403, 41-45.
- Suzuki, T., Shimada, H., Makizako, H., Doi, T., Yoshida, D., Tsutsumimoto, K., Anan, Y., Uemura, K., Lee, S., Park, H., 2012. Effects of multicomponent exercise on cognitive function in older adults with amnesic mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *BMC Neurol*. 12.
- Thompson, P.D., Crouse, S.F., Goodpaster, B., Kelley, D., Moyna, N., Pescatello, L., 2001. The acute versus the chronic response to exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 33, S438-S445.
- Tseng, B.Y., Uh, J., Rossetti, H.C., Cullum, C.M., Diaz-Arrastia, R.F., Levine, B.D., Lu, H., Zhang, R., 2013. Masters athletes exhibit larger regional brain volume and better cognitive performance than sedentary older adults. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. n/a-n/a.
- Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., Wood, M.A., 2007. Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB: CBP-Dependent Transcriptional Activation. *The Journal of Neuroscience*. 27, 12.
- Vivar, C., Potter, M.C., Praag, H.v., 2012. All About Running: Synaptic Plasticity, Growth Factors and Adult Hippocampal Neurogenesis *Current Topics in Behavioral Neurosciences*.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A., Allis, C.D., 1999. Phosphorylation of Histone H3 Is Required for Proper Chromosome Condensation and Segregation. *Cell*. 97, 99-109.
- Williams, P.T., 2013. Walking and Running Produce Similar Reductions in Cause-Specific Disease Mortality in Hypertensives. *Hypertension*. . [Epub ahead of print].

- Yamazaki, F., Yamada, H., Morikawa, S., 2013. Influence of an 8-week exercise intervention on body composition, physical fitness, and mental health in female nursing students. *Journal of Uoeh.*35, 51-8.
- Yoo, C.B., Jones, P.A., 2006. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews* 5, 37-50.

**Neurobiology of Learning and Memory****Treadmill exercise alters histone acetylation in the hippocampi of Wistar rats submitted to aversive learning context**

Louisiana Carolina Ferreira de Meireles<sup>a</sup>, Karine Bertoldi<sup>b</sup>, Viviane Rostirola Elsner<sup>b</sup>, Felipe dos Santos Moysés<sup>b</sup>, Laura Reck Cechinel<sup>c</sup>, Carla Basso<sup>c</sup>, Wagner de Aguiar Raupp<sup>c</sup>, Arthiese Korb<sup>a</sup>, Gisele Agustini Lovatel<sup>d</sup>, Ionara Rodrigues Siqueira<sup>\*a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil - ppgcm@ufrgs.br

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil - ppgfisio@ufrgs.br

<sup>c</sup>Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil – farmaco@ufrgs.br

<sup>d</sup>Curso de Graduação em Fisioterapia, Campus da Universidade Federal de Santa Catarina na cidade de Araranguá, Santa Catarina, Brazil – gisele.lovatel@ufsc.br

\*Corresponding author: Ionara Rodrigues Siqueira. Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel/Fax: + 55 51 3308 3121; e-mail: ionara@ufrgs.br.



**Abstract**

The epigenetic modifications of histone 3, such as phosphorylation of serine 10 (H3S10) and acetylation of serine 14 (H3K14), have been linked to memory processes in fear conditioning paradigms. Considering that exercise improves memory performance and also is able to modulate several epigenetic marks in rat brain, the aim of this study was to investigate the effect of treadmill exercise protocol (20min/day during 2 weeks) on H3K14 acetylation and H3S10 phosphorylation levels in hippocampi from 3-months-old Wistar rats exposed or non-exposed to aversive learning context. Male Wistar rats aged 2–3 months, maintained under standard conditions, were used. The animals were submitted or not submitted to chronic exercise protocol (running daily for 20 min for 2 weeks) and exposed to learning context (inhibitory avoidance). Two-way ANOVA showed a significant effect of learning context and exercise on acetylation levels of H3K14, as well as an interaction between the factors exercise and learning context exposition. Specifically twenty four hours after inhibitory avoidance training and 30 minutes after the test session, there was a decrease in acetylation level in the hippocampi. Besides, the chronic exercise increased acetylation levels only in hippocampi from rats exposed to learning context. The H3S10 phosphorylation levels were not altered by learning context and exercise. Our data support the hypothesis that the modulation on acetylation levels of H3K14 acetylation in hippocampus might be related, at least partially, to exercise effects on aversive memory.

**Highlights:** Forced exercise modulates histone acetylation in rats ► Learning context in inhibitory avoidance paradigm may alter epigenetic makers ► Exercise improved H3K12 acetylation in rats exposed to passive avoidance ► Exercise and learning context did not alter H3S1 phosphorylation.

**Key Words:** epigenetic; histone H3S10 phosphorylation; histone H3K14 acetylation; physical exercise; learning context

**Acknowledgments.** This work was supported by the Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (Fellowships to Dr. I.R. Siqueira; V.R. Elsner, L.R. Cechinel and K. Bertoldi), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (L.C.F Meireles, F.S. Moysés and A. Korb) and Programa de Bolsas de Iniciação Científica – BIC UFRGS (C. Basso).

## 1. Introduction

A growing amount of evidence suggests that epigenetic mechanisms are linked to exercise-induced improvement in memory and learning performance. The voluntary exercise increases global acetylation of histone 3 in hippocampi from rodents, which was correlated with an augment on neuroplasticity genes expression (Abel and Rissman, 2013; Gomez-Pinilla, Vaynman, and Ying, 2008). This process is regulated by histone acetyltransferases (HATs) that add acetyl groups to lysine (K) residues from amino-terminal tails of histones, while histone desacetylases (HDACs) remove these groups (Strahl and Allis, 2000). It has been demonstrated that exercise is able to alter the balance between HAT and HDAC activities, supporting the idea that exercise might induce histone acetylation. A single session of treadmill (20 min) increases HAT activity and decreases HDAC activity, both immediately and one hour after the exercise, in rat hippocampus (Elsner, Lovatel, Bertoldi, Vanzella, Santos, Spindler, de Almeida, Nardin, and Siqueira, 2011). This exercise protocol also transiently enhanced HAT activity in frontal cortices, while the chronic protocol (20 min/day during 2 weeks) was able to reduce the HDAC activity (Spindler, Elsner, Moysés, Bertoldi, Cechinel, Basso, Roesler, Lovatel, and Siqueira, 2013). Taken together, it is possible to suggest that exercise modulates time-dependent histone acetylation mechanisms.

It has been widely demonstrated that exercise improves performance in memory and learning tasks in rodents (Berchtold, Castello, and Cotman, 2010; Praag, Shubert, Zhao, and Gage, 2005 ; Radak, Kaneko, Tahara, Nakamoto, Pucsok, Sasvari, Nyakase, and Gotoc, 2001). Furthermore, we demonstrated that a chronic exercise protocol improved global histone 4 (H4) acetylation 1 hour after the last session in hippocampi from 20-months old rats, which was positively correlated with aversive memory performance evaluated by inhibitory avoidance paradigm (Lovatel, Elsner, Bertoldi, Vanzella, Moysés, Vizuite, Spindler, Cechinel, Netto, Muotri, and Siqueira, 2013). Accordingly, several studies have pointed out that epigenetic mechanisms play an important role in hippocampus-dependent memory (Graff and Mansuy, 2009; Levenson and Sweatt, 2005; Sweatt, 2009). In this context, the acetylation of histones H3 and H4 is widely associated with memory formation (Korzus, Rosenfeld, and Mayford, 2004; Levenson, O'Riordan, Brown, Trinh, Molfese, and Sweatt, 2004).

It is interesting to note that contextual fear conditioning has been associated with an increase of global acetylation of histone H3 (Levenson et al., 2004; Vecsey, Hawk, Lattal, Stein, Fabian, Attner, Cabrera, McDonough, Brindle, Abel, and Wood, 2007) and at specific lysines of H3 and H4 histones, such as H3K9, H3K14, H4K5, H4K8 and H4K12 in rodents hippocampi (Peleg, Sananbenesi, Zovoilis, Burkhardt, Bahari-Javan, Agis-Balboa, Cota, Wittnam, Gogol-Doering,

Opitz, Salinas-Riester, Dettenhofer, Kan, Farinelli, Chen, and Fischer, 2010). Moreover, increased acetylation of H3K14 coupled to phosphorylation of histone H3 at serine 10 (H3S10) has been described 1 hour after fear conditioning training, suggesting that these mechanisms are related to memory formation (Chwang, O’Riordan, Levenson, and Sweatt, 2006).

Although there are evidences about the exercise effects *per se* on these epigenetic marks (Collins, Hill, Chandramohan, Whitcomb, Droste, and Reul, 2009; Intlekofer and Cotman, 2012), there are no studies, to our knowledge, reporting the impact of forced exercise on these parameters in brain areas from rodents exposed to learning contexts. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of treadmill exercise protocol (20min/day during 2 weeks) on H3K14 acetylation and H3S10 phosphorylation levels in hippocampi from 3-months-old Wistar rats exposed or non-exposed to inhibitory avoidance task.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Animals**

Male Wistar rats aged 2–3 months, maintained under standard conditions (12-h light/dark, 22°C  $\pm$  2°C) with food and water ad libitum were used. The animals were provided by Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and housed five per cage. The NIH “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication No. 80-23, revised 1996) was followed in all experiments. The Local Ethics Committee approved all handling and experimental conditions (nr. 21449).

### **2.2 Exercise Protocol**

Rats were randomly divided into sedentary group (SED) or exercised groups (EXE). SED was handled exactly as the experimental animals and was left on the treadmill for 5 min without any stimulus to run. The exercise training consisted of running sessions on a motorized rodent treadmill (AVS Projetos, São Paulo, Brazil), with individual Plexiglas lanes, at 60% of the animals maximal oxygen uptake (Brooks and White, 1978). Peak oxygen uptake ( $VO_2$ ) was measured indirectly in all animals before training. Each rat ran on a treadmill at a low initial speed with the speed being increased by 5 m/min every 3 min until the point of exhaustion (i.e. failure of the rat to continue running). The time to fatigue (in min) and workload (in m/min) were taken as indexes of exercise capacity, which was in turn taken as  $VO_{2max}$  (Arida, Scorza,

dos Santos, Peres, and Cavalheiro, 1999; Brooks and White, 1978). Any animals that initially refused to run were encouraged by gently tapping their backs. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study. All the procedures took place between 14:00 and 17:00 h.

Rats were submitted to one 20-min running session each day for 2 weeks. In the first few sessions, rats were adapted to the treadmill by running at 8 m/min for the first 2 min, 10 m/min for the next 4 min, 13 m/min for 8 min, 10 m/min for 4 min and 8 m/min for the last 2 min. Thereafter, animals ran at 8 m/min for the first 4 min, 13 m/min for 12 min and 8 m/min for the last 4 min.

### 2.3 Inhibitory avoidance

Animals were exposed to inhibitory avoidance (exposed to learning context group) or non-exposed to inhibitory avoidance (non-exposed to learning context group). We used the single-trial step-down inhibitory avoidance conditioning as an established model of fear-motivated memory. At step-down inhibitory avoidance training, animals learn to associate a location in the training apparatus (a grid floor) with an aversive stimulus (footshock). In the training trial, rats were placed on the platform and immediately after stepping down on the grid; the rats received a 0.6 mA, 3.0 s footshock and were removed from the apparatus. The test trial took place 24 h after training. The inhibitory avoidance test was conducted 30 min before euthanasia. The general procedures and results for inhibitory avoidance behavioral training and retention test were described in previous reports (Lovatell et al., 2013).

### 2.4 Preparation of samples

Rats were killed by decapitation 1 h after the last training session of chronic treadmill exercise. The whole hippocampi were quickly dissected out and immediately snap-frozen in liquid nitrogen, then stored at -80 °C until the histone extraction. Whole hippocampi were homogenized in TEB buffer (PBS containing 0.05% Triton X 100, 2 mM PMSF and 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) and centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes at 4°C. The tissue pellet was resuspended in an extraction buffer (0.5N HCl and 10% glycerol) and incubated on ice for 30 minutes. The samples were centrifuged at 12000 rpm for 5 minutes at 4°C and the supernatant was removed and left in acetone at -20°C overnight. Finally the pellet was centrifuged, air-dried and dissolved in water distilled. This histone extract was stored at -80°C. The protein concentration of each

sample was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

#### 2.5 Determination of Global Histone H3 phosphorylation (Ser 10)

The histone H3 phosphorylation levels (Ser10) were determined using the Global Histone H3 phosphorylation (Ser10) assay kit (Colorimetric Detection, catalog # P-7002, Epigentek®, Farmingdale, NY, USA) according to the manufacturer's instructions and absorbance was measured at 450nm.

#### 2.6 Determination of Global Histone Acetylation H3-K14

The acetyl histone H3-K14 levels were determined using the Global Acetyl Histone H3-K14 quantification Kit (Colorimetric Detection, catalog # P-4012, Epigentek®, Farmingdale, NY, USA) according to the manufacturer's instructions and absorbance was measured at 450nm.

#### 2.7 Statistical analysis

All results were expressed as mean  $\pm$  S.D. The results were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) with exercise and learning context exposure as factors. In all tests,  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

### 3. Results

The effects of learning context and exercise in hippocampal acetylation levels of H3K14 are presented in Figure 1. Two-way ANOVA showed a significant effect of exposition to inhibitory avoidance task, there was a decrease in acetylation levels twenty four hours after inhibitory avoidance training (30 minutes after test) compared to non-exposed groups ( $F_{(1,32)} = 70.448$ );  $p < 0.001$ ). Moreover, two-way ANOVA also showed the effect of exercise on this parameter ( $F_{(1,32)} = 78.703$ ;  $p < 0.001$ ). It is important to note that there is a significant interaction between the factors, exercise and learning context exposition ( $F_{(1,32)} = 55.424$ ;  $p < 0.001$ ), since the chronic exercise increased acetylation levels in hippocampus from animals exposed to learning context. However, exercise did not alter H3H14 acetylation levels in hippocampus from non-exposed to learning context animals (Figure 1).

Neither exercise nor exposition to learning context showed any effect in phosphorylation of H3S10 (Figure 2).

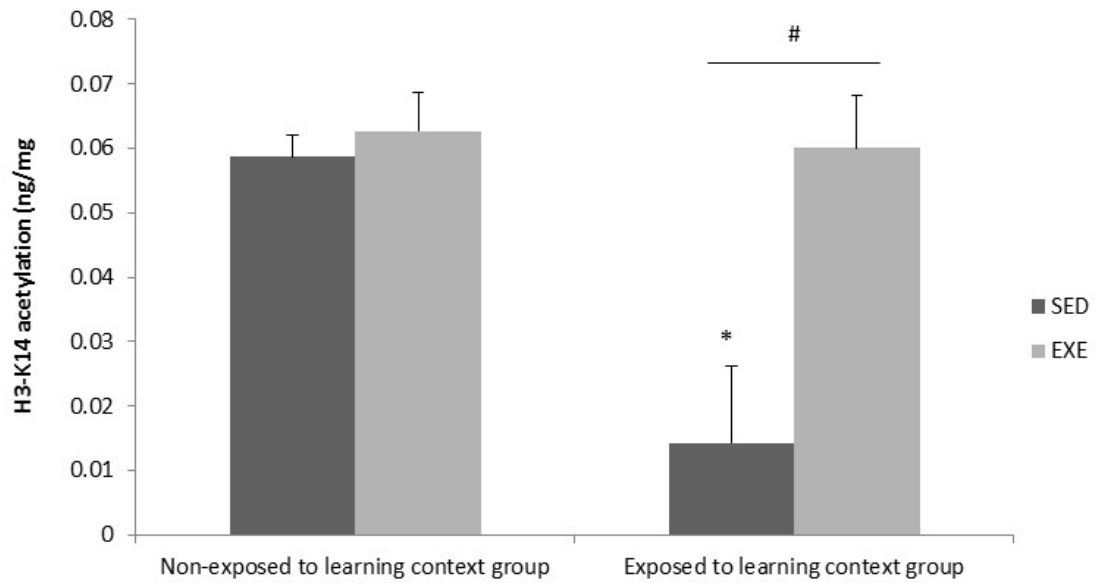


Figure 1 - Effect of exercise in hippocampal levels of H3K14 histone acetylation in Wistar rats exposed to inhibitory avoidance (exposed to learning context group) or non-exposed to inhibitory avoidance (non-exposed to learning context group). Columns represent mean  $\pm$  S.D. (n = 8-12). Two-way ANOVA followed by Duncan test, \*significantly different from the respective baseline group; # significantly different from the respective sedentary control group.

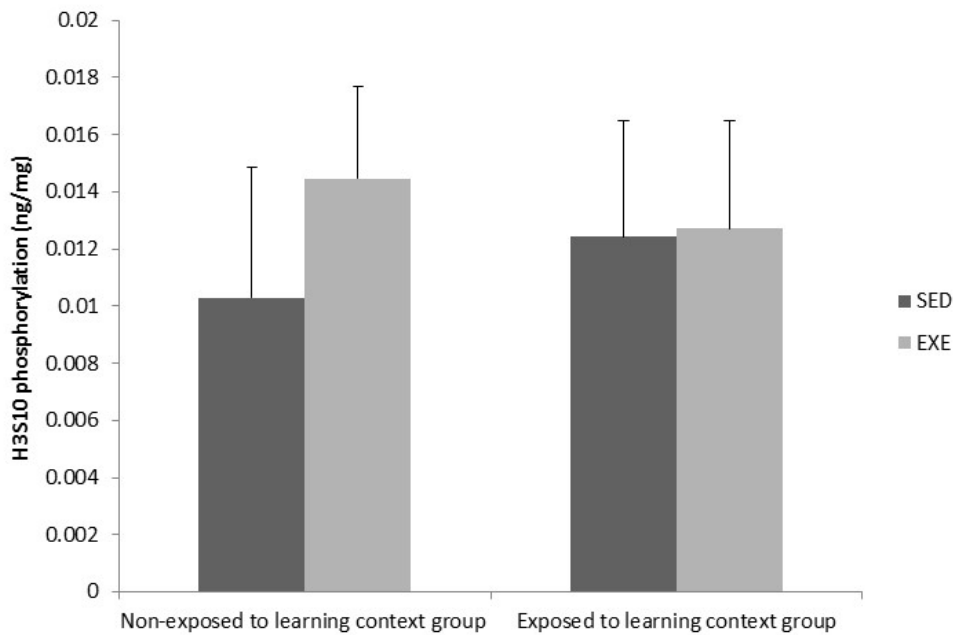


Figure 2 - Effect on exercise in hippocampal levels of H3S10 histone phosphorylation in Wistar rats exposed to inhibitory avoidance (exposed to learning context group) or non-exposed to inhibitory avoidance (non-exposed to learning context group). Columns represent mean  $\pm$  S.D. (n = 8-12). Two-way ANOVA.

#### 4. Discussion

This work compared the effect of exercise on histone H3K14 acetylation and phosphorylation of H3S10 in animals submitted or not to a learning context. It is important to describe that this exercise protocol (20 min/day during 2 weeks) improved transiently the inhibitory avoidance aversive memory performance in Wistar rats (Lovatel et al., 2013).

It has been demonstrated that fear conditioning training increases both acetylation of H3K14 and phosphorylation of H3S10, where various time points following the training period were analyzed (Chwang et al., 2006), although, the effect of session test was rarely evaluated. In this context, test session exposure has been performed in spatial memory paradigm (Bousiges, Vasconcelos, Neidl, Cosquer, Herbeaux, Panteleeva, Loeffler, Cassel, and Boutillier, 2010; Castellano, Fletcher, Kelley-Bell, Kim, Gallagher, and Rapp, 2012). It has been found an increase in the levels of H2B and H4 acetylation, without effect in H3K14, after a spatial learning context in Long Evans rats hippocampus (Bousiges et al., 2010). In addition, Castellano et al (2012) described an increase on H3 global acetylation in young and aged Long Evans rats hippocampi after a learning context (Morris Water Maze). Our data suggest that H3K14 acetylation is altered in hippocampus from rats exposed to inhibitory avoidance training and test, since it was observed a reduction of this parameter in the inhibitory avoidance group

compared to baseline group, indicating that aversive paradigm can induce a different result those obtained from spatial memory task after test session.

Other important result presented here is that our exercise protocol was able to reverse the inhibitory avoidance paradigm-induced decrease in H3K14 acetylation, without any effect in the baseline group (non-exposed to learning context). Our data support the idea that exercise may modify the responses in learning contexts through histone acetylation.

In accordance with our finding, voluntary exercise increases H4K12 acetylation in BDNF promoters in hippocampi from mice submitted to subthreshold learning context in object location memory task, suggesting that both histone modifications, H4K12 and H3K14 are highly sensitive to environmental stimulation (Intlekofer, Berchtold, Malvaez, Carlos, McQuown, Cunningham, Wood, and Cotman, 2013).

We have already reported that our chronic exercise protocol enhanced transitorily memory performance in inhibitory avoidance paradigm in 3 and 20 months-old Wistar rats, and the global H4 hipoacetylation was concomitantly reversed in aged rats (Lovatel et al., 2013). We can suggest that the exercise mechanism may be different between young and aged rats, since the chronic protocol was unable to alter HAT and HDAC activities and global H4 acetylation in young adult Wistar rats (Elsner et al., 2011). Indeed, Collins et al (2009) observed exercise effects on phosphorylation of H3S10 and acetylation of H3K14 only in the groups exposed to a novelty (new cage) or a stress factor (forced swimming). Taken together, we suggest that exercise is more effective in adverse situations, such as tasks exposure or aging process.

Some studies have suggested the involvement of H3S10 phosphorylation and H3K14 acetylation on memory formation (Chandramohan, Droste, Arthur, and Reul, 2008; Chwang, Arthur, Schumacher, and Sweatt, 2007; Chwang et al., 2006). Moreover, fear conditioning training increased the phosphoacetylation levels (H3S10 and H3K14) in Sprague-Dawley rats hippocampi (Chwang et al., 2006). Chandramohan and colleagues (2008) found increased phosphorylation of H3S10 levels and of H3K14 acetylation, after forced swimming test, with positive correlation between time of immobility (considered as a memory parameter by the authors) and phosphoacetylation levels (Chandramohan et al., 2008).

In contrast our result indicates that inhibitory avoidance training and test exposure did not affect phosphorylation of H3S10 levels. In accordance to our results, Castellano and colleagues (2012) described an increase on H3 global acetylation in young and aged Long Evans rats hippocampi after a learning context (Morris Water Maze) without any alterations in H3S10 phosphorylation (Castellano et al., 2012). This work is the first describing the effect of forced exercise on H3S10



phosphorylation in Wistar rats hippocampi, controlling the exposition to the learning context. We found that exercise did not change phosphorylation H3S10 levels, excluding this epigenetic modification as an important neuroprotective mechanism of exercise.

## **5. Conclusions**

Taken together, these data supports the hypothesis that the modulation on acetylation levels of H3K14 acetylation in hippocampus might be related, at least in partially, to exercise effects on aversive memory. Further studies are needed to clarify the details of the mechanisms by which histone acetylation may be modulated by exercise.

## References

- Abel, J. L., & Rissman, E. F. (2013). Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *31*, 382-390.
- Arida, R. M., Scorza, F. A., dos Santos, N. F., Peres, C. A., & Cavalheiro, E. A. (1999). Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Research*, *37*, 45-52.
- Berchtold, N. C., Castello, N., & Cotman, C. W. (2010). Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*, *167*, 588-597.
- Bousiges, O., Vasconcelos, A. P., Neidl, R., Cosquer, B., Herbeaux, K., Panteleeva, I., Loeffler, J. P., Cassel, J. C., & Boutillier, A. L. (2010). Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, *35*, 16.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, *7*, 248-254.
- Brooks, G. A., & White, T. P. (1978). Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol.*, *45*, 1009-1015.
- Castellano, J. F., Fletcher, B. R., Kelley-Bell, B., Kim, D. H., Gallagher, M., & Rapp, P. R. (2012). Age-Related Memory Impairment Is Associated with Disrupted Multivariate Epigenetic Coordination in the Hippocampus. *PLoS One.*, *7*, e33249.
- Chandramohan, Y., Droste, S. K., Arthur, S. C., & Reul, J. M. H. M. (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. *European Journal of Neuroscience*, *27*, 2701-2713.

- Chwang, W. B., Arthur, J. S., Schumacher, A., & Sweatt, J. D. (2007). The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J Neurosci.*, *27*, 12732-12742.
- Chwang, W. B., O'Riordan, K. J., Levenson, J. M., & Sweatt, J. D. (2006). ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem.*, *13*, 322-328.
- Collins, A., Hill, L. E., Chandramohan, Y., Whitcomb, D., Droste, S. K., & Reul, J. M. H. M. (2009). Exercise Improves Cognitive Responses to Psychological Stress through Enhancement of Epigenetic Mechanisms and Gene Expression in the Dentate Gyrus. *PLoS ONE*, *4*, 4330.
- Elsner, V. R., Lovatell, G. A., Bertoldi, K., Vanzella, C., Santos, F. M., Spindler, C., de Almeida, E. F., Nardin, P., & Siqueira, I. R. (2011). Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neuroscience*, *192*, 580-587.
- Gomez-Pinilla, F., Vaynman, S., & Ying, Z. (2008). Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur J Neurosci.*, *28*, 2278-2287.
- Graff, J., & Mansuy, I. M. (2009). Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur. J. Neurosci.*, *30*, 1-8.
- Intlekofer, K. A., Berchtold, N. C., Malvaez, M., Carlos, A. J., McQuown, S. C., Cunningham, M. J., Wood, M. A., & Cotman, C. W. (2013). Exercise and Sodium Butyrate Transform a Sub-threshold Learning Event into Long-Term Memory via a BDNF-Dependent Mechanism. *Neuropsychopharmacology.*, *aop1038/npp.2013.104*.
- Intlekofer, K. A., & Cotman, C. W. (2012). Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*.
- Korzus, E., Rosenfeld, M. G., & Mayford, M. (2004). CBP Histone Acetyltransferase Activity Is a Critical Component of Memory Consolidation. *Neuron*, *42*, 961-972.

- Levenson, J. M., O’Riordan, K. J., Brown, K. D., Trinh, M. A., Molfese, D. L., & Sweatt, J. D. (2004). Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 14.
- Levenson, J. M., & Sweatt, J. D. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci.*, 6, 108-118.
- Lovatel, G. A., Elsner, V. R., Bertoldi, K., Vanzella, C., Moysés, F. d. S., Vizuete, A., Spindler, C., Cechinel, L. R., Netto, C. A., Muotri, A. R., & Siqueira, I. R. (2013). Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 101, 94-102.
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R. C., Cota, P., Wittnam, J. L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., Salinas-Riester, G., Dettenhofer, M., Kan, H., Farinelli, L., Chen, W., & Fischer, A. (2010). Altered Histone Acetylation Is Associated with Age-Dependent Memory Impairment in mice. *Science*, 328, 753-756.
- Praag, H. v., Shubert, T., Zhao, C., & Gage, F. H. (2005 ). Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. *J Neurosci.*, 25, 8680-8685.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucsek, J., Sasvari, M., Nyakase, C., & Gotoc, S. (2001). Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemistry International* ), 38, 17-23.
- Spindler, C., Elsner, V., Moysés, F., Bertoldi, K., Cechinel, L. R., Basso, C., Roesler, R., Lovatel, G., & Siqueira, I. R. (2013). Treadmill exercise alters histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in frontal cortices from Wistar rats. *[submitted article]*
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41-45.
- Sweatt, J. D. (2009). Experience-Dependent Epigenetic Modifications in the Central Nervous System. *Biological Psychiatry*, 65, 191-197.
- Vecsey, C. G., Hawk, J. D., Lattal, K. M., Stein, J. M., Fabian, S. A., Attner, M. A., Cabrera, S. M., McDonough, C. B., Brindle, P. K., Abel, T., & Wood, M. A. (2007). Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB: CBP-Dependent Transcriptional Activation. *The Journal of Neuroscience*, 27, 12.

#### **4. Considerações Finais**

Os resultados do presente estudo demonstraram que o exercício de corrida em esteira foi capaz de modular os níveis de acetilação da H3K14, mas não a fosforilação da H3S10, em hipocampo de ratos Wistar de 3 meses expostos à esquiiva inibitória. E que a modulação desse parâmetro pode ser relacionada, pelo menos em parte, aos efeitos do exercício na memória aversiva. No entanto, são necessários mais estudos investigando esse mecanismo durante o processo de envelhecimento e em diferentes paradigmas de memória.