



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

**Laura Reck Cechinel**

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE MARCADORES EPIGENÉTICOS  
EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS WISTAR DURANTE O PROCESSO  
DE ENVELHECIMENTO**

**Porto Alegre,**

**2016**

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

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE MARCADORES EPIGENÉTICOS  
EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS WISTAR DURANTE O PROCESSO  
DE ENVELHECIMENTO**

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

**Laura Reck Cechinel**

**Orientadora:** Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

**Porto Alegre**

**2016**

"Daqui a vinte anos, você não terá arrependimento das coisas que fez, mas das que deixou de fazer. Por isso, veleje longe do seu porto seguro. Pegue os ventos. Explore. Sonhe. Descubra"

Mark Twain

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, por todo apoio desde sempre, por acreditarem em mim, em especial minha mãe, heroína que me deu incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

A Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida em todos os momentos.

Agradeço muito ao meu namorado, Flávio, que durante todo este período foi companheiro, atencioso e compreensivo nos momentos de ausência e por sempre ter me apoiado e acreditado no meu potencial.

Um agradecimento especial à minha orientadora Ionara, pela dedicação e conhecimento que foi transmitido e também pela confiança ao longo dos anos no laboratório.

A todos colegas e amigos que passaram, desde a iniciação científica até hoje, pelo laboratório de neuropsicofarmacologia, muito obrigada por todo apoio, carinho, amizade. Me ajudaram a passar por todas as dificuldades encontradas nestes anos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pelas oportunidades e também aos professores do Departamento de Fisiologia pelo conhecimento transmitido.

Ao CNPq por ter me concedido bolsa e financiamento para realização do mestrado.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>VI</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>VII</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>1.Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Envelhecimento .....	1
1.2. Exercício Físico .....	2
1.3. Epigenética .....	6
1.3.1. Epigenética e envelhecimento .....	10
1.3.2. Epigenética e exercício físico .....	13
<b>2.Hipótese</b> .....	<b>15</b>
<b>3.Objetivos</b> .....	<b>15</b>
3.1. Objetivo Geral.....	15
3.2. Objetivos Específicos.....	15
<b>4.Materiais e Métodos</b> .....	<b>16</b>
4.1. Animais.....	16
4.2. Treinamento do Animais.....	17
4.2.1. Sessão Única .....	18
4.2.2. Protocolo de Exercício Diário Moderado .....	18
4.3. Preparação das Amostras .....	19
4.4. Quantificação dos Marcadores Epigenéticos.....	20
4.4.1. Quantificação dos níveis de acetilação global da histona 4 (H4) ...	20
4.4.2. Determinação da atividade da enzima metiladora da H3K27 .....	21
4.4.3. Quantificação do conteúdo de DNA metiltransferase 1 e 3b .....	21
<b>5.Análise Estatística</b> .....	<b>22</b>
<b>6.Resultados</b> .....	<b>23</b>
6.1. Acetilação global da H4 .....	23
6.2. Atividade da enzima HMT H3K27 .....	24
6.3. Conteúdo de DNMT1 e DNMT3b .....	26
<b>7.Discussão</b> .....	<b>29</b>
<b>8.Conclusões</b> .....	<b>34</b>
<b>9.Referências Bibliográficas</b> .....	<b>35</b>

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Esteira ergométrica adaptada para ratos.....	4
Figura 2. Estrutura da cromatina, formada por histonas envolvidas por duas moléculas de DNA; Octâmero central do nucleossomo, formado por quatro pares de histonas.....	7
Figura 3. Metilação do DNA. Processo catalisado pelas enzimas DNMT1 e DNMT3a/3b. Transferência do o grupo metil da molécula SAM para a posição 5' da citosina.....	10
Figura 4. Representação gráfica da linha de tempo do protocolo sessão única.....	18
Figura 5. Representação gráfica da linha de tempo do protocolo exercício diário moderado.....	19
Figura 6. Efeito da sessão única de exercício (A) e do exercício diário moderado (B) sobre os níveis de acetilação global da histona H4 em córtex frontal de ratos Wistar de 3 e 21 meses.....	23
Figura 7. Efeito da sessão única de exercício (A) e do exercício diário moderado (B) sobre a atividade da enzima HMT H3K27 em córtex frontal de ratos Wistar de 3 e 21 meses.....	25
Figura 8. Efeito da sessão única de exercício (A) e do exercício diário moderado (B) sobre o conteúdo de DNMT3b em córtex frontal de ratos Wistar de 3 e 21 meses.....	27
Figura 9. Efeito da sessão única de exercício (A) e do exercício diário moderado (B) sobre o conteúdo de DNMT1 em córtex frontal de ratos Wistar de 3 e 21 meses.....	28

**LISTA DE ABREVIATURAS**

SNC – Sistema nervoso central

VO<sub>2</sub> máx – Consumo máximo de oxigênio

FC – Frequência cardíaca

CREB – Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMP cíclico

AMPC – Adenosina monofostato cíclico

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos

DNA - Ácido desoxirribonucléico

HAT - Histona Acetiltransferase

HDAC - Histona Desacetilase

H3K9 – Histona 3 lisina 9

HMT - Histona Metiltransferases

HDM – Histona Desmetilase

SAM - S-adenosilmetionina

SAH S-adenosil homocisteína

DNMT - DNA Metiltransferases

H3K27 – Histona 3 lisina 27

PCR2 – Polycomb repressive complex 2

EZH2 - Enhancer of zeste homolog 2

DCX – Doublecortin

CREAL - Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

EXE - Exercitado

SED - Sedentário

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

m/min - Metros por minuto

TCA – Ácido Tricloroacético

ANOVA - Análise de Variância

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

PAG – Substância periaquedutal



## RESUMO

Ao longo dos últimos anos observou-se um aumento no número de idosos no mundo, com isso faz-se necessário buscar terapias que amenizem os danos relacionados e também elucidar os mecanismos envolvidos neste processo. O exercício físico tem sido sugerido como uma ferramenta importante, não farmacológica, para atenuar os déficits relacionados à idade. Ainda, estudos recentes sugerem uma relação entre o processo de envelhecimento cerebral e o desequilíbrio de mecanismos epigenéticos, contudo, estes dados ainda não são conclusivos. Sabe-se que o grau de neuroplasticidade varia com a idade e que as estruturas encefálicas podem responder diferentemente à exposição ao exercício. Estudos demonstram que o córtex pré-frontal está envolvido em funções de alta ordem como atenção, tomada de decisão e memória de trabalho. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes protocolos de exercício físico (sessão única e exercício diário moderado) sobre a modulação de marcadores epigenéticos em córtex pré-frontal de ratos Wistar de 3 e 21 meses de idade. Os animais foram submetidos ao protocolo de sessão única (20 minutos) ou o exercício diário moderado (20 minutos durante 14 dias), 1 hora após a última sessão foram eutanasiados. O córtex pré-frontal foi dissecado e a acetilação da H4, o conteúdo da DNA metiltransferase (DNMT1 e DNMT3b), assim como a atividade da histona metiltransferase H3K27 foram analisadas. O protocolo de exercício diário moderado induziu um aumento na acetilação da H4 em córtices de animais envelhecidos, sem efeitos no grupo adulto jovem. Os níveis de DNMT3 em córtex de animais envelhecidos aumentaram após a sessão única de exercício. Os protocolos de exercício e o processo de envelhecimento não induziram modificações significativas no conteúdo de DNMT1 e na atividade de HMT H3K27. Estes resultados indicam que o córtex pré-frontal de animais de 21 meses são mais susceptíveis a alterações epigenéticas induzidas pelo exercício de forma protocolo dependente. Ainda, é possível propor que os protocolos de exercício avaliados impactem diferentemente os parâmetros epigenéticos, no entanto, não podemos associar a benefícios específicos induzidos pelo exercício.

Palavras chave: Envelhecimento, Exercício, Acetilação de histonas, DNA metiltransferase.

## ABSTRACT

Over the past few years the number of elderly people has increased in the world, therefore it is necessary to search therapies that ameliorate age-related deficits as well as elucidate the mechanisms involved in this process. Physical exercise has been suggested as an important non-pharmacological approach to alleviate the age-related decline. Furthermore, recent studies have suggested a relationship between the process of brain aging and imbalance of epigenetic mechanisms, however, these data are not conclusive. It is well described that prefrontal cortex is involved in higher functions like attention, decision making and working memory. Then, the aim of this study was to investigate the effects of two exercise protocols (single session and daily moderate exercise) on the modulation of epigenetic markers in the prefrontal cortex from Wistar rats of 3- and 21- months-old. Animals were submitted to single session protocol (20 minutes) or the daily moderate exercise (20 minutes for 14 days), and 1 hour after the last exercise session animals were euthanized. Prefrontal cortex was dissected out and acetylation of H4, the content of DNA methyl transferase (DNMT1 and DNMT3B), as well as histone methyltransferase H3K27 activity were analyzed. Daily moderate exercise protocol induced an increase in cortical H4 acetylation of aged rats with no effects in the young adult group. However, DNMT3 levels in cortex from aged animals were increased after the single session protocol. In addition, single session and moderate exercise protocol did not affect cortical DNMT1 content and HMT H3K27 enzyme activity levels in both tested age groups. These results indicate that prefrontal cortex of 21-months-old animals are more susceptible to epigenetic changes induced by exercise in a protocol-dependent manner. Moreover, it is possible to suggest that the exercise protocols influence differently epigenetic parameters, however, it is not possible to link with specific benefits induced by exercise.

Keywords: Aging; cortex; treadmill exercise; histone acetylation; DNA methyltransferase.

## **1. Introdução**

### **1.1. Envelhecimento**

Nas últimas décadas observou-se uma alteração no perfil demográfico mundial caracterizado pelo envelhecimento acentuado da população (Lima-Costa e Veras, 2003). O relatório sobre as perspectivas de vida da Organização das Nações Unidas de 2011 destaca que o número de pessoas com 65 anos ou mais superará o de crianças menores de 5 anos antes de 2020 (Organization, 2011). No Brasil, segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e estatística, idosos com idade igual ou acima de 60 anos correspondem a 11,8% da população geral. No Rio Grande do Sul, 13,6% da população total do estado é considerada idosa, sendo o estado brasileiro com a maior população nesta faixa etária (Censo, 2010).

O aumento da expectativa de vida é um fenômeno global, em decorrência dos avanços na medicina, da tecnologia e o acesso ao saneamento básico (Lima-Costa e Veras, 2003; Silva e Boemer, 2009). Estes fatores contribuem para o envelhecimento da população e conseqüente aumento da prevalência de doenças relacionadas à idade, como doenças neurodegenerativas, diabetes, hipertensão, doenças cardíacas, osteoporose, dislipidemias, entre outras, o que torna iminente a necessidade de atenção à população idosa. Desta forma, o aumento da expectativa de vida é um gerador de desafios a diversas áreas do conhecimento, assim, o processo biológico de envelhecimento e seus aspectos psicossociais necessitam ser estudados.

O envelhecimento é um processo dinâmico e progressivo caracterizado pelo declínio das funções fisiológicas e bioquímicas, envolve a perda progressiva dos tecidos e da funcionalidade dos órgãos (Flatt, 2012). Durante o processo

de envelhecimento, uma perda gradual da capacidade de adaptação do indivíduo (Mahncke *et al.*, 2006) assim como um prejuízo nas funções motoras e cognitivas podem ser observadas, tornando o idoso mais susceptível a um vasto número de enfermidades (Souza *et al.*, 2007; Paradies *et al.*, 2011; Jurgens e Johnson, 2012).

As células senescentes apresentam falhas no sistema imunológico como também no sistema antioxidante, diminuição da plasticidade neuronal, alterações na atividade microglial e mudanças na expressão de genes (Flatt, 2012).

## **1.2. Exercício Físico**

Diversos estudos trazem evidências apoiando a hipótese de que intervenções ambientais, como alimentação e principalmente o exercício físico, podem reverter parcialmente o declínio cognitivo e sintomas depressivos relacionados ao envelhecimento além de reduzir o risco de neurodegeneração (Cotman *et al.*, 2007). Nesse contexto, sugere-se o exercício como um importante instrumento profilático e terapêutico (Kramer *et al.*, 1999).

Já existiam relatos sobre algumas atividades as quais poderiam ser classificadas como atividade física. Esta prática era considerada como um componente integral da expressão religiosa, social e cultural, no início da história da humanidade (Antunes *et al.*, 2006). Ao longo dos últimos anos diversos trabalhos enfatizam a importância do exercício físico na melhoria da qualidade de vida e da autoestima (Duman, 2005). Além disso, estudos demonstram que a prática regular do exercício físico pode desencadear diferentes respostas fisiológicas como alterações em parâmetros

cardiovasculares, respiratórios, (Wilmore e Costill, 2001) e também pode interferir na sinalização dos fatores de crescimento e marcadores inflamatórios (Cotman *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos sugerem que os efeitos do exercício são dependentes do protocolo utilizado, podendo variar quanto à intensidade, frequência e duração (Narath *et al.*, 2001). Em relação à intensidade do exercício, ela pode ser classificada como leve, moderada e intensa. Essa classificação depende da intensidade do esforço realizado pelo indivíduo e pode ser mensurada pela capacidade que o indivíduo tem de captar e utilizar o oxigênio inspirado para gerar trabalho, comumente chamada de taxa de consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx) (Hambrecht *et al.*, 1998; Drummond *et al.*, 2005). A intensidade do exercício pode ser expressa como percentual do  $VO_2$  máx ou frequência cardíaca (FC) máxima. Exercícios de intensidade moderada são realizados a uma intensidade relativa de 40% a 60% do  $VO_2$  máximo, enquanto que sessões de treinamento intensas acontecem a mais de 60% do  $VO_2$  máximo (Thompson *et al.*, 2003). Para uma sessão de treinamento moderada ou intensa a frequência cardíaca do indivíduo deve ser entre 50 e 70% da FC máxima, já em sessões de treinamento intenso a frequência desejada será de 70 a 85% da FC máxima (Tao *et al.*, 2015). Além da intensidade, o exercício pode variar quanto a sua motivação, podendo ser voluntário ou forçado. Modelos experimentais de exercício voluntário, como a roda de livre acesso, são bem consolidados na literatura, porém o controle das variáveis que o influenciam não é tão preciso (Russell *et al.*, 1987). No entanto, protocolos de exercício forçado, que normalmente utilizam esteira adaptada, permitem um maior controle das variáveis (Figura 1) (Radak *et al.*, 2006).

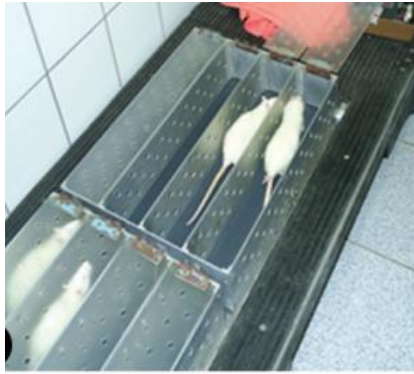


Fig. 1. Esteira ergométrica adaptada para ratos. Adaptado de (Souza *et al.*, 2014)

Em modelos animais, diversos trabalhos têm evidenciado os efeitos neuroprotetores promovidos pelo exercício (Radak *et al.*, 2006; Scopel *et al.*, 2006). Algumas regiões encefálicas como hipocampo, estriado e córtex recebem maior atenção dado ao seu maior comprometimento tanto no envelhecimento saudável quanto patológico (Vissing *et al.*, 1996). Entre essas estruturas, é interessante destacar que o córtex pré-frontal tem papel central nas funções cognitivas superiores, como atenção, tomada de decisão e memória de trabalho (Liston *et al.*, 2006). Várias evidências demonstram que o processo normal de envelhecimento está associado ao declínio da memória e função executiva, (Bishop *et al.*, 2010; Silver *et al.*, 2011; El Haj e Allain, 2012) além de indicar uma conexão com a perda de tecido nos córtices frontal, temporal e parietal (Colcombe *et al.*, 2003; Erickson *et al.*, 2010; Bugg e Head, 2011). Estas regiões apresentam alta atividade neuronal durante o exercício, sendo, desta forma, susceptíveis à neuroplasticidade causada pela atividade física (Cheung e Broman, 2000).

Em trabalhos realizados utilizando protocolos voluntários foi observado que o livre acesso a roda de corrida atenuou o declínio da neurogênese em ratos envelhecidos quando comparados ao grupo controle (Van Praag *et al.*, 1999).

Além disso, os benefícios promovidos pelo exercício também são observados em animais jovens. Nestes, 30 minutos de corrida durante 7 dias aumentaram a proliferação celular hipocampal em comparação ao controle (Mukuda *et al.*, 2014).

Desta forma, a prática regular de exercício físico é uma ferramenta importante na promoção da neuroproteção, uma vez que reestabelece e melhora a plasticidade no córtex envelhecido além de servir como uma terapia para redução da senescência (Colcombe *et al.*, 2004; Navarro, 2004). Com isso o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos centrais do exercício torna-se relevante no meio científico (Radak *et al.*, 2006). Cabe descrever que o exercício modula processos de transcrição de genes envolvidos na plasticidade sináptica (Schmolesky *et al.*, 2013). Neste contexto, é importante citar que o exercício parece aumentar a expressão de genes de resposta imediata, como por exemplo, o c-fos (Collins *et al.*, 2009), além do fator de transcrição CREB (Proteína de ligação ao Elemento Responsivo ao AMPc) (Molteni *et al.*, 2002). Ainda, Selcher e colegas (2001) inferem que a prática do exercício pode aumentar a expressão gênica de muitos componentes da cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), a qual está envolvida na plasticidade sináptica, formação de memória e integração de múltiplos sinais extracelulares.

A partir disso, nosso grupo de pesquisa busca estudar os mecanismos de ação do efeito neuroprotetor de diferentes protocolos de exercício físico. Nesse contexto, observamos que a corrida em esteira diariamente por duas semanas (60% VO<sub>2</sub>, protocolo moderado) foi capaz de reduzir o dano induzido por isquemia *in vitro* em fatias hipocampais de ratos, podendo ser sugerido como

um protocolo neuroprotetor (Scopel *et al.*, 2006). Esse mesmo protocolo melhorou o desempenho em teste de memória aversiva de ratos de 3 e 20 meses, correlacionando este resultado ao conteúdo de mediadores inflamatórios (Lovatel *et al.*, 2012). Recentemente, diversos trabalhos observaram que ratos exercitados em esteira ergométrica apresentam aumento significativo na expressão de sinapsina e sinaptofisina no córtex motor (Garcia *et al.*, 2012), além de induzir um aumento na expressão cortical de fatores angiogênicos em ratos (Ding *et al.*, 2006).

Existem também evidências de que o exercício físico altere marcadores epigenéticos de forma dependente do regime de treinamento utilizado (Gomez-Pinilla *et al.*, 2011; Lovatel *et al.*, 2012; Elsner *et al.*, 2013), no entanto, sabe-se pouco sobre os efeitos do exercício nestes marcadores, em estruturas corticais.

### **1.3. Epigenética**

Epigenética é definida como o estudo das mudanças estruturais e herdáveis da cromatina que modificam o fenótipo sem que o genótipo seja alterado (Rountree *et al.*, 2001; Yoo e Jones, 2006). Estas alterações estruturais ocorrem no DNA, mas também nas proteínas nucleares, especialmente as histonas. Há indícios de que processos como aprendizagem, memória e até o envelhecimento do organismo seja epigeneticamente modulados (Dos Santos Sant'anna *et al.*, 2013; Lovatel *et al.*, 2013). Além da metilação e acetilação de histonas além da metilação do DNA são, até então, as modificações epigenéticas mais estudadas, uma vez que estas alterações podem influenciar a transcrição gênica (Kouzarides, 2007; Gräff e Sanchez-Mut, 2015).



As modificações epigenéticas incluem alterações que promovem a compactação ou relaxamento da cromatina, e portanto, modulam o acesso de fatores de transcrição e outras proteínas reguladoras às regiões promotoras, por exemplo. A cromatina consiste em uma unidade de DNA dividida em duas espirais, as quais se enrolam em torno de um octâmero protéico constituído por quatro pares de proteínas histônicas: H2A, H2B, H3 e H4 (Figura 2) (Luger *et al.*, 2012). As caudas N-terminais das histonas sofrem uma variedade de modificações pós-transdacionais que podem levar à repressão ou ativação da transcrição gênica (Jarome e Lubin, 2013), entre estas alterações estão a acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação em diferentes resíduos de aminoácidos (Kimura, 2013).

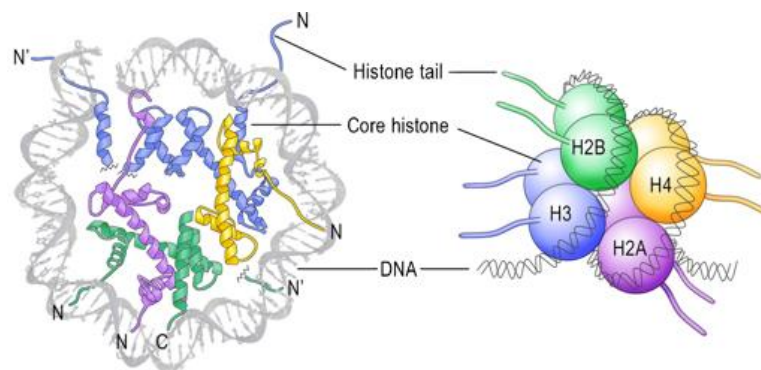


Fig. 2. Estrutura da cromatina, formada por histonas envolvidas por duas moléculas de DNA; Octâmero central do nucleossomo, formado por quatro pares de histonas (Gräffe e Mansuy, 2008)

O estado dinâmico de acetilação e desacetilação de histonas é regulado por dois grupos de enzimas, as Histonas Acetiltransferases (HAT) e as Histonas Desacetilases (HDAC), respectivamente. A HAT catalisa a adição do grupo acetil da molécula doadora acetil-coenzima A (acetil-CoA) em lisinas (K) na cauda N-terminal das histonas. Com isso a cromatina adota uma configuração mais aberta, podendo facilitar o processo de transcrição gênica (Yoo e Jones,

2006; Waggoner, 2007). Inversamente, as HDAC desacetilam as lisinas (K) das histonas, ou seja, removem o grupo acetil destas proteínas, ligando-se fortemente ao DNA, e assim, tornam a estrutura da cromatina mais compacta (Strahl e Allis, 2000; Turner, 2000).

Como foi descrito inicialmente, as modificações nas histonas podem levar ao relaxamento da cromatina e consequente ativação da atividade transcricional, ou então ocorre a compactação resultando em repressão da transcrição gênica. Este processo está, geralmente, associado a metilação das histonas, no entanto a metilação também pode favorecer a transcrição, dependendo do resíduo de aminoácido que modificado. Por exemplo, metilação de H3K4 em regiões promotoras tem geralmente um efeito pró-transcricional, enquanto que a metilação de H3K9 ou 27, possui geralmente efeito repressor. Os resíduos de lisina podem ser mono, di, ou trimetilados e, dependendo do resíduo de lisina metilado, um efeito diferente na transcrição gênica é observado (Gupta-Agarwal et al., 2014). Por exemplo, di-metilação do resíduo de lisina 9 da histona 3 (H3K9me<sub>2</sub>) promove o silenciamento gênico (Gupta et al., 2010), assim como a tri-metilação neste mesmo resíduo (H3K9me<sub>3</sub>).

A metilação, nos seus diferentes graus, é um processo catalisado por grupos enzimáticos denominados, histonas metiltransferases (HMT) e histonas desmetilases (HDM) (Gupta-Agarwal et al., 2014), as quais promovem uma regulação coordenada da metilação específica e, consequentemente, o controle da transcrição de genes. As histonas metiltransferases transferem grupo (s) metil da molécula doadora S-adenosilmetionina (SAM) para resíduos de lisina ou arginina das histonas. As HMTs apresentam um alto grau de

especificidade pela lisina e também pelo grau de metilação do resíduo (Elsner et al., 2013).

Além das modificações em histonas, o DNA também pode ser metilado. A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil nos nucleotídeos localizados em regiões chamadas de ilhas CpG, esta reação é catalisada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs). Estas enzimas transferem o grupo metil da molécula doadora S-adenosilmetionina (SAM) para a posição 5' do anel piramídico da citosina, formando 5-metil desoxicitidina e S-adenosil homocisteína (SAH), processo que resulta na redução da transcrição gênica (Figura 3) (Reik *et al.*, 1999). Há 2 famílias de DNMTs: as DNMTs de manutenção, responsáveis por manter os padrões de metilação durante o processo de replicação celular, incluindo DNMT1, que utiliza como substrato DNA hemi-metilado; e as DNMTs com função de metilação propriamente dita dos genes (mecanismo denominado como metilação *de novo*), as DNMT3a e DNMT3b, as quais estão envolvidas na transferência de grupos metil para sítios previamente não metilados (Reik et al., 1999). Este processo normalmente reprime a transcrição gênica, no entanto, não existem indícios que isso aconteça em todas as situações (Guenther *et al.*, 2007; Gräff e Sanchez-Mut, 2015).

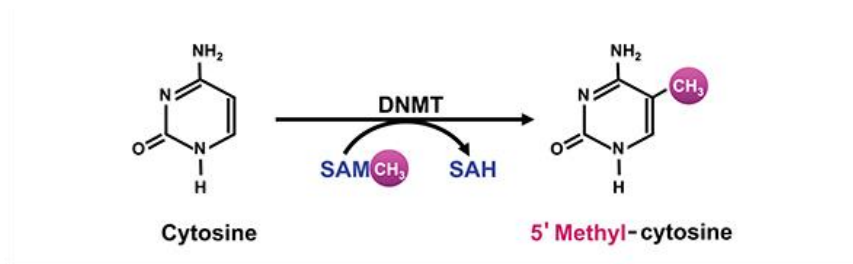


Fig. 3. Metilação do DNA. Conversão da citosina em 5' metil-citosina através da ação da DNMT, que catalisa a transferência o grupo metil da molécula doadora SAM para a posição 5' do anel piramidal da citosina. A molécula doadora SAM é convertida à SAH. (Zakhari, 2013)

### 1.3.1. Epigenética e envelhecimento

Diversos estudos têm demonstrado que o envelhecimento pode induzir modificações epigenéticas e conseqüentemente modular a expressão de genes específicos, o que pode influenciar em processos fisiológicos e fisiopatológicos envolvidos neste processo (Walker *et al.*, 2013; Chisholm e Sohrabji, 2016). A partir disso, nosso grupo de pesquisa tem buscado elucidar os mecanismos epigenéticos associados ao processo de envelhecimento normal em modelos experimentais.

Recentemente, em um estudo que avaliou o perfil de acetilação da histona H4 em hipocampo de animais envelhecidos observamos a existência de um estado hipoacetilado desta histona. É relevante destacar que a presença deste estado hipoacetilado pode indicar um desequilíbrio entre as atividades das enzimas HAT e HDAC (HAT/HDAC) a favor da HDAC. A perda deste balanço (HAT/HDAC) parece ser um mecanismo crítico e decisivo envolvido na disfunção e na toxicidade neuronal, fatores relacionados a desordens neurodegenerativas e ao envelhecimento (Saha e Pahan, 2006; Elsner *et al.*, 2011; Dos Santos Sant'anna *et al.*, 2013).

Estudos também indicam que a metilação de histonas pode regular a expressão de genes envolvidos no processo de envelhecimento (Kuzumaki *et al.*, 2010). A metilação da lisina 27 na histona 3 (H3K27), seja mono-, di- ou tri-metilação, é um marcador de repressão da transcrição gênica descrito por diversos autores (Delcuve *et al.*, 2012; Lui *et al.*, 2014). Esta alteração é catalisada por uma família de HMTs identificadas como complexo repressor polycomb (“polycomb repressive complex 2”, PRC2). Uma das subunidades catalíticas deste complexo metilador é o “Enhancer of zeste homolog 2” (EZH2) (Mozzetta *et al.*, 2015).

Além de estar presente na regulação de diversos mecanismos celulares envolvendo o câncer (Bracken *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013), a metilação da H3K27 também é importante durante o processo do envelhecimento. Wang e colegas (2010) avaliaram o efeito da idade em cérebro de camundongos envelhecidos e observaram um padrão de hipermetilação da H3K27me3, indicando um silenciamento gênico durante o envelhecimento. Estes dados podem estar relacionados aos de Kuzumaki e colaboradores (2010), que observaram um aumento da H3K27me3 hipocampal no promotor do gene “doublecortin” (DCX), um marcador de diferenciação neuronal, durante o envelhecimento. Ainda, avaliaram o perfil de metiltransferases no hipocampo, durante o envelhecimento. Neste trabalho não foi possível identificar nenhuma alteração na expressão do mRNA do EZH2. Os autores sugerem que, o envelhecimento possa alterar a metilação de histonas, sem efeito sobre as histonas metiltransferases no hipocampo (Kuzumaki *et al.*, 2010). Apesar disso, há trabalhos que descrevem a importância das HMTs em diversos mecanismos regulatórios cruciais para os processos celulares,

indicando que um desequilíbrio entre as proteínas desmetiladoras e estes complexos metiladores podem ser determinantes para o prognóstico de desordens neurológicas (Li *et al.*, 2013; Mozzetta *et al.*, 2015). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o exercício físico pode modular a metilação da H3K9, em hipocampos de animais jovens e envelhecidos (Elsner *et al.*, 2013), uma marca possivelmente repressora, assim como a H3K27. Cabe destacar que, trabalhos que avaliem as enzimas metiladoras de histonas durante o envelhecimento normal são escassos, assim como o impacto do exercício físico neste processo.

É interessante ainda ressaltar o envolvimento de DNMTs durante o envelhecimento. Recentemente demonstramos que hipocampos de ratos Wistar de 20 meses apresentaram uma redução no conteúdo da enzima DNMT1, quando comparados aos controles adultos jovens (3 meses), sugerindo uma redução nos níveis de metilação do DNA. Nossos achados podem estar relacionados àqueles obtidos por Lopatina e colegas (2002), os quais descreveram uma diminuição na atividade da DNMT1 em fibroblastos humanos senescentes. Estes dados sugerem que modificações nos níveis de metilação do DNA durante o processo de envelhecimento podem ser decorrentes de alterações no conteúdo e na atividade das enzimas DNMTs.

É importante destacar que agentes que promovam modificações no perfil epigenético podem estar associadas à melhora dos déficits relacionados à idade. O exercício físico parece ser um recurso terapêutico promissor no tratamento de desordens neurodegenerativas, e assim contribuir para a melhora da qualidade de vida destes pacientes (Saha e Pahan, 2006).

### 1.3.2. Epigenética e exercício físico

Uma vez que o exercício é proposto como terapia promissora para atenuar os sintomas do envelhecimento, nosso grupo busca avaliar o efeito de diferentes protocolos de exercício. Demonstramos recentemente, que o exercício físico altera a atividade de HATs e HDACs no hipocampo de ratos Wistar adultos exercitados. A sessão única de exercício diminuiu a atividade da HDAC, aumentou a atividade da HAT na histona H4 e aumentou o balanço da relação HAT/HDAC, um indicativo de hiperacetilação de histonas (Elsner et al., 2011). Estes dados apoiam a hipótese de que os efeitos do protocolo de exercício (sessão única) podem estar relacionados, pelo menos em parte, com a modulação da atividade da HAT e da HDAC. No entanto, o exercício diário moderado (duas semanas) aumentou a atividade da HAT na histona H4 nos animais exercitados quando comparado aos sedentários, índice que pode indicar um aumento na acetilação, mas não alterou a atividade da HDAC e nem o balanço HAT/HDAC (Elsner *et al.*, 2011). O fato de o exercício alterar diferentemente a atividade da HAT na histona H4, e não ter efeito na histona H3 pode ser explicado pelo grau de especificidade da HAT proposto por Turner (2000), sendo que os efeitos desta enzima dependem das histonas nas quais age. Este protocolo de exercício diário também impactou animais envelhecidos uma vez que maiores níveis de acetilação da histona H4 foram observados em hipocampo de ratos de 21 meses de idade (Lovatell *et al.*, 2013). Ainda, nosso grupo demonstrou o efeito do exercício físico em dois protocolos de exercício em esteira ergométrica no córtex frontal de ratos Wistar. A sessão única de exercício aumentou a atividade da HAT, enquanto

que, o protocolo moderado diário reduziu a atividade da HDAC em córtex frontal de ratos adultos (Spindler *et al.*, 2014).

Há evidências relevantes sobre a relação das DNMTs com exercício. Tem sido proposto na literatura que uma sessão única de exercício pode reduzir o conteúdo hipocampal das enzimas DNMT1 e DNMT3b em animais adultos. No entanto estes níveis não foram modificados pelo protocolo diário. Rodrigues *et al.* (2015) demonstrou, em ratos Wistar, que o exercício de natação durante 4 semanas (20 sessões) reverteu parcialmente a redução da metilação global em hipocampo induzida pelo isolamento social, um modelo de estresse. É interessante descrever que, em humanos, houve uma maior metilação periférica de DNA em indivíduos que realizam aproximadamente 30 minutos diários de atividade física, quando comparados aos que realizam menos do que 10 minutos (Zhang *et al.*, 2011; Horsburgh *et al.*, 2015). Os diferentes perfis de metilação do DNA decorrentes da natação e da esteira mostram que o tipo e o protocolo de exercício são importantes na modulação desse marcador epigenético,

É interessante notar que as modificações epigenéticas discutidas já foram associadas a melhorias das funções cerebrais após o exercício, no entanto estes resultados foram focados apenas em hipocampus (Elsner *et al.*, 2011; Dos Santos Sant'anna *et al.*, 2013; Elsner *et al.*, 2013; Lovatel *et al.*, 2013). Assim é importante avaliar o efeito do exercício físico no córtex pré-frontal de ratos Wistar no que diz respeito aos níveis de acetilação da histona 4 (H4) e sobre o conteúdo de DNMTs em diferentes fases do desenvolvimento e ainda a atividade da histona metiltransferase H3K27.



## **2. Hipótese**

Nossa hipótese de trabalho é que o exercício físico possa alterar diferentemente os níveis de acetilação global da H4 e do conteúdo das DNMTs além da atividade da enzima HMT/H3K27 em córtex pré-frontal de animais jovens e em animais envelhecidos.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo Geral**

Estudar o efeito do envelhecimento sobre a acetilação global da H4, sobre as enzimas metiladoras de DNA (DNMT1 e DNMT3b) e metiladoras da histona 3 na lisina 27 (KMT/H3K27) em córtex de ratos Wistar submetidos a diferentes protocolos de exercício físico.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Quantificar os níveis de acetilação global da H4 em córtex de ratos Wistar de 3 e 21 meses de idade submetidos a diferentes protocolos de exercício físico.
- Avaliar a atividade da enzima KMT/H3K27 em córtex de ratos Wistar de 3 e 21 meses de idade submetidos a diferentes protocolos de exercício físico.
- Quantificar o conteúdo de DNMT1 e DNMT3b em córtex de ratos Wistar de 3 e 21 meses de idade submetidos a diferentes protocolos de exercício físico.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Animais

Para este estudo foram utilizados no total, 40 ratos Wistar. Os animais utilizados neste trabalho tinham diferentes idades (ratos jovens de 3 meses de idade e ratos envelhecidos de 21 meses de idade). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob nº 21449.

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Eles foram alocados em grupos de no máximo 5 em caixas de Plexiglass, forradas com maravalha e foram mantidos em condições padrão (ciclo de 12 h claro/escuro), com controle da temperatura ( $21 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e água e comida fornecidas à vontade.

Neste estudo, foram utilizados animais de 2 idades, realizados 2 protocolos de exercício em animais sedentário (SED) ou exercitados (EXE) ( $2 \times 2 \times 2 = 8$ ).

Portanto, foram 8 grupos experimentais ( $n=5$ ):

- Animais 3 meses (adulto jovens); sessão única de exercício; SED
- Animais 3 meses (adulto jovens); sessão única de exercício; EXE
- Animais 3 meses (adulto jovens); protocolo diário moderado; SED
- Animais 3 meses (adulto jovens); protocolo diário moderado; EXE
- Animais 21 meses (envelhecidos); sessão única de exercício; SED
- Animais 21 meses (envelhecidos); sessão única de exercício; EXE
- Animais 21 meses (envelhecidos); protocolo diário moderado; SED
- Animais 21 meses (envelhecidos); protocolo diário moderado; EXE

Todas as medidas necessárias a fim de minimizar o número e o sofrimento dos animais foram tomadas. Todos os experimentos se mantiveram dentro dos

critérios e normas estabelecidos na Lei Arouca (11.794) e no “Guide for Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publicação nº 80-23, revisado em 1996).

#### **4.2. Treinamento dos Animais**

O treinamento dos animais foi realizado sempre no período da tarde entre 14 e 17 horas (Spindler *et al.*, 2014). Este treinamento consistiu em corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos. A esteira utilizada continha oito pistas individuais separadas entre si por divisórias de acrílico (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) (Scopel *et al.*, 2006; Cechetti *et al.*, 2007).

Para determinar a velocidade de corrida durante os treinos foi utilizada a medida de consumo máximo de oxigênio indireto ( $VO_{2m\acute{a}x}$ ) (Brooks e White, 1978). Cada animal correu na esteira a uma velocidade inicial baixa seguida por incrementos de 5 m/min a cada 3 min até atingir seu ponto de exaustão (incapacidade do rato em continuar a correr – tempo de fadiga). O tempo de fadiga (em minutos) e a velocidade máxima (em m/min) foram tomados como 100% capacidade de exercício e utilizados para a mensuração de  $VO_{2m\acute{a}x}$  indireto. Todos os animais foram treinados a uma intensidade 60% do  $VO_{2m\acute{a}x}$  (Elsner *et al.*, 2011).

Os animais de 3 e de 21 meses de idade foram distribuídos em grupos exercitados (EXE) ou sedentários (SED). Ao final dos diferentes protocolos, sessão única e exercício diário, os animais do grupo SED e EXE foram decapitados 1 hora após a última sessão. Os animais SED foram transportados para a sala de experimentos e foram manipulados exatamente como os animais 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 (Cechetti *et al.*, 2007).

#### 4.2.1. Sessão Única

Os animais submetidos à sessão única de exercício, correram na esteira durante 20 minutos e foram eutanasiados 1h após a sessão (Figura 4). Os primeiros minutos foram destinados a elevação da velocidade e os minutos finais para a diminuição desta. Nos primeiros 4 minutos de exercícios a velocidade foi de 7,36 m/min para os animais adultos jovens e 5,08 m/min para os animais envelhecidos, aumentando para 11,04 m/min (adultos jovens) e 7,62 m/min (envelhecidos) nos próximos 12 minutos. A velocidade nos 4 minutos finais foi de 7,36 m/min (adultos jovens) e 5,08 m/min (envelhecidos).

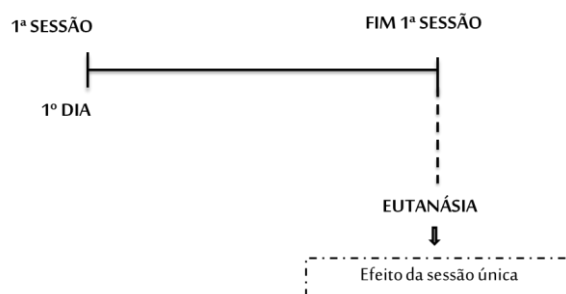


Fig. 4. Representação gráfica da linha de tempo do protocolo sessão única

#### 4.2.2. Protocolo de Exercício Diário Moderado

No treinamento diário de exercício moderado, os animais correram na esteira diariamente, durante 20 minutos, por duas semanas e foram eutanasiados 1h após a última sessão (Figura 5). Os dois primeiros dias foram

treinos de adaptação para os animais. A velocidade inicial foi de 6,85 m/min para o grupo adultos jovens e 5,17 m/min para os animais envelhecidos, dois minutos após houve um incremento na velocidade para 8,56 m/min (adultos jovens) e 6,46 m/min (envelhecidos), esta velocidade permaneceu constante pelos próximos 4 minutos, então um segundo aumento na velocidade que permaneceria por mais 8 minutos, 10,28 m/min (adultos jovens) e 7,75 m/min (envelhecidos). Os minutos finais foram utilizados para desaceleração, 8,56 m/min (adultos jovens) e 6,46 m/min (envelhecidos) nos próximos 4 minutos e os 2 minutos finais a 6,85 m/min (adultos jovens) e 5,17 m/min (envelhecidos).

Após os dois dias de adaptação a sessão se iniciou com 6,85 m/min (adultos jovens) e 5,17 m/min (envelhecidos) por 4 minutos, 12 minutos a 10,58 m/min (adultos jovens) e 7,75 m/min (envelhecidos) e finalizando com 6,85 m/min (adultos jovens) e 5,17 m/min (envelhecidos) nos últimos 4 min.

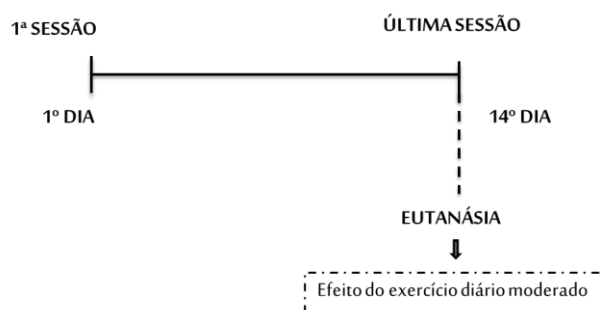


Fig. 5. Representação gráfica da linha de tempo do protocolo exercício diário moderado

### 4.3. Preparação das Amostras

Os animais foram decapitados em ambiente apropriado (baixa luminosidade, silencioso e longe de outros animais) por pesquisador com treinamento e experiência. O ambiente foi cuidadosamente higienizado antes do ingresso do animal na sala. Os animais foram submetidos à decapitação,

método aceito com restrição, conforme as “Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA”.

A decapitação foi realizada em guilhotina adaptada para roedores (Insight®) sem anestesia prévia para não alterar bioquimicamente as estruturas estudadas. Os animais foram decapitados 1 hora após a sessão única de exercício e a 1 hora após a última sessão de exercício diário moderado (Elsner *et al.*, 2011; Gomez-Pinilla *et al.*, 2011), posteriormente, o encéfalo foi removido e o córtex rapidamente dissecado, congelado em N<sub>2</sub> líquido e armazenado a -80°C até a realização dos ensaios bioquímicos.

Para realização dos ensaios, as amostras foram homogeneizadas de acordo com as especificações do fabricante dos kits utilizados. A concentração de proteína para cada amostra foi determinada pelo método de Bradford, usando albumina bovina como padrão (Bradford, 1976).

#### **4.4. Quantificação dos marcadores epigenéticos**

##### **4.4.1. Quantificação dos níveis de acetilação global da histona 4 (H4)**

Os níveis globais de acetilação da histona H4 globais foram determinados usando um kit de detecção colorimétrica (Histone H4 Global Acetylation Assay Kit, #P-4009, EpiQuik EUA), sendo que todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Os córtices foram homogeneizados com tampão de lise específico para extração nuclear seguido de extração de histona. Após as incubações com TCA, HCl e acetona e algumas centrifugações, o pellet foi utilizado para a detecção da acetilação da H4. As amostras foram incubadas com o anticorpo de captura seguido por anticorpo de detecção. Depois, as amostras foram incubadas com

solução de revelação. A solução de parada foi adicionada e a absorbância foi medida num leitor de microplacas (450 nm) (Sui e Li, 2010; Lovatel *et al.*, 2013).

#### **4.4.2. Determinação da atividade da enzima metiladora da H3K27 (KMT/H3K27)**

O efeito do exercício sobre a atividade da enzima HMT/H3K27 foi mensurado, através de um kit de detecção colorimétrica (catálogo #P-3005, Epigentek®), sendo que todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Neste ensaio as amostras foram incubadas com anticorpo com afinidade pelas HMT/H3K27 por 60 minutos e então a placa contendo a amostra ligada ao anticorpo passou por sucessivas lavagens a fim de descartar o anticorpo que não se ligou corretamente. Então foi adicionado o anticorpo de captura. Depois de mais lavagens o anticorpo de detecção foi adicionado e realizado a leitura, após adição da solução para desenvolvimento da cor, em um leitor colorimétrico a um comprimento de onda de 450nm, por 2-15 minutos (Batra e Devasagayam, 2012; Liu *et al.*, 2015).

#### **4.4.3. Quantificação do conteúdo de DNA metiltransferase 1 e 3b (DNMT1 e DNMT3b)**

A quantificação do conteúdo de DNMT1 e DNMT3B foi mensurada através de um kit de detecção colorimétrica (catálogo #P-3011 e #P-3013, Epigentek®), sendo que todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Para este ensaio foi realizado a extração nuclear. Em seguida as amostras foram incubadas (1-2 horas) na placa revestida com anticorpos com afinidade à

DNMT. Os anticorpos adsorvidos na placa ligaram-se ao substrato presente na amostra. A placa contendo a amostra ligada ao anticorpo passou por sucessivas lavagens a fim de descartar o anticorpo que não foi corretamente ligado. Após foi adicionado o anticorpo de detecção e realizada a leitura em um leitor colorimétrico a um comprimento de onda de 450nm. A quantidade de DNMT foi proporcional à intensidade do desenvolvimento da cor (Roll *et al.*, 2008; Elsner *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015).

## **5. Análise estatística**

Ao final dos experimentos, os dados coletados foram armazenados e organizados em uma planilha (Microsoft Excel). Os resultados foram analisados quanto a sua normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Dados que seguiram a distribuição normal foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguido de post hoc de Duncan, onde foram considerados os fatores idade e exercício. Para estas análises foi utilizado o programa estatístico Statistical Package for the Social Science (SPSS), versão 20.

Os resultados cuja distribuição foi não paramétrica foram analisados através do teste Kruskal-Wallis, seguido de post hoc de Dunn. Estes testes foram realizados utilizando o software Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Todos os resultados foram apresentados em porcentagem de controle onde foi adotado como 100% o grupo adulto jovem sedentário. Dados paramétricos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os dados não paramétricos foram



expressos em medianas (intervalos interquartis 25/75). Em os testes a diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

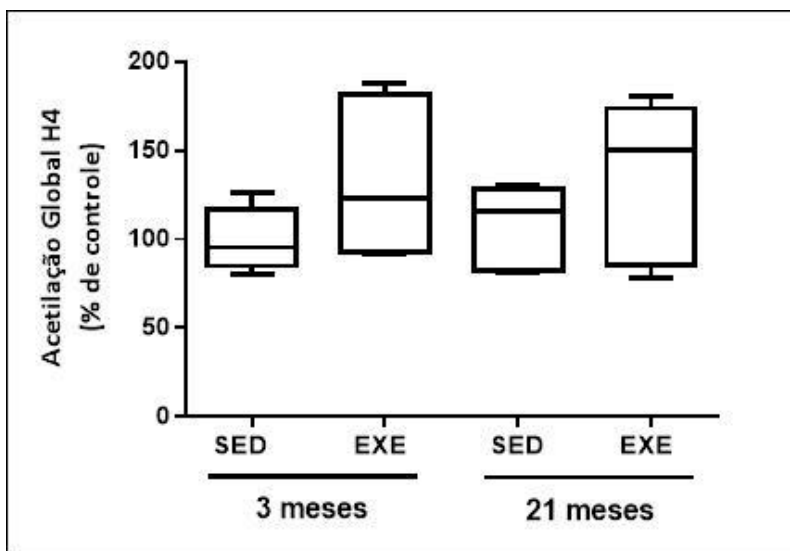
## 6. Resultados

### 6.1. Acetilação global da histona h4

Os níveis de acetilação global da histona H4 não modificaram significativamente após a sessão única de exercício (Figura 6a). O protocolo de exercício diário moderado alterou os níveis de acetilação global no córtex frontal dos animais de 21 meses de idade. Foi observado que os animais envelhecidos têm maiores níveis de acetilação de H4 comparado aos animais sedentários de 21 meses e animais exercitados de 3 meses de idade (KW= 13,51;  $p=0,0037$ ) (Fig. 6b)

Figura 6.

A.



B.

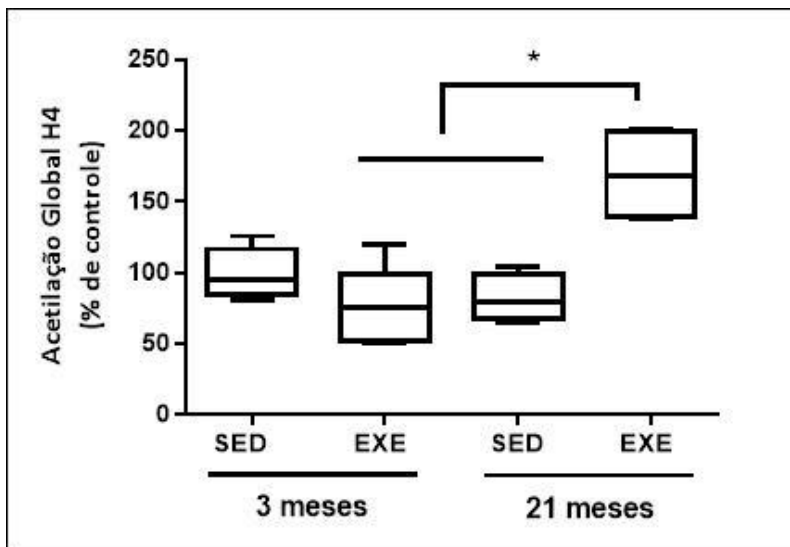


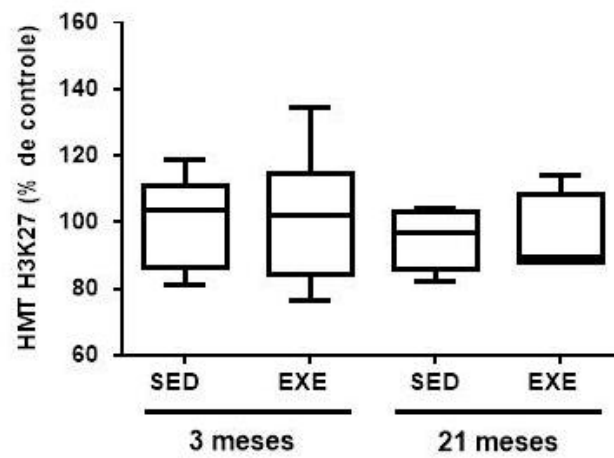
Figura 6. Efeito da sessão única de exercício (A) e do exercício diário moderado (B) sobre os níveis de acetilação global da histona H4 em córtex frontal de ratos Wistar de 3 e 21 meses. Os resultados foram determinados por Kruskal-Wallis e estão expressos em medianas (intervalos interquartis 25/75). ( $p < 0,05$ ;  $n = 4-5$  animais por grupo)

## 6.2. Atividade da enzima HMT H3K27

Não foi possível identificar diferenças significativas na atividade da enzima HMT H3K27 nos protocolos de treinamento realizados, sessão única e exercício diário moderado (Figura 7).

Figura 7.

A.



B.

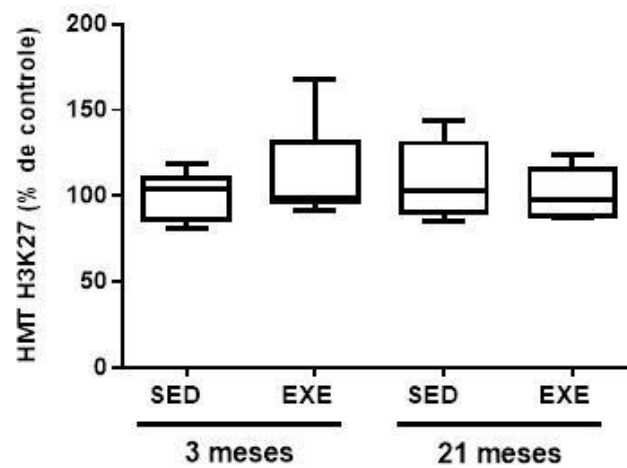


Figura 7. Efeito da sessão única de exercício (A) e do exercício diário moderado (B) sobre a atividade da enzima HMT H3K27 em córtex frontal de ratos Wistar de 3 e 21 meses. Os resultados foram determinados por Kruskal-Wallis e estão expressos em medianas (intervalos interquartis 25/75). ( $p < 0,05$ ;  $n = 4-5$  animais por grupo).

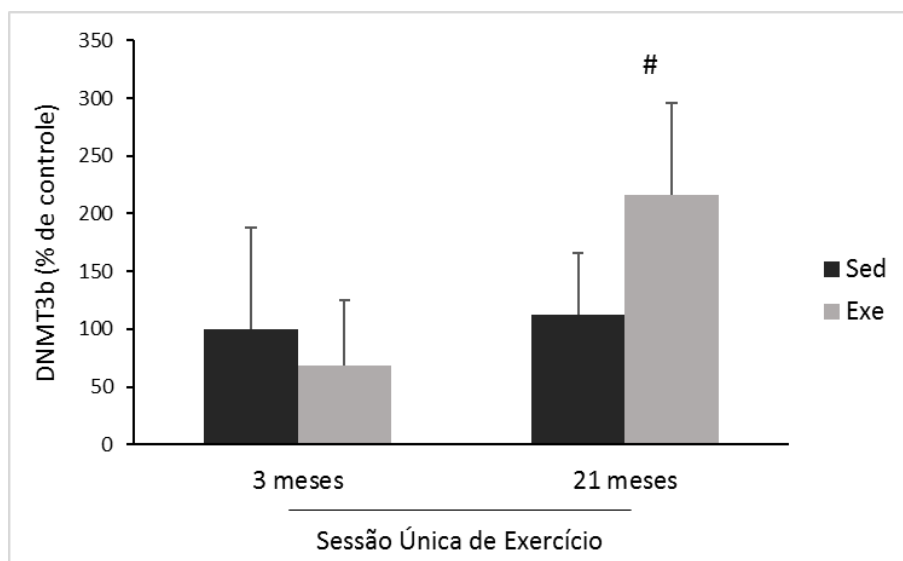
### **6.3. Conteúdo de DNMT1 e DNMT3b**

ANOVA de duas vias indicou uma interação entre os fatores idade e exercício no conteúdo da DNMT3b ( $p=0,045$ ) (Fig. 8a). Os animais de 21 meses apresentam níveis elevados desta DNMT em resposta ao exercício. Contudo, no protocolo de exercício diário moderado não foram observadas diferenças significativas em relação ao conteúdo de DNMT3b (Figura 8b).

O conteúdo de DNMT1 não foi estatisticamente significativo nem na sessão única nem no protocolo de exercício diário moderado (Figura 9).

Figura 8.

A.



B.

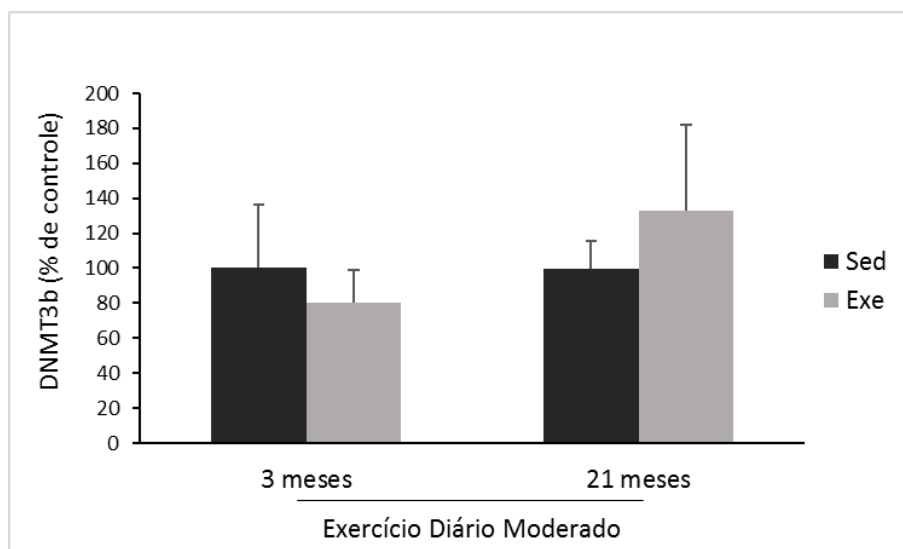
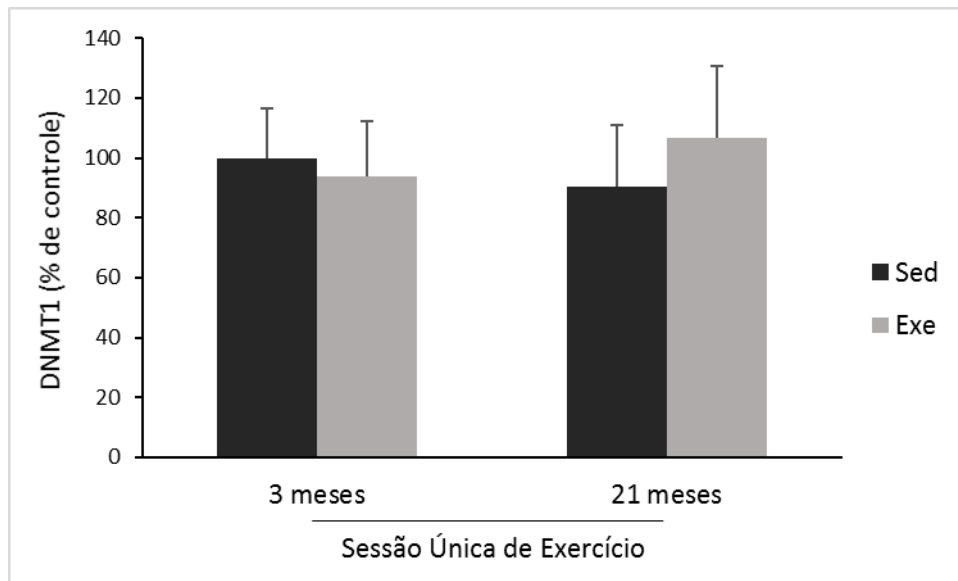


Figura 8. Efeito da sessão única de exercício (A) e do exercício diário moderado (B) sobre o conteúdo de DNMT3b em córtex frontal de ratos Wistar de 3 e 21 meses. # - Interação entre os fatores idade e exercício. Os resultados foram determinados por ANOVA de duas vias e estão expressos em porcentagem de controle como média  $\pm$  desvio padrão. ( $p < 0,05$ ;  $n = 4-5$  animais por grupo).

Figura 9.

A.



B.

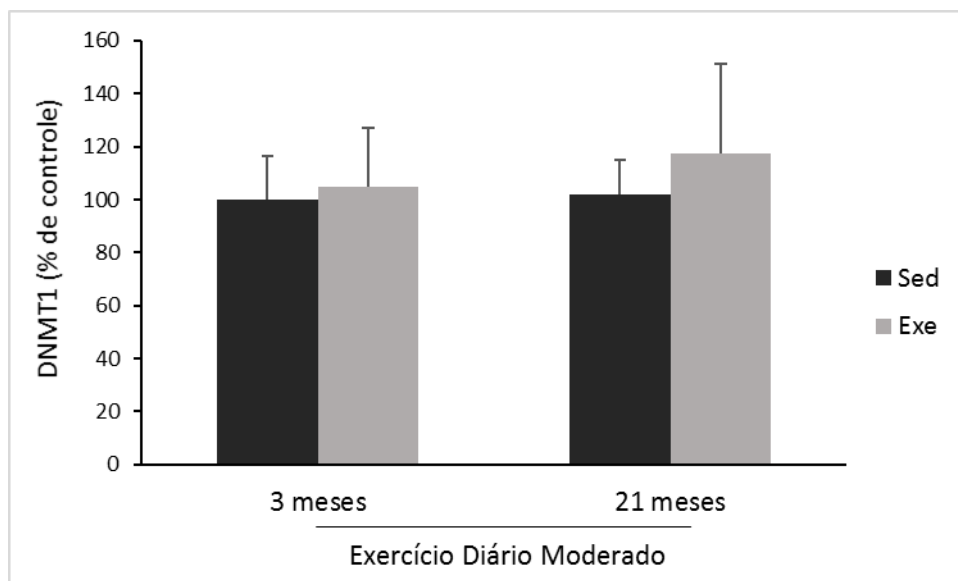


Figura 9. Efeito da sessão única de exercício (A) e do exercício diário moderado (B) sobre o conteúdo de DNMT1 em córtex frontal de ratos Wistar de 3 e 21 meses. Os resultados foram determinados por ANOVA de duas vias e estão expressos em porcentagem de controle como média  $\pm$  desvio padrão. ( $p < 0,05$ ;  $n = 4-5$  animais por grupo)

## 7. Discussão

A susceptibilidade do córtex pré-frontal a intervenções comportamentais, como o exercício e enriquecimento ambiental já foi descrita na literatura (Brockett *et al.*, 2015; Darna *et al.*, 2015). Além disso, é importante considerar que essa região cerebral está intimamente envolvida na regulação de funções motoras (Ding *et al.*, 2006) e também de processos cognitivos (Hillman *et al.*, 2008). No entanto, como abordado anteriormente, estudos que avaliem o envolvimento do córtex nas modificações epigenéticas, em resposta ao exercício, especialmente durante o envelhecimento, são escassos. A partir disso, este trabalho traz dados importantes sobre a susceptibilidade cortical ao exercício e também ao processo de envelhecimento. Os resultados apresentados neste estudo corroboram a hipótese de que o córtex de animais envelhecidos seja mais susceptível aos efeitos de um protocolo de exercício físico moderado.

O exercício em esteira ergométrica adaptada parece modular os processos de acetilação de histonas, mais especificamente da H4, uma vez que foram observados maiores níveis de acetilação H4 em animais envelhecidos após o exercício diário moderado (Figura 6b). Além disso, os protocolos de exercício empregados neste estudo parecem influenciar diferentemente os marcadores epigenéticos avaliados, uma vez que somente no protocolo sessão única foram observadas alterações no processo de metilação de DNA, envolvendo a DNMT3b (Figura 8b).

Neste estudo nós demonstramos que o exercício diário moderado induziu modificações nos níveis de acetilação global de H4 em córtex de animais de 21 meses de idade (Figura 6b). Recentemente, nosso grupo de pesquisa observou

que o mesmo protocolo de exercício diário moderado foi capaz de induzir um aumento na acetilação global de H4 em hipocampo de animais envelhecidos (Lovatell *et al.*, 2013). Este aumento na acetilação global de H4 ainda foi correlacionado positivamente com uma melhora no desempenho do teste da esQUIVA inibitória. Já está descrito na literatura que a evocação de memórias extintas depende de fatores contextuais e que esta evocação pode ser mediada através de um circuito que envolve estruturas como o córtex pré-frontal e hipocampo (Sotres-Bayon *et al.*, 2004). De acordo, também é descrito na literatura a existência de um circuito cortical que passa através do tálamo diretamente para o hipocampo, neste circuito o córtex pré-frontal pode controlar a especificidade da reaquisição da memória (Xu e Südhof, 2013). Considerando a relação entre o hipocampo, córtex pré-frontal e memória, podemos sugerir que modificações observadas no córtex pré-frontal também podem estar relacionadas com a melhora da memória aversiva em animais idosos.

Ao contrário dos animais envelhecidos, os níveis corticais de acetilação de H4 em animais de 3 meses de idade não foi influenciado pelos protocolos de exercício avaliados (Figura 6). Dados da literatura corroboram a hipótese de que o exercício em esteira é incapaz de induzir modificações significativas nos níveis de acetilação em animais adultos jovens. Em relação a histona H3, já se observou que o exercício em esteira não altera os níveis de acetilação desta histona (Patki *et al.*, 2014). Spindler e colaboradores (2013) relataram que o exercício diário moderado reduz a atividade global de HDAC cortical de ratos jovens de 3 meses. Apesar deste perfil de atividade reduzida da HDAC indicar um ambiente favorável a hiperacetilação, os dados apresentados sugerem que



o exercício influencie outros substratos como alguns componentes da maquinaria transcricional (Imhof *et al.*, 1997; Bannister *et al.*, 2000; Spindler *et al.*, 2014), uma vez que o exercício não alterou os níveis de acetilação cortical de H3 e também de H4 de animais jovens.

Ainda, não foram observadas alterações significativas na atividade da enzima HMT H3K27 (Figura 7). De modo geral, o envelhecimento é associado a um padrão de hipermetilação de H3K27, indicando atividade elevada da HMT H3K27 (Wang *et al.*, 2010). EZH2, uma histona metiltransferase, já foi associado a doenças neurodegenerativas, como a ataxia-telangiectasia. Além disso, um desequilíbrio entre os complexos metiladores podem ser determinantes para o prognóstico de desordens neurológicas (Li *et al.*, 2013; Mozzetta *et al.*, 2015). Kuzumaki e colaboradores (2010) avaliaram o perfil de metiltransferases no hipocampo, durante o envelhecimento, mas não identificaram alterações na expressão do mRNA do EZH2. Em acordo, nós sugerimos que o envelhecimento normal não esteja envolvido com alterações em histonas metiltransferases. No entanto não podemos excluir a influência do envelhecimento na metilação de outras lisinas, uma vez que, como já mencionado, a metilação de histonas é sítio-específica.

É interessante destacar, que o conteúdo cortical de DNMT3b de animais envelhecidos foi alterado em resposta ao protocolo de sessão única (Figura 8a). Uma vez que dados prévios não observaram alterações significativas no conteúdo hipocampal de DNMT3b em animais de 20 meses de idade exercitados (Elsner *et al.*, 2013), nós podemos sugerir um efeito estrutura e idade dependente na modulação deste parâmetro. Além disso, alguns trabalhos na literatura observam que o córtex envelhecido é mais susceptível a

alterações funcionais (Berchicci *et al.*, 2013; Tennat *et al.*, 2015). Berchicci e colaboradores (2013), avaliaram o efeito de um protocolo de exercício nas funções executivas mediadas pelo córtex pré-frontal durante o processo de envelhecimento e observaram que o exercício físico não afeta a atividade do córtex pré-frontal de indivíduos jovens, mas seus efeitos são evidentes em participantes com mais de 38 anos de idade. Considerando estes achados, nós podemos sugerir que o córtex pré-frontal de animais envelhecidos seja mais susceptível também a alterações epigenéticas.

Contrariamente, os fatores avaliados neste estudo não influenciaram no conteúdo cortical de DNMT1 dos animais adultos jovens ou envelhecidos (Figura 9). Assim como DNMT3b, os níveis de DNMT1 exibem um padrão diferente do observado no hipocampo, onde demonstrou-se que o envelhecimento reduz o conteúdo de DNMT1 em ratos Wistar, e ainda que em animais adultos o conteúdo de DNMT1 hipocampal foi reduzido após a sessão única de exercício (Elsner *et al.*, 2013). Recentemente, (Kashimoto *et al.*, 2016) mostrou que 60 min de natação são capazes de aumentar a metilação global do DNA no hipotálamo, sem um efeito significativo no hipocampo e no córtex. Esse mesmo grupo demonstrou que o protocolo de exercício reverteu alterações no perfil de metilação global do DNA induzida pelo estresse no hipocampo, córtex e substância cinzenta periaquedutal (PAG), modulando a expressão de DNMT1 e de genes do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Rodrigues *et al.*, 2015)

Por fim, mas ainda de grande relevância ao estudo, observamos um efeito protocolo dependente observado no perfil de acetilação da H4 (Figura 6b) e do conteúdo de DNMT3b (Figura 8a). Como abordado anteriormente, alguns

trabalhos sugerem que os efeitos do exercício são dependentes do protocolo utilizado, estes podendo variar quanto à intensidade, frequência e duração (Narath et al., 2001; Garcia et al., 2012). Achados prévios sustentam a ideia de que existem efeitos dependentes do protocolo de exercício em parâmetros epigenéticos. Por exemplo já foram descritas diferenças quanto a atividade das enzimas acetiladoras e desacetiladoras no hipocampo e córtex de ratos Wistar adultos jovens em dois protocolos de exercício (sessão única e diário moderado) (Elsner *et al.*, 2011; Spindler *et al.*, 2014).

Considerando os dados apresentados, não podemos identificar o impacto fisiológico das alterações epigenéticas em resposta ao exercício físico. No entanto, dados na literatura indicam que a transcrição genes, como por exemplo o BDNF, esteja associada ao processo de acetilação de histonas (Mendelsohn, e Larrick, 2012). A partir disso, podemos inferir que as modificações epigenéticas observadas no córtex pré-frontal possam representar alterações na transcrição gênica, assim como no hipocampo. Contudo, são necessários mais estudos para que possamos estabelecer quais são os benefícios específicos promovidos pelo exercício.

## **8. Conclusões**

Este estudo fornece dados importantes sobre as modificações epigenéticas induzidas pelo exercício no córtex pré-frontal. Embora a relevância de nossas descobertas ainda não possa ser associada a benefícios específicos promovidos pelo exercício, podemos propor que diferentes protocolos de exercícios impactem os parâmetros epigenéticos corticais diferentemente. Além disso, córtices de animais envelhecidos são mais susceptíveis a alterações induzidas pelo exercício, através da modulação da acetilação de histonas e do conteúdo de DNMTs.

Até onde temos conhecimento, nosso estudo fornece evidências inéditas sobre os efeitos do exercício em marcadores epigenéticos durante o processo de envelhecimento.

## 9. Referências Bibliográficas

- ANTUNES, H. K. et al. Exercício físico e função cognitiva: uma revisão. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 2, p. 108-114, 2006. ISSN 1517-8692.
- BANNISTER, A. J. et al. Acetylation of importin- $\alpha$  nuclear import factors by CBP/p300. **Current Biology**, v. 10, n. 8, p. 467-470, 2000. ISSN 0960-9822.
- BATRA, V.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Interaction between  $\gamma$ -radiation and dietary folate starvation metabolically reprograms global hepatic histone H3 methylation at lysine 4 and lysine 27 residues. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3, p. 464-472, 2012. ISSN 0278-6915.
- BERCHICCI, Marika; LUCCI, Giuliana; DI RUSSO, Francesco. Benefits of physical exercise on the aging brain: the role of the prefrontal cortex. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 68, n. 11, p. 1337-1341, 2013.
- BISHOP, N. A.; LU, T.; YANKNER, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 529-535, 2010. ISSN 0028-0836.
- BRACKEN, A. P. et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. **The EMBO journal**, v. 22, n. 20, p. 5323-5335, 2003. ISSN 0261-4189.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)
- BROCKETT, A. T.; LAMARCA, E. A.; GOULD, E. Physical Exercise Enhances Cognitive Flexibility as Well as Astrocytic and Synaptic Markers in the Medial Prefrontal Cortex. 2015. ISSN 1932-6203.
- BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 45, n. 6, p. 1009-15, Dec 1978. ISSN 0161-7567 (Print)
- BUGG, J. M.; HEAD, D. Exercise moderates age-related atrophy of the medial temporal lobe. **Neurobiology of aging**, v. 32, n. 3, p. 506-514, 2011. ISSN 0197-4580.
- CECHETTI, F. et al. Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. **Brain Res**, v. 1157, p. 121-5, Jul 9 2007. ISSN 0006-8993 (Print)
- CENSO, I. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/>>. **Consultado em**, v. 12, 2010.
- CHEUNG, M. E.; BROMAN, S. H. Adaptive learning: interventions for verbal and motor deficits. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 14, n. 3, p. 159-69, 2000. ISSN 1545-9683 (Print)
- CHISHOLM, N. C.; SOHRABJI, F. Astrocytic response to cerebral ischemia is influenced by sex differences and impaired by aging. **Neurobiology of disease**, v. 85, p. 245-253, 2016. ISSN 0969-9961.
- COLCOMBE, S. J. et al. Aerobic fitness reduces brain tissue loss in aging humans. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 58, n. 2, p. M176-M180, 2003. ISSN 1079-5006.

COLCOMBE, S. J. et al. Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 3316-3321, 2004. ISSN 0027-8424.

COLLINS, A. et al. Exercise Improves Cognitive Responses to Psychological Stress through Enhancement of Epigenetic Mechanisms and Gene Expression in the Dentate Gyrus. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. e4330, 2009. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004330> >.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C.; CHRISTIE, L.-A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 9, p. 464-472, 2007. ISSN 0166-2236.

DARNA, M. et al. Effect of environmental enrichment on dopamine and serotonin transporters and glutamate neurotransmission in medial prefrontal and orbitofrontal cortex. **Brain research**, v. 1599, p. 115-125, 2015. ISSN 0006-8993.

DELUCVE, G. P.; KHAN, D. H.; DAVIE, J. R. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. **Clin Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 5, 2012. ISSN 1868-7075.

DING, Y.-H. et al. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. **Current Neurovascular Research**, v. 3, n. 1, p. 15-23, 2006. ISSN 1567-2026.

DOS SANTOS SANT'ANNA, G. et al. Histone deacetylase activity is altered in brain areas from aged rats. **Neuroscience letters**, v. 556, p. 152-154, 2013. ISSN 0304-3940.

DRUMMOND, M. J. et al. Aerobic and resistance exercise sequence affects excess postexercise oxygen consumption. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 19, n. 2, p. 332-337, 2005. ISSN 1064-8011.

DUMAN, R. S. Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. **Neurobiol Aging**, v. 26 Suppl 1, p. 88-93, Dec 2005. ISSN 0197-4580 (Print)

EL HAJ, M.; ALLAIN, P. [Relationship between source monitoring in episodic memory and executive function in normal aging]. **Geriatric et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement**, v. 10, n. 2, p. 197-205, 2012. ISSN 2115-8789.

ELSNER, V. R. et al. Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 192, p. 580-7, Sep 29 2011. ISSN 0306-4522.

ELSNER, V. R. et al. Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 2, p. 136-9, Feb 2013. ISSN 0531-5565.

ERICKSON, K. I. et al. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 15, p. 5368-5375, 2010. ISSN 0270-6474.

FLATT, T. A new definition of aging? **Frontiers in genetics**, v. 3, p. 148, 2012. ISSN 1664-8021.

GARCIA, P. C. et al. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. **Brain research**, v. 1456, p. 36-48, 2012. ISSN 0006-8993.

GOMEZ-PINILLA, F. et al. Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. **Eur J Neurosci**, v. 33, n. 3, p. 383-90, Feb 2011. ISSN 0953-816x.

GRÄFF, J.; MANSUY, I. M. Epigenetic codes in cognition and behaviour. **Behavioural brain research**, v. 192, n. 1, p. 70-87, 2008. ISSN 0166-4328.

GRÄFF, J.; SANCHEZ-MUT, J. V. Epigenetic Alterations in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, 2015-December-17 2015. ISSN 1662-5153. Disponível em: <[http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=99&name=behavioral\\_neuroscience&ART\\_DOI=10.3389/fnbeh.2015.00347](http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=99&name=behavioral_neuroscience&ART_DOI=10.3389/fnbeh.2015.00347) >.

GUENTHER, M. G. et al. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 77-88, 2007. ISSN 0092-8674.

GUPTA-AGARWAL, S. et al. NMDA receptor- and ERK-dependent histone methylation changes in the lateral amygdala bidirectionally regulate fear memory formation. **Learn Mem**, v. 21, n. 7, p. 351-62, Jul 2014. ISSN 1072-0502.

GUPTA, S. et al. Histone methylation regulates memory formation. **The Journal of neuroscience**, v. 30, n. 10, p. 3589-3599, 2010. ISSN 0270-6474.

HAMBRECHT, R. et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. **Circulation**, v. 98, n. 24, p. 2709-2715, 1998. ISSN 0009-7322.

HILLMAN, C. H.; ERICKSON, K. I.; KRAMER, A. F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nature reviews neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 58-65, 2008. ISSN 1471-003X.

HORSBURGH, S. et al. Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation. **Exercise immunology review**, v. 21, 2015. ISSN 1077-5552.

IMHOF, A. et al. Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. **Current biology**, v. 7, n. 9, p. 689-692, 1997. ISSN 0960-9822.

JAROME, T. J.; LUBIN, F. D. Histone lysine methylation: critical regulator of memory and behavior. **Reviews in the Neurosciences**, v. 24, n. 4, p. 375-387, 2013. ISSN 2191-0200.

JURGENS, H. A.; JOHNSON, R. W. Dysregulated neuronal–microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. **Experimental neurology**, v. 233, n. 1, p. 40-48, 2012. ISSN 0014-4886.

KASHIMOTO, R. et al. Physical exercise affects the epigenetic programming of rat brain and modulates the adaptive response evoked by repeated restraint stress. **Behavioural brain research**, v. 296, p. 286-289, 2016. ISSN 0166-4328.

KIMURA, H. Histone modifications for human epigenome analysis. **J Hum Genet**, v. 58, n. 7, p. 439-445, 07//print 2013. ISSN 1434-5161. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jhg.2013.66> >.

- KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007. ISSN 0092-8674.
- KRAMER, A. F. et al. Ageing, fitness and neurocognitive function. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 418-419, 07/29/print 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/22682>>.
- KUZUMAKI, N. et al. Hippocampal epigenetic modification at the doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging. **Synapse**, v. 64, n. 8, p. 611-616, 2010. ISSN 1098-2396.
- LI, J. et al. EZH2-mediated H3K27 trimethylation mediates neurodegeneration in ataxia-telangiectasia. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 12, p. 1745-1753, 2013. ISSN 1097-6256.
- LIMA-COSTA, M. F.; VERAS, R. Saúde pública e envelhecimento. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 3, p. 700-701, 2003. ISSN 0102-311X.
- LISTON, C. et al. Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 30, p. 7870-7874, 2006. ISSN 0270-6474.
- LIU, J. et al. Chromatin landscape defined by repressive histone methylation during oligodendrocyte differentiation. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 1, p. 352-365, 2015. ISSN 0270-474.
- LOVATEL, G. A. et al. Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function. **Neurobiol Learn Mem**, v. 98, n. 2, p. 182-7, Sep 2012. ISSN 1074-7427.
- LOVATEL, G. A. et al. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. **Neurobiology of learning and memory**, v. 101, p. 94-102, 2013. ISSN 1074-7427.
- LOPATINA, N., HASKELL, J. F., ANDREWS, L. G., POOLE, J. C., SALDANHA, S., & TOLLEFSBOL, T. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. **Journal of cellular biochemistry**, 84(2), 324-334, 2002.
- LUGER, K.; DECHASSA, M. L.; TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 7, p. 436-447, 2012. ISSN 1471-0072.
- LUI, J. C. et al. Broad shifts in gene expression during early postnatal life are associated with shifts in histone methylation patterns. **PLoS one**, v. 9, n. 1, 2014.
- MAHNCKE, H. W.; BRONSTONE, A.; MERZENICH, M. M. Brain plasticity and functional losses in the aged: scientific bases for a novel intervention. **Prog Brain Res**, v. 157, p. 81-109, 2006. ISSN 0079-6123 (Print)
- MENDELSON, Andrew R.; LARRICK, James W. Epigenetic-mediated decline in synaptic plasticity during aging. **Rejuvenation research**, v. 15, n. 1, p. 98-101, 2012.
- MOLTENI, R.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **Eur J Neurosci**, v. 16, n. 6, p. 1107-16, Sep 2002. ISSN 0953-816X (Print)



MOZZETTA, C.; PONTIS, J.; AIT-SI-ALI, S. Functional Crosstalk Between Lysine Methyltransferases on Histone Substrates: The Case of G9A/GLP and Polycomb Repressive Complex 2. **Antioxidants & redox signaling**, v. 22, n. 16, p. 1365-1381, 2015. ISSN 1523-0864.

MUKUDA, T. et al. Systemic angiotensin II and exercise-induced neurogenesis in adult rat hippocampus. **Brain Research**, n. 0, 2014. ISSN 0006-8993. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899314012281> >.

NARATH, E.; SKALICKY, M.; VIIDIK, A. Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. **Exp Gerontol**, v. 36, n. 10, p. 1699-711, Nov 2001. ISSN 0531-5565 (Print)

NAVARRO, A. Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. **Molecular aspects of medicine**, v. 25, n. 1, p. 37-48, 2004. ISSN 0098-2997.

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

PARADIES, G. et al. Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin. **Neurochemistry international**, v. 58, n. 4, p. 447-457, 2011. ISSN 0197-0186.

PATKI, G. et al. Novel mechanistic insights into treadmill exercise based rescue of social defeat-induced anxiety-like behavior and memory impairment in rats. **Physiology & behavior**, v. 130, p. 135-144, 2014. ISSN 0031-9384.

RADAK, Z. et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochem Int**, v. 49, n. 4, p. 387-92, Sep 2006. ISSN 0197-0186 (Print)

REIK, W.; KELSEY, G.; WALTER, J. Dissecting de novo methylation. **Nature genetics**, v. 23, n. 4, p. 380-382, 1999.

RODRIGUES, G. M. et al. Acute stress affects the global DNA methylation profile in rat brain: modulation by physical exercise. **Behavioural brain research**, v. 279, p. 123-128, 2015. ISSN 0166-4328.

ROLL, J. D. et al. DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines. **Molecular cancer**, v. 7, n. 1, p. 15, 2008. ISSN 1476-4598.

ROUNTREE, M. R. et al. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene**, v. 20, n. 24, p. 3156-3165, 2001. ISSN 0950-9232.

RUSSELL, J. et al. Induction of voluntary prolonged running by rats. **Journal of applied physiology**, v. 63, n. 6, p. 2549-2553, 1987. ISSN 8750-7587.

SAHA, R.; PAHAN, K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, n. 4, p. 539-550, 2006. ISSN 1350-9047.

SCHMOLESKY, M. T.; WEBB, D. L.; HANSEN, R. A. The effects of aerobic exercise intensity and duration on levels of brain-derived neurotrophic factor in healthy men. **J Sports Sci Med**, v. 12, n. 3, p. 502-11, 2013. ISSN 1303-2968.

SCOPEL, D. et al. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. **Brain Res Bull**, v. 71, n. 1-3, p. 155-9, Dec 11 2006. ISSN 0361-9230 (Print)

SELCHER, J. C. et al. Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. **Learn Mem**, v. 8, n. 1, p. 11-9, Jan-Feb 2001. ISSN 1072-0502 (Print)

SILVA, M. D. G. D.; BOEMER, M. R. The experience of aging: a phenomenological perspective. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 17, n. 3, p. 380-386, 2009. ISSN 0104-1169.

SILVER, H. et al. 'Executive' functions and normal aging: selective impairment in conditional exclusion compared to abstraction and inhibition. **Dementia and geriatric cognitive disorders**, v. 31, n. 1, p. 53-62, 2011. ISSN 1421-9824.

SOTRES-BAYON, F.; BUSH, D. E.; LEDOUX, J. E. Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. **Learning & Memory**, v. 11, n. 5, p. 525-535, 2004. ISSN 1072-0502.

SOUZA, M. R. D. et al. Efeitos do treinamento combinado resistido\_aeróbico no ventrículo esquerdo de rato Wistar. **Rev. bras. ciênc. mov**, v. 22, n. 2, p. 72-77, 2014. ISSN 0103-1716.

SOUZA, R. F. D.; SKUBS, T.; BRÊTAS, A. C. P. Envelhecimento e família: uma nova perspectiva para o cuidado de enfermagem. **Rev. bras. enferm**, v. 60, n. 3, p. 263-267, 2007. ISSN 0034-7167.

SPINDLER, C. et al. Treadmill exercise alters histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in frontal cortices from Wistar rats. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 34, n. 8, p. 1097-1101, 2014. ISSN 0272-4340.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41-45, 2000. ISSN 0028-0836.

SUI, L.; LI, B.-M. Effects of perinatal hypothyroidism on regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat hippocampus: role of DNA methylation and histone acetylation. **Steroids**, v. 75, n. 12, p. 988-997, 2010. ISSN 0039-128X.

TAO, L. et al. Exercise for the heart: signaling pathways. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p. 20773, 2015.

THOMPSON, P. D. et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). **Circulation**, v. 107, n. 24, p. 3109-3116, 2003. ISSN 0009-7322.

TURNER, B. M. Histone acetylation and an epigenetic code. **Bioessays**, v. 22, n. 9, p. 836-845, 2000. ISSN 0265-9247.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 3, p. 266-70, Mar 1999. ISSN 1097-6256 (Print)

VISSING, J.; ANDERSEN, M.; DIEMER, N. H. Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 16, n. 4, p. 729-36, Jul 1996. ISSN 0271-678X (Print)

WAGGONER, D. Mechanisms of disease: epigenesis. *Seminars in pediatric neurology*, 2007, Elsevier. p.7-14.

WALKER, M. P. et al. Reversible epigenetic histone modifications and Bdnf expression in neurons with aging and from a mouse model of Alzheimer's disease. **Age**, v. 35, n. 3, p. 519-531, 2013. ISSN 0161-9152.

WANG, Q. et al. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. **Science**, v. 327, 2010.

WEI, Y. et al. CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Nature cell biology**, v. 13, n. 1, p. 87-94, 2011. ISSN 1465-7392.

WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do esporte e do exercício**. Manole, 2001. ISBN 9788520410554. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=ch6-AAAACAAJ>>.

XU, W.; SÜDHOF, T. C. A neural circuit for memory specificity and generalization. **Science**, v. 339, n. 6125, p. 1290-1295, 2013. ISSN 0036-8075.

YANG, G. et al. DNA methyltransferase 3, a target of microRNA-29c, contributes to neuronal proliferation by regulating the expression of brain-derived neurotrophic factor. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 1, p. 1435-1442, 2015. ISSN 1791-2997.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 1, p. 37-50, 2006. ISSN 1474-1776.

ZAKHARI, Samir. Alcohol metabolism and epigenetics changes. **Alcohol Res**, v. 35, n. 1, p. 6-16, 2013.

ZHANG, F. F. et al. Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. **Epigenetics**, v. 6, n. 3, p. 293-299, 2011. ISSN 1559-2294.