



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS FLORIANÓPOLIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOQUÍMICA

LEONARDO SOARES DE ALBUQUERQUE BARROS

**ALTERAÇÕES DE PARÂMETROS BIOENERGÉTICOS  
HIPOCAMPAIS INDUZIDOS POR HIPERGLICEMIA CRÔNICA E  
DERIVADOS DA GLICOSE EM CÉLULAS NEURAIS**

FLORIANÓPOLIS

2019

Leonardo Soares de Albuquerque Barros

**ALTERAÇÕES DE PARÂMETROS BIOENERGÉTICOS HIPOCAMPAIS  
INDUZIDOS POR HIPERGLICEMIA CRÔNICA E DERIVADOS DA GLICOSE EM  
CÉLULAS NEURAIS**

Dissertação submetido(a) ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Susana Latini

Coorientadora: Profa. Dra. Joana Margarina Gaspar

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barros, Leonardo Soares de Albuquerque  
Alterações de parâmetros bioenergéticos hipocampais  
induzidos por hiperglicemia crônica e derivados da glicose  
em células neurais / Leonardo Soares de Albuquerque  
Barros ; orientadora, Alexandra Susana Latini,  
coorientadora, Joana Margarida Gaspar, 2019.  
85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Bioquímica . 3. Hiperglicemia . 4.  
Obesidade . 5. Cognição . I. Latini, Alexandra Susana . II.  
Gaspar, Joana Margarida. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV.  
Título.

Leonardo Soares de Albuquerque Barros

**Alterações de parâmetros bioenergéticos hipocâmpais induzidos por hiperglicemia crônica e derivados da glicose em células neurais**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alex Rafacho

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Carla Inês Tasca

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Bioquímica.

---

Profa. Dra. Ariane Zamoner

Coordenadora do Programa

---

Profa. Dra. Alexandra Susana Latini

Orientadora

Florianópolis, 15 de setembro de 2019.

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe e aos meus queridos pais.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, por toda saúde e força que tem me dado;

Aos meus pais, Fábio e Maria, pela confiança, pelo amor e por sempre me incentivarem a realizar meus sonhos e objetivos;

À minha orientadora Alexandra Latini, por todas as contribuições no solucionar de dúvidas ao longo desses meses e por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação à ciência;

À minha coorientadora Joana Gaspar, por todo conhecimento transmitido durante essa fase;

À minha namorada, minha base, que me apoiou em todas as escolhas da minha vida;

Aos meus colegas de laboratório, Alexandre, Tuany, Débora, Jennyfer, Ana e Bruna;

Aos técnicos do LAMEB, pelo auxílio indispensável;

À CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Tanto o diabetes *mellitus* (DM) quanto a obesidade são distúrbios metabólicos crônicos, caracterizados por um estado de hiperglicemia persistente e/ou excesso de tecido adiposo, respectivamente. A Organização Mundial de Saúde aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, com uma projeção de 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso e mais de 700 milhões obesos em 2025. Estima-se que no Brasil mais de 50% da população está acima do peso, sendo as crianças representadas por 15%. Inúmeros estudos no mundo têm identificado uma correlação positiva entre obesidade e DM com uma maior predisposição ao desenvolvimento de alterações cognitivas, demência e doenças neurodegenerativas. Nosso grupo demonstrou recentemente que leucócitos de crianças obesas e o hipocampo de animais hiperglicêmicos apresentam marcadores bioquímicos que sugerem compromisso das vias de sinalização envolvidas na aquisição e consolidação de processos cognitivos. Estes biomarcadores estão relacionados com um perfil epigenético não permissivo para a expressão de genes antioxidantes, anti-inflamatórios e envolvidos na função mitocondrial produtora de energia. Neste trabalho, caracterizamos melhor o metabolismo energético hipocampal mediante o estudo de vias de sinalização mediadas pela proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) a qual atua como o sensor mestre do metabolismo, regulando a homeostase energética, bem como a energia neuronal essencial para os processos de formação de memória. Para isso, utilizamos um modelo de hiperglicemia crônica (60 dias) em ratos Wistar induzida por uma única dose de estreptozotocina (STZ, 55 mg/kg, intraperitonealmente). O tratamento mostrou uma menor relação AMPK-p/AMPK sem quaisquer modificações no conteúdo ou atividade das diferentes isoformas da creatina cinase (CK) e da cinase hepática B1 (LKB1) no hipocampo dos animais tratados com STZ. Adicionalmente, para entender a consequência de um meio extracelular com altas concentrações de glicose sobre células nervosas, expomos neurônios hipocampais da linhagem H19-7 e astrócitos da linhagem C6 a dois derivados metabólicos da glicose, o metilglioxal (MG) e as proteínas oxidadas por MG, os produtos finais de glicação avançada (AGEs). A seguir, a respiração mitocondrial e o conteúdo de vacúolos autofágicos foram quantificados, respectivamente. Observamos que a síntese neuronal de ATP foi comprometida e a síntese de espécies reativas do oxigênio foi estimulada pelo tratamento, o que provocaria disfunção mitocondrial e estimularia o processo de autofagia. No entanto, a mitofagia basal não foi estimulada nas células astrocíticas C6. Esses resultados sugerem que a desregulação metabólica presente na obesidade e/ou DM pode comprometer a atividade do principal sensor energético, a AMPK, prejudicando a homeostase celular hipocampal e provocando prejuízos na fisiologia mitocondrial que resultariam em deficiência cognitiva e predisposição à neurodegeneração.

**Palavras-chave:** Hiperglicemia, obesidade, cognição.

## ABSTRACT

Both diabetes mellitus (DM) and obesity are chronic metabolic disorders, characterized by a state of persistent hyperglycemia and/or excess adipose tissue, respectively. The World Health Organization points to obesity as one of the biggest public health problems in the world, with a projection of 2.3 billion overweight adults and over 700 million obese in 2025. It is estimated that in Brazil over 50% population is overweight, with children accounting for 15%. Numerous studies worldwide have identified a positive correlation between obesity and DM with a greater predisposition to the development of cognitive impairment, dementia and neurodegenerative diseases. Our group recently demonstrated that leukocytes in obese children and hippocampus in hyperglycemic animals have biochemical markers that suggest compromised signalling pathways involved in the acquisition and consolidation of cognitive processes. These biomarkers are related to a non-permissive epigenetic profile for the expression of antioxidant, anti-inflammatory genes involved in the mitochondrial energy-producing function. In this work, we better characterize hippocampal energy metabolism by studying signalling pathways mediated by adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) which acts as the master metabolism sensor, regulating energy homeostasis as well as essential neuronal energy for memory formation processes. For this, we used a 60-day chronic hyperglycemia model in Wistar rats induced by a single dose of streptozotocin (STZ, 55 mg/kg intraperitoneally). Treatment showed a lower AMPK-p / AMPK ratio without any changes in the content or activity of different creatine kinase (CK) and hepatic kinase B1 (LKB1) isoforms in the hippocampus of STZ-treated animals. Additionally, to understand the consequence of an extracellular medium with high glucose concentrations on nerve cells, we expose H19-7 strain hippocampal neurons and C6 strain astrocytes to two glucose metabolic derivatives, methylglyoxal (MG) and MG-oxidized proteins, the advanced glycation end products (AGEs). Next, mitochondrial respiration and the content of autophagic vacuoles were quantified, respectively. We observed that ATP neuronal synthesis was compromised and the synthesis of reactive oxygen species was stimulated by treatment, which would cause mitochondrial dysfunction and stimulate the autophagy process. However, basal mitophagy was not stimulated in C6 astrocytic cells. These results suggest that the metabolic dysregulation present in obesity and / or DM may compromise the activity of the main energy sensor, AMPK, impairing hippocampal cell homeostasis and causing impairments in mitochondrial physiology that would result in cognitive impairment and predisposition to neurodegeneration.

**Keywords:** Hyperglycemia, obesity, cognition.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Figura ilustrativa do tecido adiposo branco, adipócito bege, macrófagos e células T e a secreção dos seus respectivos mediadores moleculares.....	18
Figura 2 - Estrutura e ativação da AMPK. ....	23
Figura 3 - Sistema celular da creatina cinase. ....	25
Figura 4 - Interação da proteína AMPK com a CK-BB. ....	25
Figura 5 - Imagem ilustrativa da morfologia da linhagem de células C6.....	32
Figura 6 - Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal), sobre o conteúdo de AMPK-p (A), AMPK (B) e da relação AMPK-p/AMPK (C) no hipocampo de ratos Wistar adultos.....	39
Figura 7 - Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal), sobre o conteúdo de LKB1-p (A), LKB1 (B) e da relação LKB1-p/LKB1 (C) no hipocampo de ratos Wistar adultos.. ....	40
Figura 8 - Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal), sobre o conteúdo da CK-MM (A) e CK-BB (B) e atividade da CK (C) no hipocampo de ratos Wistar adultos.....	41
Figura 9 - Efeito de altas concentrações de glicose (25 mM; 48 h) sobre (A) acúmulo de metilglioxal (MG) e de (B) proteínas oxidadas por MG (AGEs) e sobre (C) a massa mitocondrial em células astrogliais de rato da linhagem C6. ....	42
Figura 10 - Efeito de produtos terminais de glicação (AGEs; 0,1 e 1 mg/mL; 48h) sobre a formação de vacúolos autofágicos em células C6 de astroglioma de rato. ....	42
Figura 11 - Efeito <i>in vitro</i> de produtos terminais de glicação (MG-BSA; 0,1 e 1 mg/mL; 48h) sobre o conteúdo da proteína LC3B em células C6 de astroglioma de rato.....	43
Figura 12 - Efeito <i>in vitro</i> do metilglioxal (300 µM) sobre o consumo de oxigênio mitocondrial na linhagem celular de células precursoras de hipocampo H19-7. ....	44

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Desenho experimental. ....	30
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-MTHF: 5-metilenotetrahidrofolato
- 5,10-MTHF: 5,10-metilenotetrahidrofolato
- AGEs: produtos finais de glicação avançada
- AMPK: Proteína cinase ativada por AMP
- BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BH2: 7,8-diidrobiopterina
- BH4: tetrahidrobiopterina
- BMI: *body mass index* (índice de massa corporal)
- BSA: albumina sérica bovina
- CK-BB: creatina cinase do tipo cerebral
- CK-MM: creatina cinase do tipo muscular
- CK-Mt: creatina cinase mitocondrial
- CK: creatina cinase
- CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico
- CREB3L3: *cAMP responsive element binding protein 3-like 3*
- DA: doença de Alzheimer
- DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DHFR: Dihidrofolato redutase
- DHPR: diidropteridina redutase
- DM: Diabetes Mellitus
- DM1: Diabetes Mellitus do tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus do tipo 2
- DNMT: DNA metiltransferase
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERO: espécies reativas de oxigênio
- FCCP: carbonil cianeto-4-fenil-hidrazona
- GFAP: proteína ácida fibrilar glial
- HAT: histona acetiltransferase
- HDAC: histona desacetilase
- HDAC1: histona desacetilase
- HDAC2: histona desacetilase 2

HDAC3: histona desacetilase 3  
HMT: histona metiltransferase  
LKB1-p: cinase hepática 1 B1 fosforilada  
LKB1: cinase hepática 1 B1  
MG: metilglioxal  
miRNA: micro RNA  
MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase  
NF-κB: Fator nuclear kappa B  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PAH: Fenilalanina Hidroxilase  
PBS: *tampão fosfato-salino*  
PCr: fosfocreatina  
PD: Doença de Parkinson  
PGC-1α: coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma α  
Phe: fenilalanina  
RE1: elemento repressor 1  
REST: Fator de silenciamento do elemento repressor 1  
rRNA: *RNA ribossomal* (RNA ribossômico)  
SAM: S-adenosil-L-metionina  
SDS-Page: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio  
SFB: soro fetal bovino  
SIRT: sirtuína  
STZ: estreptozotocina  
TH: tirosina hidroxilase  
THF: tetraidrofolato  
TPH: triptofano hidroxilase  
TrkB: *tropomyosin receptor kinase B* (receptor de tropomiosina cinase B)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>ESTADO DA ARTE</b> .....	<b>17</b>
2.1	OBESIDADE .....	17
2.2	DIABETES <i>MELLITUS</i> .....	19
2.3	MAIOR PREDISPOSIÇÃO AO DECLÍNIO COGNITIVO NA OBESIDADE E DIABETES.....	20
2.4	MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA.....	22
2.5	PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA .....	26
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
5.1	OBJETIVO GERAL.....	28
5.2	OBJETIVOS.....	28
<b>6</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS REFERENTES AO MODELO DE HIPERGLICEMIA</b> .....	<b>29</b>
6.1	ANIMAIS .....	29
6.2	MODELO EXPERIMENTAL DE DM: INDUÇÃO DE HIPERGLICEMIA CRÔNICA ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL (i.p.) DE ESTREPTOZOTOCINA.....	29
6.3	ANÁLISE DE PROTEÍNAS PARA <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	30
6.4	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	31
6.5	MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DE CREATINACINASE .....	31
6.6	MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE ASTROGLIOMA C6.....	32
6.7	MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE CÉLULAS PRECURSORAS DE HIPOCAMPO (H19-7) DE RATO .....	33
6.8	DETECÇÃO DE MG INTRACELULAR LIVRE .....	33
6.9	DETECÇÃO DE AGES NOS LISADOS DE CÉLULAS C6.....	33

6.10	MASSA MITOCONDRIAL .....	34
6.11	FORMAÇÃO DE AGES A PARTIR DE MG (MG-BSA) .....	35
6.12	EFEITOS DOS AGES EM CÉLULAS C6 .....	35
6.13	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	35
6.14	IDENTIFICAÇÃO DE AUTOFAGIA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	36
6.15	MENSURAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO PELA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL .....	36
6.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>7</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
7.1	EFEITO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE STZ SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO HIPOCAMPAL.....	38
7.1.1	<b>Conteúdo proteico (total e fosforilado) da proteína cinase dependente de AMP (AMPK) no hipocampo .....</b>	<b>38</b>
7.1.2	<b>Conteúdo proteico (total e fosforilado) da proteína cinase hepática B1 (LKB1) no hipocampo .....</b>	<b>39</b>
7.1.3	<b>Conteúdo proteico da creatinacina (CK) frações MM e BB e atividade da CK total no hipocampo .....</b>	<b>40</b>
7.2	EFEITO DO EXCESSO DE GLICOSE E DOS DERIVADOS DA GLICOSE SOBRE A INDUÇÃO DE MITOFAGIA EM CÉLULAS ASTROGLIAIS DE RATO DA LINHAGEM C6 .....	41
7.3	EFEITO DO MG SOBRE A RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS DA LINHAGEM H19-7 DE RATOS .....	43
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>51</b>
<b>11</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>12</b>	<b>SEÇÃO 2: MANUSCRITO PUBLICADO EM PERIÓDICO .....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) é uma síndrome metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia. O primeiro relatório global sobre Diabetes estimou o número de adultos afetados com DM2 em 422 milhões em 2014, com uma prevalência de 8,5% (WHO, 2016). Ainda, pelo menos 50% dos afetados não recebem tratamento por desconhecer que padecem de DM2 e, a cada ano, o DM e a hiperglicemia causam 3,75 milhões de mortes. No Brasil, 8,7% dos adultos na faixa etária de 20 a 75 anos tem diagnóstico de DM, o que confere 12,5 milhões de brasileiros. Assim, o DM2 representa um dos principais problemas de saúde de ordem mundial, com impactos negativos na sobrevivência, incapacidade para o trabalho e alto custo socioeconômico. A prevalência do DM no Brasil também determina que o DM atinja proporções epidêmicas. Isso provoca um custo anual de aproximadamente R\$7 bilhões no Brasil (SBD, 2016). O principal fator de risco para o desenvolvimento de DM é a obesidade, pandemia com prevalência de 30% no mundo e que atinge crianças, adolescentes e adultos. Dados mostram que 65% da população mundial vive em países onde a obesidade provoca mais mortes que a desnutrição (WHO, 2018).

Concomitante à pandemia do DM2 e do contexto obesogênico, o aumento da expectativa de vida, associado a uma maior urbanização com estilo de vida sedentário, e aumento progressivo da prevalência de obesidade, tem como principal consequência um aumento na frequência de déficit cognitivo, demência e de doenças neurodegenerativas no adulto (HUNTER, 2011; WHO, 2002). Neste contexto, sabe-se que pacientes com DM apresentam maior incidência de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA) (DOBROVOLSKIENE et al., 2013; PALACIOS et al., 2011; PRESSLEY et al., 2003; XU et al., 2009). Por outro lado, aproximadamente 50% dos pacientes com DP apresentam DM ou tolerância diminuída à glicose, condição exacerbada pelo tratamento farmacológico padrão com Levodopa (LIPMAN; BOYKIN; FLORA, 1974, 2016). Ainda, pacientes afetados pelas duas condições, DP e DM, apresentam progressão acelerada dos sintomas motores e cognitivos, sendo o déficit cognitivo um comum denominador presente no DM, DA e DP (COSTA et al., 2015; GRAY et al., 2006; RYAN; FINE; ROSANO, 2014; SEVUSH et al., 2003).

Os mecanismos moleculares associando as alterações metabólicas periféricas crônicas presentes no DM2 com uma maior predisposição para déficit cognitivo e neurotoxicidade não foram totalmente elucidados. No entanto, evidências sugerem que a hiperglicemia seria o gatilho para induzir modificações epigenéticas que prejudicariam a expressão de genes essenciais para a sobrevivência neuronal, favorecendo a neurotoxicidade (BROWNLEE, 2005). Foi sugerido que a obesidade e o DM estão relacionados com alterações no perfil epigenético (DHILIWAYO et al., 2014; KUEHNEN et al., 2012; LAZZARINO et al., 2017; PLAGEMANN et al., 2009), ativação de processos inflamatórios (WEISBERG et al., 2003), disfunção mitocondrial (HEINONEN et al., 2015), apoptose (TINAHONES et al., 2013) em humanos, todos processos que contribuiriam para o déficit cognitivo ou neurotoxicidade. Neste contexto, o exercício físico é uma intervenção não farmacológica que pode prevenir ou atenuar o comprometimento cognitivo, além de prevenir o desenvolvimento de obesidade e aumentar a sensibilidade à insulina. Uma revisão recente do nosso grupo de pesquisa associou os principais mecanismos neuroprotetores induzidos pela prática regular do exercício físico com potenciais biomarcadores que envolvem alterações na expressão de genes neuroprotetores e induzem a resistência ao processo de envelhecimento e neurotoxicidade em humanos e roedores (BARROS et al., 2019).

Por outro lado, alterações no metabolismo produtor de energia (metabolismo intermediário) no sistema nervoso central (SNC), podem comprometer a correta fosforilação de proteínas e atenuar, portanto, a sinalização molecular envolvida no aprendizado e memória. A proteína cinase dependente de AMP (AMPK) é uma enzima chave na regulação do metabolismo energético, com o intuito de manter a homeostase energética em situações de baixa energia (KOU; CHEN; CHEN, 2019). A AMPK é abundante em neurônios e glia e desempenha uma atividade essencial nos processos de formação de memória (MARINANGELI et al., 2018), encontrando-se diminuída em estudos experimentais de neurodegeneração (JU et al., 2011; MARINANGELI et al., 2018; VINGTDEUX et al., 2011). Ainda, a AMPK pode interagir com vários fatores de transcrição, proteínas e apresenta diferentes substratos para fosforilação, incluindo a creatina cinase (CK) isoforma cerebral (CK-BB), o que direciona a proteína para regiões celulares que necessitam de energia (RAMÍREZ RÍOS et al., 2014).

Considerando que a maioria dos indivíduos obesos e com DM apresentam grande probabilidade de desenvolver algum tipo de declínio cognitivo, neste trabalho procuramos



identificar possíveis potenciais mecanismos envolvidos na desregulação metabólica no hipocampo.

## **2 ESTADO DA ARTE**

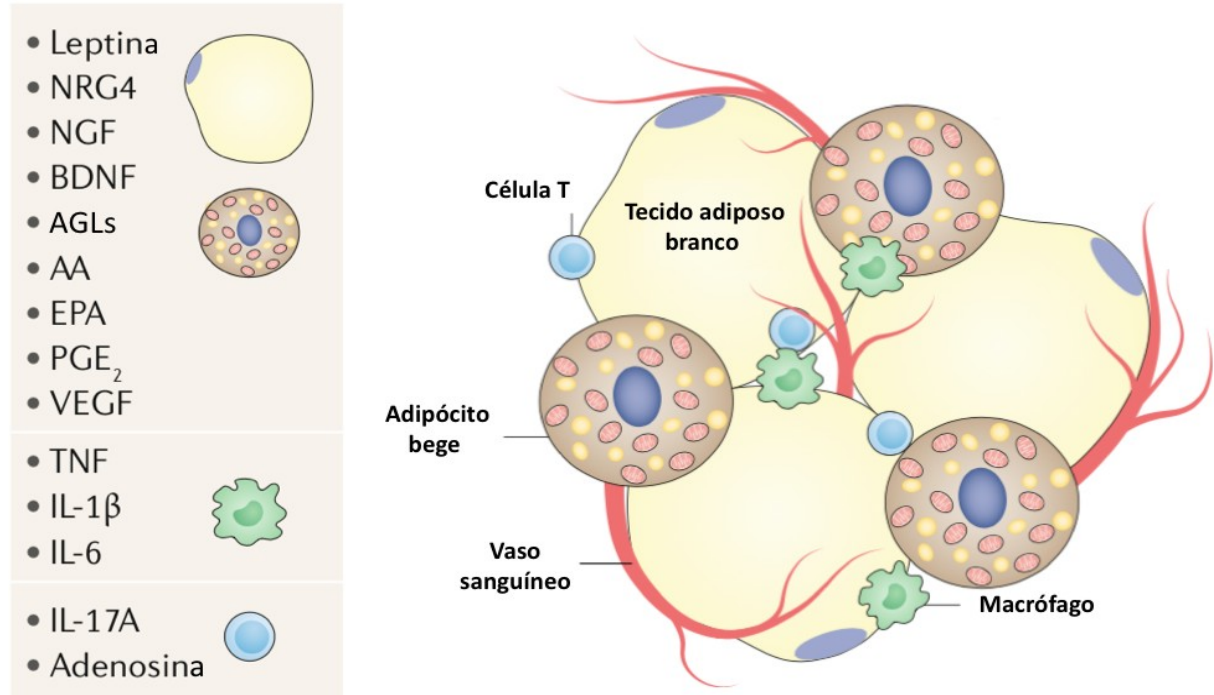
### **2.1 OBESIDADE**

A prevalência da obesidade devido a inatividade física e ao balanço energético positivo tem aumentado drasticamente nas últimas décadas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), a obesidade é definida como um excesso de massa adiposa, no qual esse excesso pode provocar desfechos deletérios à saúde e é diagnosticado com um índice de massa corporal (IMC)  $\geq 30\text{kg/m}^2$  (WHO, 2018). Dados epidemiológicos apontam atualmente que existam cerca de 1.9 bilhão de adultos com sobrepeso, 600 milhões de adultos obesos e mais de 340 milhões de crianças e adolescentes obesos ou com sobrepeso no mundo (WHO, 2018). A prevalência de obesidade infantil aumentou três vezes nas últimas décadas. Ainda, 53,8% da população brasileira está com sobrepeso (VIGITEL, 2016). A elevada prevalência de indivíduos com sobrepeso e obesos em países desenvolvidos e subdesenvolvidos tem sido descrita como uma pandemia global (SWINBURN et al., 2011).

A fisiopatologia da obesidade envolve fatores genéticos, ambientais e principalmente fatores comportamentais, indivíduos geneticamente suscetíveis à obesidade respondem com ganho de massa corporal a comportamentos de consumo excessivo de alimentos com elevado teor calórico associados a comportamentos sedentários (CASAS-AGUSTENCH et al., 2014; OLSEN et al., 2016; QI et al., 2012; QI et al., 2013). Durante os últimos anos foi demonstrada a função do tecido adiposo como órgão endócrino que pode controlar funções sistêmicas (HALAAS et al., 1997; LEHR et al., 2012; SCHERER et al., 1995; ZHANG et al., 1994) e também secretar fatores parácrinos e autócrinos que modificam sua estrutura (GNAD et al., 2014; SHIN et al., 2018). Ainda, o tecido adiposo branco é localizado sob a pele e ao redor de órgãos internos e possui baixa vascularização. Enquanto que o tecido adiposo marrom é vastamente vascularizado, intervado e rico em mitocôndrias, podendo gerar calor diretamente dos lipídeos armazenados (TOWNSEND; TSENG, 2012). Por atuar como um órgão endócrino o tecido adiposo secreta vários mediadores neuroativos e peptídeos neurotróficos, como leptina, neuregulina-4, fator de crescimento do nervo, fator neurotrófico derivado do

cérebro (BDNF), ácidos graxos livres, incluindo ácido araquidônico e ácido eicosapentaenoico, prostaglandina E2 e fator de crescimento endotelial vascular demonstrado por Guilherme et al., (2019) em uma recente revisão na conceituada revista *NATURE*. (Figura 1).

Figura 1 - Figura ilustrativa do tecido adiposo branco, adipócito bege, macrófagos e células T e a secreção dos seus respectivos mediadores moleculares.



NRG4: neuregulina-4; NGF: fator de crescimento do nervo; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; AGLs: ácidos graxos livres; AA: ácido araquidônico; EPA: eicosapentaenoico; PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E2; TNF: fator de necrose tumoral; IL-1β: interleucina 1β; IL-6: interleucina 6; IL-17A: interleucina 17A. Fonte: Adaptado de GUILHERME et al., (2019).

Além disso, o armazenamento de lipídeos no tecido adiposo branco, onde esses lipídeos derivam da hidrólise e reesterificação de triglicerídeos em lipoproteínas circulantes (CHAIT; IVERIUS; BRUNZELL, 1982; FRANCKHAUSER et al., 2002) serve não somente como um depósito de calorías para uso futuro, mas como um meio de sequestrar lipídeos longe de tecidos e órgãos que são vulneráveis a lipotoxicidade dessas moléculas (PETER et al., 2009). Assim, em um contexto obesogênico, os ácidos graxos derivados da ingestão dietética e da lipólise no tecido adiposo branco podem aumentar a gliconeogênese hepática através da regulação alostérica da piruvato carboxilase pela produção de acetil-CoA (PERRY et al., 2015; TITCHENELL et al., 2016), e atenuar a utilização de glicose no músculo esquelético pela inibição do transporte e metabolismo da glicose (CLERK; RATTIGAN;

CLARK, 2002; DRESNER et al., 1999). Essas ações associadas com uma menor síntese e secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, promovem a intolerância à glicose e podem levar ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

## 2.2 DIABETES MELLITUS

O DM é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla caracterizado por um estado de hiperglicemia crônica decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade da insulina em exercer seus efeitos (HAN et al., 2007; MAŁECKI; SKUPIEŃ, 2008). Segundo o comitê executivo para diagnóstico e classificação do DM da “American Diabetes Associations” (ADA, 2019), o diabetes pode ser diagnosticado com base nos critérios de glicemia de jejum acima  $\geq 126$  mg/dL, teste oral de tolerância à glicose (TOTG) acima de  $\geq 200$  mg/dL após duas da carga de glicose e A1C acima de  $\geq 6,5\%$ . Manifestações clínicas podem surgir de forma secundária a alguma patologia que promova destruição das ilhotas pancreáticas como, distúrbios endócrinos, tumores, defeitos genéticos e funcionais das células  $\beta$  pancreáticas ou na ação da insulina. As formas mais frequentes de DM resultam em comprometimento da secreção e/ou sinalização de insulina, sendo classificadas em DM1 e DM2. Em ambas, vários fatores ambientais e genéticos podem resultar na perda progressiva da função e/ou massa das células  $\beta$  pancreáticas, resultando em subsequente aumento da glicemia.

O DM 1 manifesta-se geralmente durante a infância e é caracterizado por uma severa ou total ausência de insulina, a que é geralmente associada a processos autoimunes que afetam a funcionalidade das células  $\beta$  pancreáticas (HOWSON et al., 2011). Tem sido sugerido que o caráter hereditário do DM do tipo 1 está relacionado com a expressão de genes reguladores da produção de anticorpos contra células  $\beta$  pancreáticas (MOORE et al., 2009).

O DM2 é a forma mais frequente de diabetes, afetando 90% da população diabética. Esta condição possui etiologia multifatorial, podendo envolver fatores ambientais como, nível socioeconômico, estilo de vida, hábitos alimentares e prática de exercícios físicos e fatores genéticos que podem gerar graus variáveis de resistência à insulina em tecidos periféricos ou em uma deficiência relativa na secreção desse hormônio pelas células  $\beta$  pancreáticas (CLERK; RATTIGAN; CLARK, 2002; DRESNER et al., 1999; WEYER et al., 1999) .

Apesar da carga genética ser extremamente relevante para o desenvolvimento do DM 2, os fatores ambientais são imprescindíveis para o desenvolvimento desta patologia.

A prevalência de indivíduos com diabetes aumentou de 108 milhões de 1980 para 425 milhões em 2017 em todo mundo, sendo mais evidenciado em países com renda média e baixa. Essas projeções devem alcançar 629 milhões de indivíduos no mundo em 2045 (WHO, 2018). No Brasil 8,1% dos adultos na faixa etária de 20 a 75 anos tem diagnóstico de diabetes, o que confere 12 milhões de brasileiros (IDF, 2017).

Os comportamentos sedentários, como a ausência de atividade física associada a maus hábitos alimentares com balanço energético positivo, provocam aumento de peso corporal, principalmente aumento da massa adiposa (CRESPO et al., 2001; ROMIEU et al., 2017). De fato, dados epidemiológicos demonstram uma íntima relação entre o aumento do grau de obesidade e o desenvolvimento do diabetes (COLDITZ et al., 1995). A glicotoxicidade e lipotoxicidade vista nos modelos animais de diabetes induzido por estreptozotocina e obesidade induzida por dieta hiperlipídica, respectivamente, acometem várias regiões do cérebro, como o hipocampo, atenuando a neurogênese, plasticidade sináptica e a cognição (SPINELLI et al., 2017; STRANAHAN et al., 2008a, 2008b; ZHANG et al., 2008). Esses achados condizem com estudos prospectivos, onde demonstram que o IMC elevado é associado com o risco de demência e início precoce de DA (CHUANG et al., 2016; GOROSPE; DAVE, 2007). Indivíduos com DM2 apresentam 60% de chances a mais para desenvolver demência quando comparados com indivíduos normoglicêmicos (SPELIOTES et al., 2010). Ainda, indivíduos sem diagnóstico de diabetes, mas com a glicemia média entre 115 mg/dL, foram relacionados a um risco aumentado de demência quando comparados aos indivíduos com a glicemia controlada (CRANE et al., 2013).

### 2.3 MAIOR PREDISPOSIÇÃO AO DECLÍNIO COGNITIVO NA OBESIDADE E DIABETES

Um robusto corpo de evidências tem demonstrado que a obesidade, a resistência à insulina e o diabetes estão associados com comprometimento cognitivo e da memória, com possível desenvolvimento de demência (COPE et al., 2018; HASSENSTAB et al., 2010; OTT et al., 1996; PEILA; RODRIGUEZ; LAUNER, 2002; XU et al., 2011). O hipocampo foi descrito como uma região cerebral necessária para a formação e consolidação da memória

(BLISS; GARDNER-MEDWIN, 1973) por ser associada à potenciação de longa duração (LTP) (IZQUIERDO et al., 2008).

Além disso, estudos demonstraram que células mononucleares do sangue periférico de indivíduos obesos (HUANG et al., 2015a; REMOR et al., 2018) podem apresentar alterações no padrão de metilação do DNA. Assim como, o hipocampo de ratos induzidos a hiperglicemia crônica por estreptozotocina podem apresentar metilação na região de genes neuroprotetores, (REMOR et al., 2018), podendo possivelmente causar neurotoxicidade e comprometimento cognitivo ou demência (LU et al., 2014). Ainda, as alterações epigenéticas podem ser um cenário atraente para elucidar o comprometimento cognitivo no contexto do diabetes e da obesidade.

O termo epigenética foi introduzido por Conrad H. Waddington em 1942 para descrever a existência de processos que alteram a atividade da expressão gênica sem alterar a sequência de bases no DNA (WADDINGTON, 2012). Este processo é responsável por remodelar a cromatina permitindo a expressão de determinados genes a fim de canalizar a identidade celular em determinados contextos, tanto na fisiologia quanto na doença (ALLIS; JENUWEIN, 2016). Caso ocorram de modo inapropriado eles causam efeitos prejudiciais à saúde e ao comportamento. As alterações epigenéticas melhor caracterizadas e estudadas até o momento são metilação e hidroximetilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas (acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, desaminação e isomerização da prolina) e os RNA não codificadores (ncRNA) transcritos do DNA genômico (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009; MOAZED, 2009; RINN; CHANG, 2012; TOST, 2010).

A metilação do DNA é a forma de alteração epigenética mais estudada e compreendida que envolve a adição covalente de um grupo metil, transferido a partir do S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5 de uma citosina que precede uma guanina (CpG). Essa reação é catalisada por uma enzima DNA metiltransferase (SAWAN et al., 2008). De fato, quando a metilação do DNA é prevalente em regiões de genes funcionais chamadas ilhas CpG, essa configuração no DNA leva a inibição da expressão gênica (TUREK-PLEWA; JAGODZINSKI, 2005). Neste contexto, estudos clínicos e pré-clínicos tem correlacionado desarranjos epigenéticos como um aumento da metilação de DNA, com a manifestação de doenças neurodegenerativas (CICCARONE et al., 2018; GUO et al., 2011), assim como um maior estado de metilação do DNA em ilhas CpG (MASLIAH et al., 2013). De tal forma, a

dinâmica epigenética parece ser um processo crucial mediante à fatores externos em situações como obesidade e diabetes, podendo contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que crianças obesas com idade média de 11 anos apresentaram um padrão de metilação global de DNA elevado quando comparado com crianças eutróficas em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Isso foi acompanhado por uma maior metilação da região promotora do fator de silenciamento do elemento repressor 1 (REST) (REMOR et al., 2018). O REST é um fator mestre na transcrição que, em neurônios diferenciados, regula negativamente genes ligados à morte celular e aumenta a expressão de genes que induzem a resistência ao processo de envelhecimento e a preservação da função cognitiva (LU et al., 2014). O IMC tem se correlacionado positivamente com a metilação global do DNA em indivíduos afetados pelo diabetes, síndrome metabólica e doenças cardíacas, todas condições ligadas à obesidade (HE et al., 2019).

A obesidade e o DM ao longo da vida são associados com menor desempenho cognitivo, declínio cognitivo, redução da substância branca, redução da integridade da barreira hematoencefálica, atrofia cerebral e aumento do risco de doença de Alzheimer de início tardio (DA) (PROFENNO; PORSTEINSSON; FARAONE, 2010).

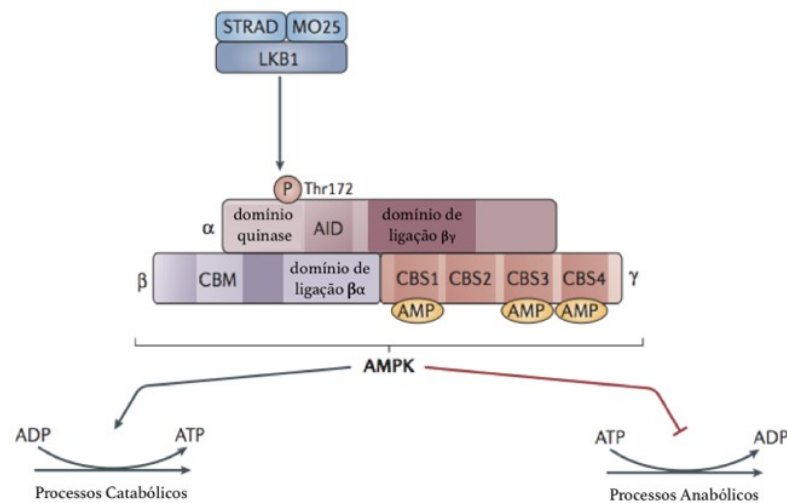
Estudos clínicos sugerem que a obesidade e o DM2 mal controlados progressivamente diminuem as respostas da glicose cerebral à hiperglicemia, por conta da desregulação metabólica no SNC, aumentando o risco de declínio cognitivo em indivíduos com obesidade ou diabetes não controlado (HWANG et al., 2017)

Além disso, análises de dados genômicos tem evidenciado a desregulação metabólica com o desenvolvimento de DA. Sendo que esses processos envolvem principalmente a AMPK (CABERLOTTO et al., 2013; CAI et al., 2012; SALMINEN; KAARNIRANTA, 2012). Essas alterações metabólicas no cenário obesogênico e diabético poderiam revelar potenciais mecanismos associados com o declínio cognitivo devido ao comprometimento da sinalização da proteína AMPK.

## 2.4 MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA

O estado energético celular é monitorado pela proteína AMPK, uma proteína cinase que atua como um sensor metabólico, detectando o estado energético da célula (ARNOLD et al., 2014) e regulando a homeostase energética (ZHANG; ZHOU; LI, 2009). A AMPK é um heterodímero composto de uma subunidade catalítica ( $\alpha$ ) e duas subunidades regulatórias ( $\beta$  e  $\gamma$ ) (RUDERMAN et al., 2013). A subunidade  $\gamma$  possui sítios de ligação que permitem a detecção de níveis intracelulares de AMP, ADP e ATP, permitindo que um estresse energético que aumente a relação AMP/ATP intracelular aumente a atividade da AMPK (XIAO et al., 2007), que atua promovendo a produção de ATP através do aumento da atividade e expressão de proteínas envolvidas no catabolismo, enquanto preserva o ATP inibindo vias anabólicas (HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012) (Figura 2). A ativação da AMPK pode ocorrer por fosforilação na treonina 172 na subunidade  $\alpha$  (MARINANGELI et al., 2018). A ativação da AMPK pela interação do AMP com a subunidade  $\gamma$  pode ocorrer através de três mecanismos distintos, o AMP pode estimular AMPKK a fosforilar o resíduo de treonina 172 da AMPK (HAWLEY et al., 1995), a AMP inibe a desfosforilação da treonina 172 da AMPK por inibição de fosfatases (DAVIES et al., 1995) ou a AMP causa ativação da AMPK já fosforilada por um mecanismo alostérico (GOWANS et al., 2013). Ainda, a cinase hepática B1 (LKB1) desempenha um papel essencial na ativação da AMPK, em células deficientes de LKB1 o tratamento com AICAR ou metformina não conseguem ativar a AMPK (HAWLEY et al., 2003), pois a LKB1 é constitutivamente ativa e medeia a maioria da ativação da AMPK em quase todos os tipos de tecidos (SHI et al., 2016).

Figura 2 - Estrutura e ativação da AMPK.



Subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  com seus respectivos domínios e os principais efeitos da AMPK no metabolismo energético. Fonte: Adaptado de HERZIG; SHAW (2018).

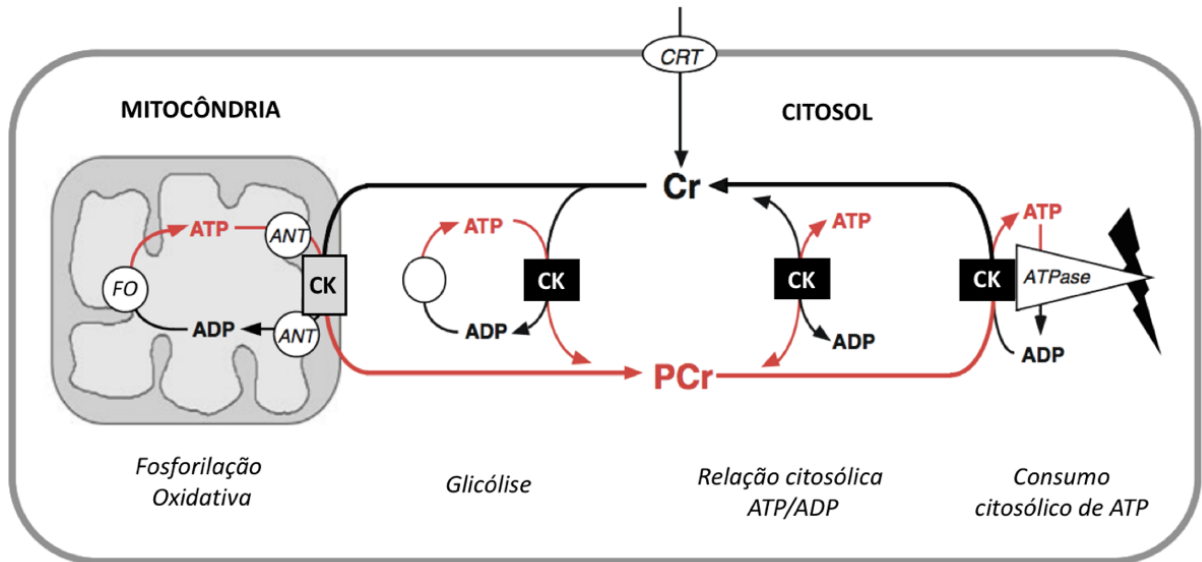
A AMPK é altamente expressa no cérebro e sua atividade é essencial para o metabolismo energético neuronal, sendo que sua desregulação pode ser associada ao declínio cognitivo (MARINANGELI et al., 2018), pois atua diretamente em fatores de transcrição e enzimas associadas à homeostase energética (RAMÍREZ RÍOS et al., 2014). A AMPK pode fosforilar a proteína cinase de ativação por autofagia tipo-Unc-51 (ULK1) (HUANG et al., 2019), regulando sua atividade, que é necessária para a formação de autofagossomos e também inibir o complexo 1 da proteína alvo da rapamicina (mTORC1), resultando em indução da autofagia (MARTINA et al., 2012). Além disso, a AMPK pode fosforilar FOXO3, um membro da família FOXO de fatores de transcrição, ativando sua atividade transcricional, que promove resistência ao estresse oxidativo e longevidade (GREER et al., 2007), assim como pode fosforilar e ativar o co-ativador-1  $\alpha$  do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC1- $\alpha$ ) (CANTÓ et al., 2009), um regulador essencial do metabolismo energético mitocondrial (FAN et al., 2018). Ainda, a AMPK pode interagir também com a isoforma cerebral da creatina cinase, CK-BB (RAMÍREZ RÍOS et al., 2014).

A CK catalisa a transferência reversível de um grupo fosfato de ATP para creatina, formando fosfocreatina (PCr) e adenosina difosfato (ADP), conferindo a ela um papel essencial no armazenamento, tamponamento e transporte de fosfatos de alta energia das mitocôndrias para os locais de demanda energética (ZERVOU et al., 2017).

A fosforilação e desfosforilação da creatina é feita pelas creatinas cinases do tipo cerebral (CK-B), do tipo muscular (CK-M) e também creatinas cinases mitocondriais (CK-Mt) (BORCHEL et al., 2014). CK-Mt é ativa quando forma octâmeros no espaço intermembranoso mitocondrial, enquanto CK-M e CK-B existem como dímeros formando as isoenzimas citosólicas CK-MM, CK-BB e CK-MB (ZERVOU et al., 2017). A CK-Mt fosforila diretamente a creatina na mitocôndria, enquanto a reação inversa é realizada pelas cinases citosólicas CK-BB e CK-MM. Em humanos, a deficiência de uma dessas enzimas causa graves problemas de saúde, incluindo declínio cognitivo (STÖCKLER-IPSIROGLU; MERCIMEK-MAHMUTOGLU; SALOMONS, 2012) (Figura 3).



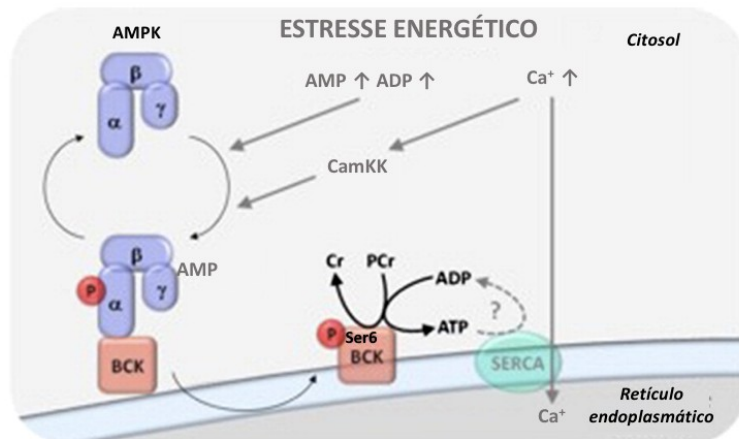
Figura 3 - Sistema celular da creatina cinase.



A creatina entra nas células com alta demanda energética via transportador de creatina (CRT). Dentro da célula o equilíbrio PCr/Cr e ATP/ADP são ajustados pelas isoformas de CK conforme o estado e a demanda de energia. Adaptado de WALLIMANN et al., (2011).

Ramírez Ríos et al. (2014) demonstraram uma interação direta entre a AMPK e isoforma CK-BB. A ativação farmacológica da AMPK, mimetizando condições de estresse energético, leva a fosforilação no resíduo de serina 6 da CK-BB em astrócitos e fibroblastos de camundongos. Essa alteração pós-traducional não modifica a atividade nem o conteúdo da CKBB, mas leva ao acúmulo de CK-BB próximo da bomba de  $\text{Ca}^{+}$  no retículo endoplasmático (RAMÍREZ RÍOS et al., 2014) (Figura 4).

Figura 4 - Interação da proteína AMPK com a CK-BB.



Regulação pós-traducional da CK cerebral pela AMPK e subsequente translocação para região próxima da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo endoplasmático. Adaptado de RAMÍREZ RÍOS et al., (20114).

Em tecidos com elevada demanda energética, como tecido muscular esquelético e cerebral, o sistema CK mantém níveis estáveis entre a relação ATP/ADP (SAKS et al., 2007; SCHLATTNER et al., 2016).

Como resultado, os sistemas AMPK e CK cooperam na manutenção da homeostase energética celular. No entanto, o sistema CK pode reagir muito rapidamente a um desafio agudo de energia, enquanto a AMPK está mais envolvida em adaptações de médio e longo prazo (RAMÍREZ RÍOS et al., 2014). Dessa forma, a AMPK desempenha um papel chave para manter o funcionamento energético no SNC. Marinangeli et al. (2018) demonstraram que a AMPK é rapidamente ativada após a transmissão sináptica estimulando o metabolismo glicolítico e oxidativo no hipocampo para rápido fornecimento de energia neuronal. Portanto, a AMPK apresenta uma ação essencial no metabolismo energético cerebral e formação da memória (MARINANGELI et al., 2018).

## 2.5 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA

Glicação (glicosilação não enzimática) é uma reação de ligação entre o grupo carbonila de um açúcar redutor e um grupo amino de proteínas, lipídios ou peptídeos, gerando os produtos finais de glicação avançada (AGEs), que alteram funções celulares produzindo radicais livres e fragmentando proteínas ou lipídios, além de alterar a atividade enzimática e contribuir para o desenvolvimento e progressão das complicações do diabetes (SHENG et al., 2019). Após a ligação aos seus receptores, os AGEs estimulam a geração de ERO, agravando o estresse oxidativo (ZHA et al., 2018) por ativação de vias inflamatórias (GUIMARÃES et

al., 2010). A acumulação de AGEs tem sido associado ao desenvolvimento de doenças crônicas como, DM2, doença cardiovascular, hipertensão e doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer e Parkinson), podendo alterar a estrutura e funções de proteínas ou aumentar a inflamação e estresse oxidativo (KOBOROVÁ et al., 2017; KOLD-CHRISTENSEN et al., 2019).

O metilglioxal (MG) é um alfa-oxaldeído altamente reativo o qual pode ser formado a partir de trioses-fosfato, através de acetonas durante o metabolismo dos ácidos graxos e a partir do catabolismo do aminoácido treonina (KOOP; CASAZZA, 1985; THORNALLEY, 1996). O MG pode ser formado não enzimaticamente a partir das trioses-fosfato, (PHILLIPS; THORNALLEY, 1993) ou com a participação das enzimas triose-fosfato isomerase, a qual converte o gliceraldeído-3-fosfato a diidroxiacetona fosfato (POMPLIANO; PEYMAN; KNOWLES, 1990) sendo este último convertido a MG pela metilglioxal sintase (RAY; RAY, 1981). A formação não enzimática de metilglioxal ocorre em todas as células, sendo que cerca de 0,1% do metabolismo de trioses- fosfato resultam na formação de MG em condições normoglicêmicas (PHILLIPS; THORNALLEY, 1993).

Pacientes diabéticos apresentam um aumento nas concentrações de MG em fluidos corporais e tecidos, o que leva a pressupor que este composto é um dos principais responsáveis pelas complicações diabéticas (VANDER JAGT; HUNSAKER, 2003). O MG medeia a rápida glicação não enzimática de proteínas, lipídios e DNA para promover a formação AGEs, que podem causar danos irreversíveis a essas macromoléculas, alterando a integridade estrutural e funcional (CHENG et al., 2019). Ainda, o MG também foi associado a efeitos tóxicos sobre os neurônios hipocâmpais, afetando a neurogênese e induzindo a morte de células progenitoras neurais (CHUN et al., 2016). Além disso, foi relatado que o MG pode prejudicar a homeostase redox das células inibindo as glioxalases e diminuindo a glutathiona reduzida intracelular, que é um cofator essencial para a glioxalase 1 e para enzimas antioxidantes essenciais, como a glutathiona peroxidase (FALONE et al., 2012).

### **3 JUSTIFICATIVA**

O déficit cognitivo e as doenças neurodegenerativas representam problemas de saúde desafiadores para os sistemas públicos de saúde e são responsáveis por um grande número de

hospitalizações e incapacidades que resultam em prejuízos econômicos. Várias décadas de pesquisa científica permitiram entender que estas alterações resultam de uma combinação de fatores genéticos e ambientais. No entanto, ainda se está longe de conseguir instaurar tratamentos eficazes. Neste contexto, o projeto aqui proposto pretende aprofundar no entendimento dos alguns mecanismos neurobiológicos básicos, que levam a uma maior predisposição ao desenvolvimento de neurotoxicidade e déficit cognitivo em condições de hiperglicemia prolongada e/ou obesidade, pretendendo compreender melhor as alterações epigênicas e metabólicas no hipocampo, principal região cerebral envolvida na aquisição e consolidação da memória, com o intuito de prevenir as mesmas e dessa forma melhorar a qualidade de vida dos pacientes, bem como a de suas famílias e de diminuir o peso econômico aos sistemas públicos de saúde.

#### **4 HIPÓTESE**

A obesidade e/ou a hiperglicemia crônica comprometem o funcionamento do metabolismo energético cerebral levando a falhas na fosforilação de enzimas chaves na sinalização energética, propiciadas provavelmente através de uma epigenética aberrante e resultando em déficits cognitivos.

#### **5 OBJETIVOS**

##### **5.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o envolvimento do metabolismo energético hipocampal no declínio cognitivo induzido pela hiperglicemia crônica e realizar um levantamento bibliográfico sobre os mecanismos neuroprotetores induzidos pelo exercício sobre o declínio cognitivo associado à obesidade e distúrbios metabólicos como no diabetes *mellitus*.

##### **5.2 OBJETIVOS**

a. Quantificação do conteúdo proteico e/ou atividade de proteínas envolvidas no monitoramento do nível energético celular (LKB1, AMPK e CK), no hipocampo de ratos submetidos à hiperglicemia crônica que apresentaram alterações no aprendizado e memória.

- b. Analisar o efeito *in vitro* do MG sobre a respiração mitocondrial em células da linhagem celular (H19-7) de células precursoras de hipocampo.
- c. Quantificar o impacto dos AGEs sobre a indução de autofagia em células astrogliais da linhagem C6.
- d. Revisar a bibliografia relacionada com os principais mecanismos neuroprotetores induzidos pelo exercício físico sobre o declínio cognitivo associado à obesidade e distúrbios metabólicos como no diabetes *mellitus*.

## **6 MATERIAS E MÉTODOS REFERENTES AO MODELO DE HIPERGLICEMIA**

### **6.1 ANIMAIS**

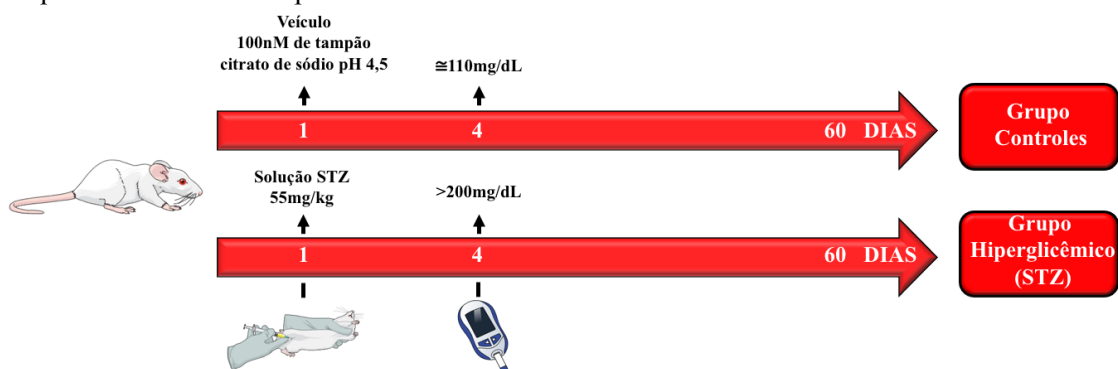
Foram utilizados ratos Wistar machos de 60 dias de vida pesando entre 250-350g provindos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, Brasil. Os animais foram aclimatados no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da mesma Universidade, com temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) e em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Estes foram mantidos em caixas de plástico individuais, com livre acesso à água e à ração comercial para roedores (Nuvital/PR, Brasil), com exceção dos períodos em que os ratos deveriam permanecer em jejum (6 horas), para as mensurações relacionadas à glicose sanguínea. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA (PP000350/CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, e foi realizado de acordo com o “Guia de Princípios para o uso de Animais em Toxicologia” adotado pela sociedade de toxicologia em julho de 1989. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

### **6.2 MODELO EXPERIMENTAL DE DM: INDUÇÃO DE HIPERGLICEMIA CRÔNICA ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL (i.p.) DE ESTREPTOZOTOCINA**

A hiperglicemia foi induzida por uma única injeção i.p. de 55 mg/kg de STZ diluída em tampão citrato de sódio (pH 4,5), após um período de jejum de 14 horas. Controles foram

executados em paralelo, os quais receberam somente a injeção i.p. de veículo (tampão citrato de sódio, pH 4,5, grupo controles). Após a administração de STZ, os ratos receberam água contendo glicose a 5% durante 24 horas, a fim de evitar morte por hipoglicemia. Quatro dias após a administração de STZ (ou veículo), com jejum prévio de 6 horas, as concentrações de glicose no sangue foram avaliadas utilizando-se um glicosímetro (Optium Xceed, Abbot, EUA). Os animais com concentração de glicose sanguínea superior a 200 mg/dL (11 mmol/L) foram considerados hiperglicêmicos e separados para o grupo STZ, esses animais permaneceram hiperglicêmicos durante 60 dias, enquanto que o grupo controles permaneceu normoglicêmico durante 60 dias. A glicemia dos animais foi mensurada nos dias 15, 45 e 60 do delineamento, enquanto que o peso foi mensurado diariamente. Esquema 1.

Esquema 1 - Desenho experimental.



Hiperglicemia crônica induzida pela administração i.p. de estreptozotocina em ratos Wistar.

### 6.3 ANÁLISE DE PROTEÍNAS PARA *WESTERN BLOTTING*

O hipocampo foi homogeneizado em cinco volumes (1:5, v/v) de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM, Triton X - 100 a 1%, glicerol a 10% e coquetel inibidor de protease [Sigma]). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, durante 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi coletado e diluído em 1 volume (1:1, v/v) de tampão Tris 100 mM, pH 6,8 contendo EDTA 4 mM e SDS a 8%. Após, as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 minutos e o tampão de diluição (Tris 100 mM, com 40% de glicerol e azul de bromofenol, pH 6,8), numa proporção 25:100 (v/v), e  $\beta$ -mercaptoetanol (na concentração final de 8%), foram adicionados nas amostras.

As proteínas foram separadas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio [SDS]) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 12% e gel de entrada a 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 150 mV durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e transferidos para membranas de nitrocelulose usando um sistema semi-dry (1,2 mA/cm<sup>2</sup>; 1,5 h) como descrito por Bjerrum e Heegaard (1988). Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S.

Após, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). AMPK-p, AMPK, LKB1-p, LKB1, CK-MM e CK-BB foram detectadas após incubação overnight (4°C) com anticorpos específicos para estas proteínas diluídos em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) na diluição de 1:1000 (Santa Cruz Technology). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-coelho (conjugado à peroxidase) e reveladas em filme radiográfico, após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose (LumiGLO), de acordo com as recomendações do fabricante. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti-β-actina (1:2000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas foi aplicada no gel. Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguidos por três lavagens (5 minutos) com TBS-T. As bandas imunorreativas foram quantificadas usando o software Scion Image<sup>®</sup> (LOPES et al., 2012).

#### 6.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação de proteínas dos homogeneizados foram realizadas pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

#### 6.5 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DE CREATINACINASE

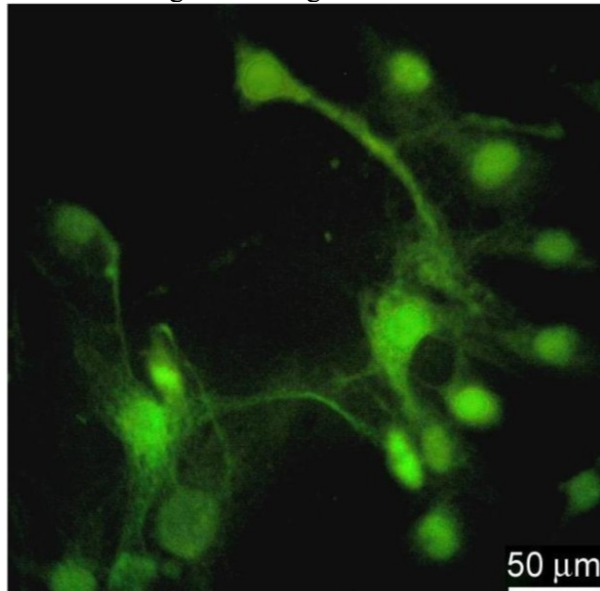
A atividade da creatinacinase foi mensurada em homogenato de hipocampo baseada na formação de creatina de acordo com o método colorimétrico de Hughes (HUGHES, 1962),

com modificações previamente descritas por Glaser e colaboradores (2010). Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol}$  de creatina formada  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína $^{-1}$ .

## 6.6 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE ASTROGLIOMA C6

A linhagem celular de astroglioma C6 foi obtida de American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, EUA). Estas células adotam características de astrócitos (células 99% GFAP positivas; Figura 7) e tem sido empregadas como modelo experimental para o estudo do efeito *in vitro* de numerosos toxicantes (HAGHIGHAT; MCCANDLESS; GERAMINEGAD, 2000; HAGHIGHAT; MCCANDLESS; GERAMINEJAD, 1999). As células foram cultivadas em frascos em meio Eagle's com modificação de Dubelcco (DMEM) contendo 2,5 mg/mL de Fungizone<sup>®</sup> e 100 U/L de gentamicina, suplementadas com 5 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB), e mantidas a 37 °C com um mínimo de 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram tratadas com 0,05% de tripsina/ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) e cultivadas em distintas placas para as diferentes análises (DOS SANTOS et al., 2006).

Figura 5. Imagem ilustrativa da morfologia da linhagem de células C6



A expressão de GFAP indica que a linhagem utilizada apresenta características de astrócitos.



## 6.7 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE CÉLULAS PRECURSORAS DE HIPOCAMPO (H19-7) DE RATO

A linhagem celular H19-7 foi obtida de *American Type Culture Collection* (A TCC, Manassas, V A, EUA). Estas células foram cultivadas em meio DMEM contendo 2 mM L-glutamina, 10% de SFB, 200 mg/mL de G418 e 1 mg/mL de piromicina em placas de cultura contendo 15 mg/mL de poli-D-lisina e mantidas em uma estufa a 34°C, com um mínimo de 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO<sub>2</sub>.

## 6.8 DETECÇÃO DE MG INTRACELULAR LIVRE

O MG intracelular livre foi detectado usando a sonda fluorescente metildiaminobenzeno-BODIPY (MBo), (WANG et al., 2013). Células (44000 células/mL) foram plaqueadas em uma placa de 12 poços e tratadas em meio com D-MEM *high glucose* durante 48 horas. Às 47 horas de tratamento, foi adicionado o MBo (10 µM) e, após 1 hora, as células foram lavadas com PBS + (PBS + CaCl<sub>2</sub> + CaMg<sub>2</sub>), os núcleos foram corados com 100 µg/mL de Hoechst (Invitrogen) durante 10 minutos à 37°C. Em seguida, as células foram visualizadas utilizando o microscópio de fluorescência invertido Olympus IX 83 (MBo: excitação 470 nm, emissão 525nm; Hoechst: excitação 350 nm, emissão 460 nm). A fluorescência total de MBo e o número total de núcleos por campo foram avaliados utilizando o software imageJ® (NHI) e o MG intracelular livre foi expresso como intensidade de fluorescência por núcleo.

## 6.9 DETECÇÃO DE AGES NOS LISADOS DE CÉLULAS C6

A técnica de DOT BLOT foi utilizada para os níveis de proteínas oxidadas por MG em lisado de células C6 usando um anticorpo específico contra metil-glioxal-hidroimidazolona (MG-H1) (anti-MG; CELL; BIOLABS, INC). As células foram semeadas numa concentração de 150000 células/mL em uma placa de 6 poços e foram tratadas com glicose durante 48 horas. Após o tratamento, as células foram lisadas sobre gelo com tampão de lise (Tris-HCl 50 mM e 10% de coquetel inibidor de protease). Em seguida, o lisado foi

centrifugado a 10000 x g durante 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi recolhido, sonificado durante 30 segundos e aquecido a 60°C durante 3 minutos. A proteína no lisado foi dosada utilizando o método de Lowry et al. (1951) usando albumina bovina como padrão e as proteínas foram desnaturadas usando tampão de desnaturação (Tris 329 mM; pH 6,8; glicerol 50%; SDS 10%; azul de bromofenol) na razão de 10:100 v/v e  $\beta$ -mercaptoetanol (concentração final de 5%) nas amostras. Quantidades iguais de proteína (3  $\mu$ g) foram pipetadas em uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Após 30 minutos de secagem, a membrana foi ativada utilizando metanol e lavada três vezes com TBS-t (Tris 10mM, NaCl 150mM, pH 7,5 Tween-20 a 1%). MG-H1 foi detectado após a incubação *overnight* com o anticorpo anti-MG diluído em TBS-t (1:4000). Posteriormente, a membrana foi incubada a 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-camundongo (anti-mouse; CELL, BIOLABS, INC). Conjugado com peroxidase de rabanete (HRP) para detecção do anticorpo primário. A reação de quimioluminescência foi detectada com o uso ChemiDoc (BioRad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) e a análise densitométrica foi realizada pelo ImageJ® (NHI). Comassie Blue foi usado com controle de carregamento (*loading*).

## 6.10 MASSA MITOCONDRIAL

A massa mitocondrial foi avaliada por microscopia, usando uma sonda fluorescente chamada Mitotracker™ Deep Red (Thermo Fischer Scientific, EUA) (GRAVES et al., 2012; LUGLI et al., 2005). Células (44000 células/mL) foram plaqueadas em uma placa de 12 poços e tratadas com glicose durante 24 e 48 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas em PBS e posteriormente incubadas com Mitotracker™ Deep Red (300 nM) por 15 minutos à temperatura ambiente, em seguida as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído (3,7%) por 5 minutos. Posteriormente, os núcleos foram marcados com o marcador nuclear DAPI (5  $\mu$ g/mL) durante 5 minutos. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência (microscópio invertido Olympus IX 83; mitotracker: excitação 620 nm). A fluorescência total do mitotracker e o número total de mitocôndria foram quantificados usando o software imageJ® (NHI) e a massa mitocondrial foi expressa como intensidade de fluorescência.

### 6.11 FORMAÇÃO DE AGES A PARTIR DE MG (MG-BSA)

Para a geração de proteínas oxidadas por MG, BSA na concentração de 7,2 mg/mL foi exposta ao MG na concentração de 100 mM em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,4 a 37°C por 50 horas em condições estéreis (as soluções foram filtradas em membrana de 0,22 µm). Após este período, estas soluções modificadas de proteínas foram dialisadas em tampão bicarbonato de amônio 30 mM, pH 7,9 a 4°C, e congeladas a -20°C (REMOR et al., 2011).

### 6.12 EFEITOS DOS AGES EM CÉLULAS C6

As células da linhagem celular de astroglioma C6 foram tratadas com 0,05% de tripsina/ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) e cultivadas em distintas placas para as posteriores análises (DOS SANTOS et al., 2006). Após confluência, o meio foi trocado por DMEM contendo SFB 1% e BSA 1 mg/mL ou MG-BSA 0,1 e 1 mg/mL, durante 48 horas.

### 6.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As células tratadas com BSA 1 mg/mL ou MG-BSA 0,1 e 1 mg/mL, após 48 horas de incubação, foram tripsinizadas, centrifugadas e fixadas em uma solução contendo 4% de paraformaldeído e 1,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1M durante 24 horas. Posteriormente, as células ou as peças de tecido (córtex cerebral) foram submetidas a três lavagens de 30 minutos em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4. Em seguida, estas amostras foram colocadas em tampão cacodilato contendo tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, e foram novamente lavadas em tampãocacodilato. O material foi posteriormente desidratado em concentrações crescentes de acetona (30; 50; 70; 90 e 2 vezes em 100% durante 20 minutos, a temperatura ambiente) e imerso em solução de acetona e resina Spurr ou araldita, a temperatura ambiente (2:1; 1:1 e 1:2). Finalmente, as peças foram tratadas com resina pura (24 horas em estufa a 58-60°C, para solidificação) para posterior microtomia, a qual foi realizada em ultramicrotomo na espessura de 60 – 70 nm (HERNÁNDEZ-FONSECA et al., 2009). As análises de morfologia mitocondrial foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM-101 (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC) e para as

fotografias foi utilizado o sistema de captura de imagens Gatan Digital Micrograph; ou utilizando-se o microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Leo 906 E (Centro de Microscopia Eletrônica da Universidad Nacional de Córdoba) equipado com a câmera digital Megaview III. Para a análise quantitativa do conteúdo mitocondrial e dos vacúolos autofágicos, três passagens diferentes de células de cada condição experimental foram utilizadas. Foram adquiridas sessenta micrografias, de forma aleatória, na magnificação de 10.000 X. O software Image J foi utilizado para as análises (DE PAUL et al., 1997).

#### 6.14 IDENTIFICAÇÃO DE AUTOFAGIA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para esta metodologia, células C6 de astroglioma foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares. Após o tratamento com BSA 1 mg/mL ou MG-BSA 0,1 e 1 mg/mL, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%, durante 24 horas. Após este período, as células foram lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%, e os antígenos inespecíficos foram bloqueados usando-se uma solução de PBS contendo BSA a 5%. A imunofluorescência foi realizada para identificar o conteúdo de vacúolos autofágicos nestas células, usando anticorpo primário monoclonal anti-LC3B (Invitrogen) em uma diluição 1:1000 e incubadas overnight, seguido de lavagens com PBS. Após, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-coelho durante 1 hora a 37°C, seguido da marcação nuclear com DAPI, de lavagens com PBS e montagem da lâmina utilizando-se Gel Mount (Sigma). As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus modelo BX41 e para as fotografias foi utilizado o sistema de captura de imagens Q-capture Pro 5.1. A análise da fluorescência foi realizada em 7-10 campos aleatórios, utilizando-se o software ImageJ<sup>®</sup>.

#### 6.15 MENSURAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO PELA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL

A análise de respiração mitocondrial nas células precursoras de hipocampo (H19-7) foi realizada no *Seahorse X-24 Analyser* (Massachusetts, USA) em um meio de reação

contendo glutamina 100 mM e glicose na concentração de 0,39 mM, a 37°C. Os parâmetros avaliados foram os seguintes:

- 1) Respiração basal: Mensurado através do consumo de oxigênio, sem a adição de substratos ou inibidores de respiração;
- 2) Produção de ATP (contribuição da ATP sintase no consumo de oxigênio basal; eficiência na síntese de ATP): Este estado respiratório está representado pelo consumo de oxigênio ocasionado pela transferência de elétrons através da cadeia respiratória. Neste estado não há síntese de ATP e experimentalmente é analisado o consumo de oxigênio após adicionar oligomicina no meio. A oligomicina é um inibidor da subunidade F<sub>0</sub> da ATP sintase ou complexo V. O efeito induzido por esta inibição é caracterizado por uma marcada redução no consumo de oxigênio (NELSON; COX, 2013);
- 3) Respiração máxima: Este parâmetro representa o consumo de oxigênio observado após adicionar o desacoplador mitocondrial FCCP (carbonilcianeto-4-trifluorometoxifenil-hidroxona). Este composto desacopla a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa por dissipar os prótons que formam o gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial (NELSON; COX, 2013). Este parâmetro indica a capacidade máxima de respiração mitocondrial onde todas as mitocôndrias foram ativadas para realizar a respiração celular (GNAIGER, 2001);
- 4) Produção de ERO extramitocondrial: Indica o consumo de oxigênio não proveniente da respiração mitocondrial, representado pela redução incompleta do oxigênio em espécies reativas. A produção de ERO é observada após adicionar rotenona e antimicina, que inibem irreversivelmente os complexos I e III da cadeia respiratória, respectivamente. Desta forma, com a cadeia transportadora de elétrons inibida, o oxigênio que está sendo consumido não é devido à passagem de elétrons pela cadeia respiratória (GNAIGER, 2001);

## 6.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores foram expressos como médias mais ou menos erro padrão da média (média ± EPM). A distribuição normal foi avaliada de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov e a identificação de possíveis *outliers* foi analisada através do teste de Grubbs. Quando os valores foram considerados normais, foram empregados os testes *t* de student e a

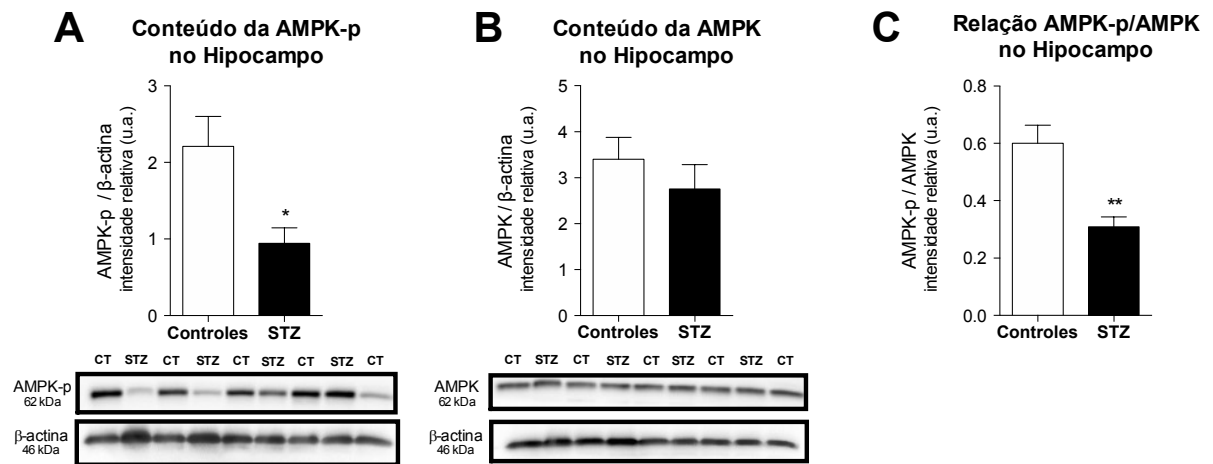
análise de variância (ANOVA) de uma via. Em todos os testes,  $P < 0,05$  foi considerado significativo. O software GraphPad Prism® (San Diego, CA, EUA, 2009) foi utilizado para composição de gráficos e avaliação estatística.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 EFEITO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE STZ SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO HIPOCAMPAL**

#### **7.1.1 Conteúdo proteico (total e fosforilado) da proteína cinase dependente de AMP (AMPK) no hipocampo**

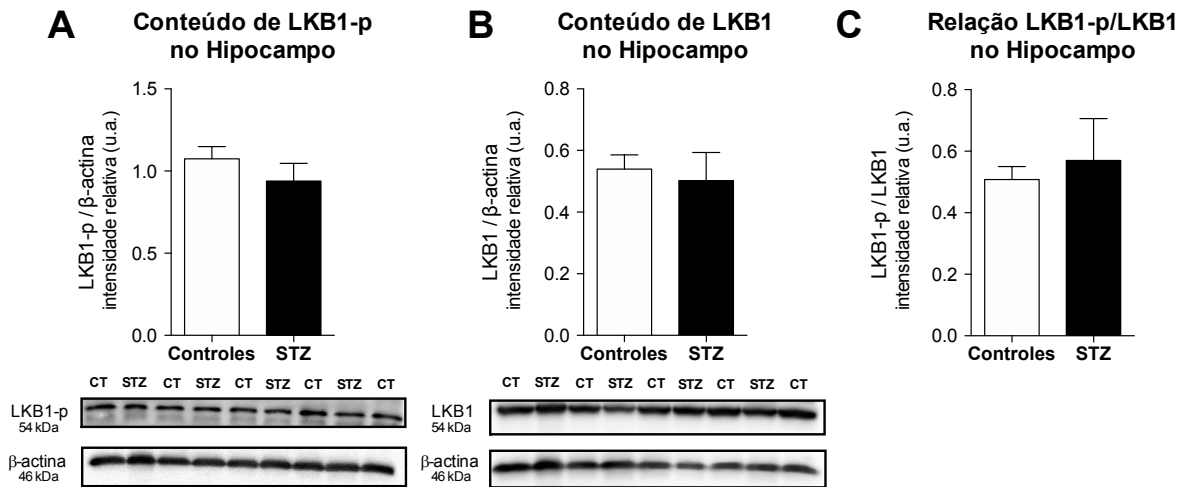
A Figura 6 A-D mostra o resultado da hiperglicemia crônica (60 dias) sobre o conteúdo de AMPK-p, AMPK e a relação entre elas, no hipocampo de ratos Wistar adultos. A Figura 6A mostra uma diminuição significativa no conteúdo de AMPK-p no hipocampo dos animais hiperglicêmicos quando comparados com o grupo controle [ $t_{(10)}=2,87$ ;  $P < 0,05$ ]. No entanto, a Figura 6B mostra que o conteúdo total da AMPK não foi modificado pelo tratamento experimental, resultando numa diminuição significativa da relação AMPK-p/AMPK (Figura 6C) no hipocampo nos animais hiperglicêmicos comparados com o controle [ $t_{(13)}=3,96$ ;  $P < 0,01$ ].



**Figura 6.** Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal), sobre o conteúdo de AMPK-p (A), AMPK (B) e da relação AMPK-p/AMPK (C) no hipocampo de ratos Wistar adultos. A hiperglicemia crônica foi induzida através da administração i.p. de STZ no grupo hiperglicêmico. Em paralelo os animais do grupo controles receberam uma solução de tampão citrato pH 4,5. Os animais que receberam STZ e apresentaram glicemia superior a 200mg/dL (11 mmol/L) quatro dias após a administração foram considerados hiperglicêmicos e separados como grupo STZ. Os dados obtidos dos experimentos de western blotting foram normalizados através da determinação da carga de proteína mensurando o conteúdo de  $\beta$ -actina. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (Controles: n=4; STZ: n=5). \* P < 0,05; \*\*P < 0,01 versus o grupo controle. (Teste t de Student para amostras independentes).

### 7.1.2 Conteúdo proteico (total e fosforilado) da proteína cinase hepática B1 (LKB1) no hipocampo

A Figura 7 A-C mostra o efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) sobre o conteúdo de LKB1-p, LKB1 e a relação entre elas, no hipocampo de ratos Wistar adultos. O conteúdo de LKB1-p (Figura 7A) e o conteúdo total de LKB1 (Figura 7B) não foram modificados pelo tratamento experimental, não alterando a relação LKB1-p/LKB1 (Figura 7C) no hipocampo dos animais hiperglicêmicos comparados com os controles.

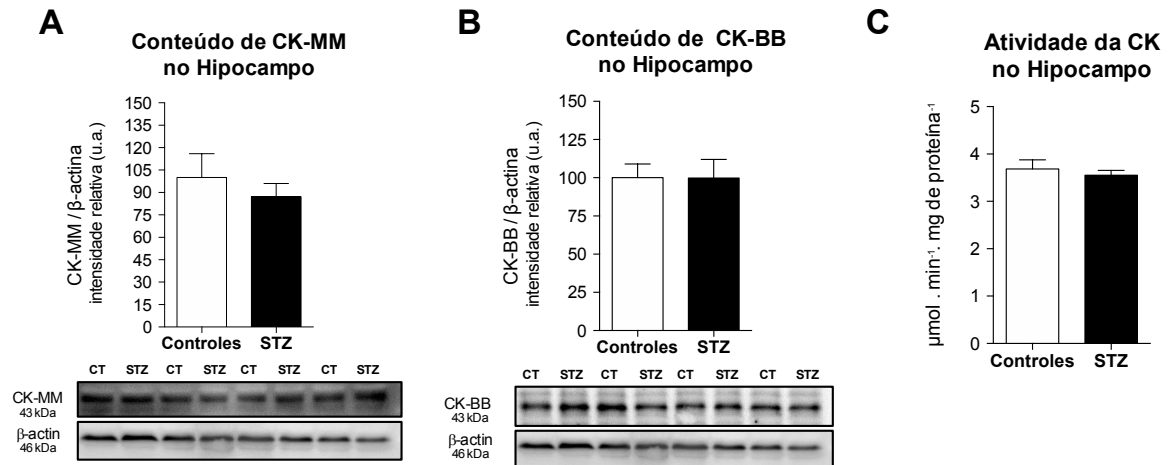


**Figura 7.** Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal), sobre o conteúdo de LKB1-p (A), LKB1 (B) e da relação LKB1-p/LKB1 (C) no hipocampo de ratos Wistar adultos. Os dados obtidos dos experimentos de western blotting foram normalizados através da determinação da carga de proteína mensurando o conteúdo de β-actina. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle. Os dados representam a média ± erro padrão da média (Controles: n=4; STZ: n=5). \* P < 0,05; \*\*P < 0,01 versus o grupo controle. (Teste t de Student para amostras independentes).

### 7.1.3 Conteúdo proteico da creatinacinaze (CK) frações MM e BB e atividade da CK total no hipocampo

A Figura 8 A-C mostra o efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) sobre o conteúdo de CK-MM e CK-BB e atividade de CK no hipocampo de ratos Wistar adultos. A hiperglicemia crônica não modificou o conteúdo total de CK-MM (Figura 8A) tampouco o conteúdo total de CK-BB (Figura 8B) no hipocampo dos animais hiperglicêmicos comparados com o controle. Ainda, a hiperglicemia crônica não alterou a atividade da CK no hipocampo (Figura 8C) dos animais hiperglicêmicos quando comparados com os animais do grupo controle.

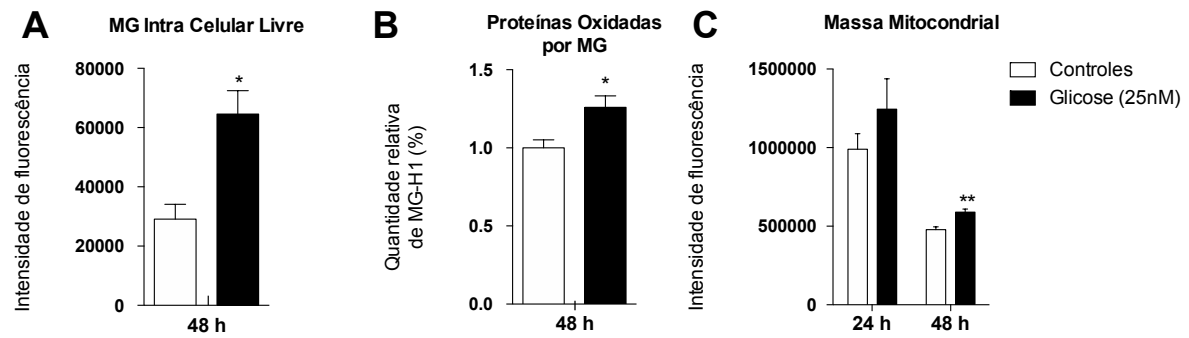




**Figura 8.** Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal), sobre o conteúdo da CK-MM (A) e CK-BB (B) e atividade da CK (C) no hipocampo de ratos Wistar adultos. Os dados obtidos dos experimentos de western blotting foram normalizados através da determinação da carga de proteína mensurando o conteúdo de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n=4 animais por grupo). (Teste t de Student para amostras independentes).

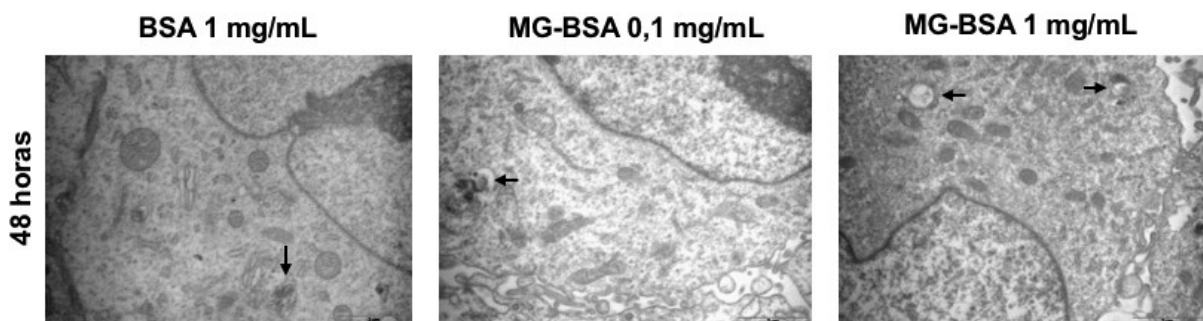
## 7.2 EFEITO DO EXCESSO DE GLICOSE E DOS DERIVADOS DA GLICOSE SOBRE A INDUÇÃO DE MITOFAGIA EM CÉLULAS ASTROGLIAIS DE RATO DA LINHAGEM C6

A Figura 9 A-C mostra o efeito do tratamento com altas concentrações de glicose (25 mM) sobre o acúmulo de MG, AGEs e a massa mitocondrial em células astrogliais C6. O nosso laboratório, LABOX, demonstrou previamente, numa Dissertação de Mestrado (LUCREDI, 2019) que o tratamento com glicose 25mM por 48 horas provoca um aumento significativo nas concentrações de MG e AGEs. As Figuras 9A e 9B mostram um aumento significativo na concentração intracelular de MG [ $t_{(4)}=3,79$ ;  $P < 0,05$ ], bem como de AGEs [ $t_{(8)}=2,87$ ;  $P < 0,05$ ] após o tratamento com glicose 25 mM por 48 horas, respectivamente. O trabalho de Dissertação, ainda demonstrou que este tratamento provoca um aumento de massa mitocondrial, como mostrado na Figura 9C [ $t_{(8)}=4,20$ ;  $P < 0,01$ ].



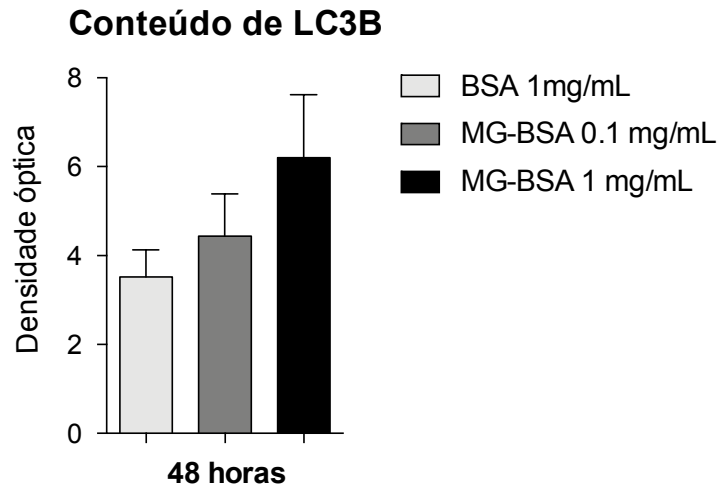
**Figura 9.** Efeito de altas concentrações de glicose (25 mM; 48 h) sobre (A) acúmulo de metilglioxal (MG) e de (B) proteínas oxidadas por MG (AGEs) e sobre (C) a massa mitocondrial em células astrogliais de rato da linhagem C6. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n=4; n=8; n=8 experimentos independentes). \*\* P < 0,05; \*\*P < 0,01 versus o grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes). Com autorização de Naiara Cristina Lucredi (LUCREDI, 2019).

Baseado nestes resultados, foi estudado o efeito de AGEs sobre a indução de mitofagia em células astrogliais C6 e de MG sobre a respiração mitocondrial em neurônios hipocâmpais da linhagem H19-7 de ratos. A Figura 10 mostra o efeito dos AGEs (MG-BSA 0,1 e 1mg/mL) na indução de autofagia em células gliais tratadas por 48 horas. As figuras mostram igual indução de formação de autofagossomos nos diferentes tratamentos experimentais, não tendo sido observadas diferenças significativas.



**Figura 10.** Efeito de produtos terminais de glicação (AGEs; 0,1 e 1 mg/mL; 48h) sobre a formação de vacúolos autofágicos em células C6 de astroglioma de rato. As fotografias são representativas da análise ultraestrutural realizada por microscopia eletrônica de transmissão. A barra nas figuras representa 0,2  $\mu$ m.

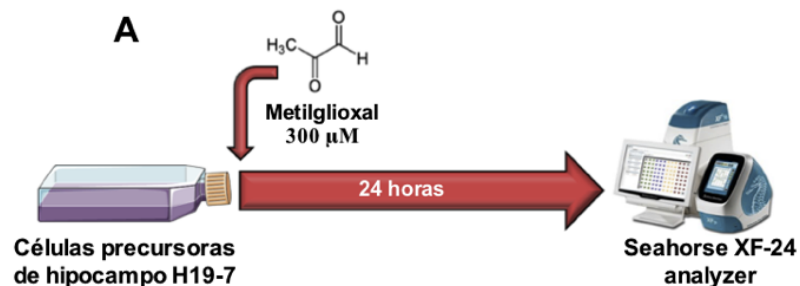
Para confirmar que a mitofagia não foi induzida, foi realizada a determinação da proteína de nucleação de autofagossomos LC3B. A Figura 11 mostra o conteúdo de proteína LC3B nas diferentes condições experimentais em células astrogliais C6 expostas a AGEs (1 e 0.1mg/mL) por 48 h.

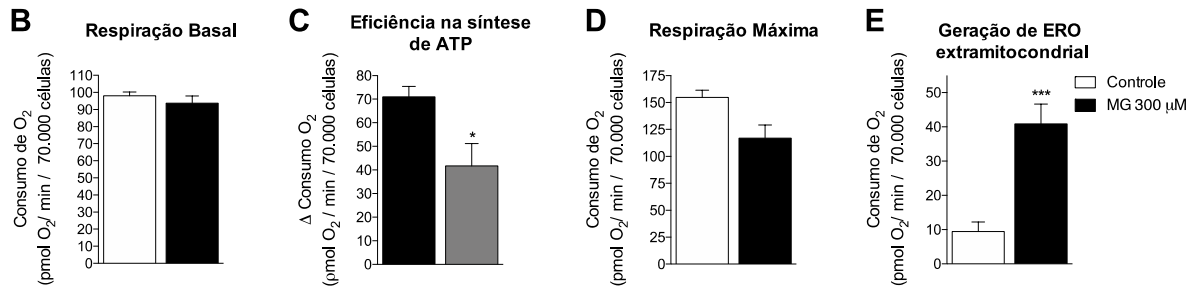


**Figura 11.** Efeito in vitro de produtos terminais de glicação (MG-BSA; 0,1 e 1 mg/mL; 48h) sobre o conteúdo da proteína LC3B em células C6 de astroglioma de rato. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=3$  experimentos independentes) (ANOVA de uma via).

### 7.3 EFEITO DO MG SOBRE A RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS DA LINHAGEM H19-7 DE RATOS

A Figura 12 mostra o efeito do MG (300  $\mu$ M) sobre a respiração mitocondrial na linhagem celular de células precursoras de hipocampo H19-7 de ratos. O desenho experimental está indicado na Figura 12A. A Figura 12B mostra que o tratamento com MG por 24 h não alterou o consumo de oxigênio em condições basais. No entanto, a Figura 12C mostra que o MG comprometeu significativamente a eficiência da síntese de ATP (medida após a adição de oligomicina; inibidor do complexo V) ( $t_{(8)}=3,14$ ;  $P < 0,05$ ). Ainda, a Figura 12D mostra que a respiração máxima (estado desacoplado induzido por FCCP 1  $\mu$ M) não foi comprometida pelo tratamento. Finalmente, a Figura 12E mostra que o tratamento com MG aumentou de modo significativo o consumo de oxigênio extra-mitocondrial apontando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ( $t_{(16)}=3,14$ ;  $P < 0,001$ ).





**Figura 12.** Efeito in vitro do metilglioxal (300 µM) sobre o consumo de oxigênio mitocondrial na linhagem celular de células precursoras de hipocampo H19-7. (A) Mostra o desenho experimental. Os neurônios hipocâmpais da linhagem H19-7 foram tratados com MG durante 24 horas, posteriormente foram analisados aspectos relacionados a fisiologia mitocondrial através do analisador de consumo de oxigênio Seahorse XF-24. As medidas de (B) respiração basal, (C) eficiência na síntese de ATP, (D) respiração máxima e (E) geração de espécies reativas de oxigênio (ERO; consumo de oxigênio extramitocondrial) foram medidas em respirômetro Seahorse XF-24 em meio de reação contendo glutamina 100 mM e glicose na concentração de 0.39 mM a 37°C. Os dados representam média ± erro padrão da média (n= 3 experimentos independentes). \*P<0,05; \*\*\*P<0,001 versus o grupo controle. (Teste t de Student para amostras independentes).

## 8 DISCUSSÃO

Doenças metabólicas, como o diabetes e a obesidade, podem provocar efeitos prejudiciais na cognição e memória (AHMED et al., 2019; COPE et al., 2018; THIELEN et al., 2019). No entanto, os mecanismos subjacentes a esses efeitos permanecem em grande parte desconhecidos. Neste estudo, exploramos potenciais mecanismos que poderiam mediar o desenvolvimento de declínio cognitivo e memória no diabetes e obesidade. Estudos pré-clínicos e clínicos apontam que a inflamação associada à obesidade e a resistência à insulina pode acometer a função hipocâmpal, acarretando em déficits de aprendizagem, comprometimento cognitivo e neurotoxicidade (GRILLO et al., 2015; GUNSTAD et al., 2006; JEONG et al., 2005; PARK; CHO; KIM, 2018). Tem sido ainda demonstrado que tanto fatores genéticos como epigenéticos estão envolvidos na predisposição à obesidade, DM, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, como revisado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa no periódico científico *Physiology & Behaviors* (BARROS et al., 2019).

Vários grupos de pesquisa já têm demonstrado que a hiperglicemia crônica desencadeia danos neuronais, estado definido como glicotoxicidade, devido ao aumento das concentrações intracelulares da glicose (LI et al., 2018), visto que o cérebro é, em geral, um tecido independente de insulina e há um influxo a favor do gradiente de concentração de glicose (LAMANNA; HARIK, 1985), alterando a homeostase cerebral. Assim, a glicemia

aporta o principal substrato energético do SNC (MCKENNA; HOPKINS; CAREY, 2001), mas em excesso, se torna tóxica.

O estado energético celular é monitorado pela AMPK, uma proteína cinase que atua como um sensor metabólico, detectando o estado de energia da célula (XIAO et al., 2007) e é ativada por fosforilação em resposta ao déficit de energia (KLEMAN et al., 2008), sendo altamente expressa no cérebro (TURNLEY et al., 1999). Tanokashira et al. (2018) demonstraram que o aumento nos níveis de fosforilação da AMPK por meio da administração crônica de metformina facilita a proliferação celular, a diferenciação neuronal e reduz a neuroinflamação relacionada ao diabetes no hipocampo, aumentando a neurogênese e melhorando as funções cognitivas. O grupo amino presente na estrutura química da metformina pode reagir com compostos dicarbonílicos, como MG formando um aduto de metformina-MG (triazepinona) e reduzindo a formação de AGES, que são altamente reativos e medeiam a toxicidade da glicose (RUGGIERO-LOPEZ et al., 1999). Já foi demonstrado que a subunidade  $\gamma$  da AMPK possui 3 resíduos de arginina (ADAMS, 2004), que podem ser um alvo para o MG. Assim, a metformina age sequestrando o MG altamente reativo, reduzindo seus adutos potencialmente prejudiciais e atenuando as complicações diabéticas (KINSKY et al., 2016).

No entanto, a hiperglicemia crônica induzida no presente estudo através da administração intraperitoneal de STZ em ratos Wistar adultos resultou em uma redução na ativação de AMPK no hipocampo desses animais, evidenciada pela relação AMPK<sub>p</sub>/AMPK, indicando uma desregulação da homeostase energética, o que poderia acarretar um cenário propício para o desenvolvimento da neurodegeneração. A ativação da AMPK pode ocorrer em resposta ao déficit energético, sendo regulada intimamente pelos nucleotídeos de adenina. A interação do AMP com o subunidade regulatória  $\gamma$  da AMPK pode inibir a desfosforilação da treonina 172 da AMPK por inibição de fosfatases (DAVIES et al., 1995). Em mamíferos o aumento dos níveis de cálcio ativam a proteína calmodulina que pode fosforilar o resíduo de treonina 172 na subunidade catalítica da AMPK, gerando sua ativação (HAWLEY et al., 2005). Ainda, a ação catalítica da LKB1 fosforila diretamente a AMPK no resíduo de treonina 172 na subunidade alfa catalítica (SHI et al., 2016; HAWLEY et al., 1995). No entanto, o conteúdo proteico hipocampal de LKB1 não foi alterado em ratos induzidos a hiperglicemia crônica desse presente estudo, indicando que o mecanismo de fosforilação por LKB1 da

AMPK não estava deficiente, visto que a LKB1 é constitutivamente ativa e medeia a maioria da ativação da AMPK em quase todos os tipos de tecidos (SHI et al., 2016). A ativação de AMPK ativa vias catabólicas (produtoras de ATP) e inibe vias anabólicas (consumidoras de ATP) após a detecção do aumento da relação AMP/ADP intracelular, o que indica um estresse energético (RAMAMURTHY et al., 2014), tornando a AMPK um fator essencial na regulação da plasticidade metabólica neuroenergética induzida em resposta à ativação sináptica, sendo que sua desregulação pode levar a prejuízos cognitivos (MARINANGELI et al., 2018). Huang et al (2015) demonstraram que a ausência de AMPK leva a desregulação de genes cuja expressão é promovida pela translocação do fator de transcrição CREB, resultando em redução nos níveis de BDNF em neurônios hipocámpais primários obtidos de camundongos e isso foi associado com comprometimento cognitivo. Ainda, Odaira et al. (2019) demonstraram que a ativação da AMPK produz efeitos antidepressivos em camundongos, que são mediados pela elevada neurogênese hipocámpal.

O cenário propício para o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas também pode ser agravado por alterações epigenéticas, que podem ser favorecidas pelo estado de hiperglicemia crônica e obesidade. Indivíduos afetados por doenças metabólicas crônicas podem apresentar padrões alterados de metilação do DNA e comprometimento da expressão de genes neuroprotetores, o que favorecerá neurotoxicidade e comprometimento cognitivo ou demência (SCHLENSOG et al., 2016; SMITH et al., 2016). Neste cenário, o nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que linfócitos de crianças obesas apresentaram maior metilação global de DNA acompanhado por uma menor expressão de REST. Além disso, demonstramos que a região promotora do gene REST no hipocampo estava hipermetilada em ratos Wistar hiperglicêmicos e isso foi acompanhado por um menor conteúdo de REST e BDNF (REMOR et al., 2018). O REST reprime a expressão de genes ligados à morte celular e aumenta a expressão de outros, como o CREB, que induzem a preservação da função cognitiva em neurônios adultos, assim como a inibição da produção de ERO, preservação da integridade, fisiologia e distribuição mitocondrial (SONG et al., 2016, 2017). Além disso, estudos clínicos demonstram que indivíduos obesos adultos também apresentam a região do gene BDNF metilada em células mononucleares do sangue periférico (HUANG et al., 2015).

O declínio cognitivo também parece estar associado ao comprometimento da homeostase energética por meio da deficiência da enzima CK (STÖCKLER-IPSIROGLU; MERCIMEK-MAHMUTOGLU; SALOMONS, 2012), que catalisa a transferência reversível

de um grupo fosfato do ATP para creatina, formando fosfocreatina (PCr) e adenosina difosfato (ADP), conferindo a ela um papel essencial no armazenamento, tamponamento e transporte de fosfatos de alta energia das mitocôndrias para os locais de baixa demanda energética (ZERVOU et al., 2017).

Gomez-Pinilla, Vaynman e Ying (2008) sugeriram que os mecanismos de homeostase energética gerenciados por CK-Mt e AMPK, objetivando o aumento da síntese de ATP, agem em conjunto com o BDNF para modular a aprendizagem e memória hipocampal. Além disso, estudos demonstraram que a deficiência da isoforma cerebral da CK, a CK-BB, pode afetar o hipocampo, resultando em comprometimento cognitivo (JOST et al., 2002), que pode ser agravado pela hiperglicemia crônica, como demonstrado por Ren et al. (2019) que evidenciaram a perda de neurônios hipocampais e declínio cognitivo em camundongos tratados com STZ.

Por outro lado, em condições de estresse energético com conseqüente redução nos níveis de ATP, a AMPK e a CK agem em conjunto visando reestabelecer a homeostase energética (RAMÍREZ RÍOS et al., 2014). Sabe-se que a diminuição de ATP neuronal é uma característica de doenças neurodegenerativas e a regeneração do ATP pode ocorrer em função da atividade da CK, enzima que desempenha um papel fisiológico fundamental nos tecidos de alta demanda metabólica, armazenando e transportando energia entre os locais de produção e consumo de ATP por ATPases (MEYER et al., 2006).

O sistema fosfocreatina/creatina cinase gerencia as demandas energéticas do SNC. Durante períodos de déficits de energia, a CK converte fosfocreatina em creatina e ATP para fornecer um efeito protetor aos tecidos circundantes. Além disso, um aumento nos níveis de creatina pode auxiliar na manutenção do status energético hipocampal (DEWAN et al., 2019). No entanto, o conteúdo proteico das isoformas da CK, CK-BB e CK-MM, não foi alterado no hipocampo de ratos hiperglicêmicos nesse presente estudo, assim como a atividade da CK, resultado semelhante à Ceretta et al. (2010), que também observaram que a hiperglicemia não alterou a atividade da CK no hipocampo de ratos. Esses resultados indicam que o metabolismo energético hipocampal pode ser comprometido tanto pela menor ativação da AMPK quanto pela não alteração nos níveis de CK, mesmo em condição de déficit energético causado pela hiperglicemia, sugerindo que não houve um processo de adaptação metabólica para compensar esse déficit, visto que o aumento da CK também pode estar relacionado à

disfunção mitocondrial, situação em que a produção de ATP diminuiu e a CK no citoplasma age como um mecanismo compensatório, tentando aumentar os níveis de ATP (XU et al., 2019), o que a torna essencial no metabolismo energético do SNC, mas pode ser um dos alvos para ERO (AMIN; KAMEL; ABD ELTAWAB, 2011).

A hiperglicemia pode aumentar drasticamente a produção de ERO por inibir a função mitocondrial em resposta ao aumento da via de poliol, das hexosaminas, da formação de AGEs e da ativação do PKC (para uma revisão ver [BROWNLEE, 2005]), além de acelerar a inflamação hipocampal, podendo favorecer o comprometimento cognitivo (LI et al., 2019;). O excesso de ERO contribui para a degeneração neuronal e axonal por meio da disfunção mitocondrial, sendo que sua produção é predominante nos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons e deficiências nesses complexos estão associadas a alterações na síntese de ATP (TALLA et al., 2015).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram em cérebro de ratos com hiperglicemia crônica induzida por STZ uma redução da atividade dos complexos da cadeia respiratória e o desenvolvimento de declínio cognitivo avaliado por meio do teste de esQUIVA inibitória (REMOR et al., 2018). Além disso, nesse presente estudo demonstramos a consequência de um meio com altas concentrações de glicose sobre células nervosas, neurônios hipocampais da linhagem H19-7 apresentaram síntese de ATP comprometida e síntese de ERO estimulada pelo tratamento, indicando disfunção mitocondrial e um cenário propício para o desenvolvimento de neurodegeneração.

Outros trabalhos prévios do nosso grupo apresentados aqui demonstraram um aumento da massa mitocondrial em astrócitos da linhagem C6 após tratamento com glicose e também um aumento no acúmulo de MG e de proteínas oxidadas por MG (AGEs) (LUCREDI, 2019), um dicarbonil altamente reativo que forma adutos com resíduos de cisteína, lisina e arginina de proteínas, podendo levar degradação fisiológica, inativação de enzimas e desnaturação protéica (LO et al., 1994; PAPOULIS; AL-ABED; BUCALA, 1995; WESTWOOD; MCLELLAN; THORNALLEY, 1994). Resultados de acordo com McLeillan et al. (1994), que demonstraram através de um estudo clínico que as concentrações plasmáticas de MG são 3-6 vezes maior em pacientes diabéticos. Além disso, Edwards et al. (2010) demonstraram que durante hiperglicemia de curto prazo ocorre biogênese incompleta e superatividade da fissão mitocondrial em neurônios, mas a longo prazo o acúmulo de ERO favorece a fissão mitocondrial e resulta em mitocôndrias disfuncionais e capacidade



respiratória reduzida, apesar de, em número, as mitocôndrias estarem aumentadas (EDWARDS et al., 2010), o que pode favorecer a neurodegeneração, comprometendo a memória.

A disfunção mitocondrial é um fator crucial para danos neuronais que contribuem para o declínio cognitivo (OSORIO-PAZ et al., 2018). Estudos demonstraram que o diabetes prejudica a estrutura e a função sináptica no hipocampo (BAPTISTA et al., 2013; GASPAR et al., 2010; GRILLO et al., 2005). Além disso, o desenvolvimento de neurodegeneração também está associado à dinâmica mitocondrial, um processo essencial para a morte ou sobrevivência das células (CHUANG et al., 2019; LEINNINGER et al., 2006).

Outro fator associado à neurodegeneração é a autofagia, disfunções nesse processo têm sido implicadas na patogênese de doenças neurodegenerativas, como o Parkinson (DEHAY et al., 2010). A autofagia é uma via de degradação crítica para a renovação de organelas disfuncionais ou proteínas danificadas ao lisossomo para manter a homeostase metabólica celular (para uma revisão ver [DUNN, 1994]). A formação do autofagossomo em resposta ao estresse celular ocorre devido a proteínas como o LC3B, que desempenha um papel fundamental na formação dos vacúolos autofágicos (KABEYA, 2000).

Nesse presente estudo foi demonstrado que células astrocíticas C6 expostas ao derivado da glicose, o metilglicoxal, não alteraram o conteúdo de LC3B, indicando que a mitofagia basal não foi estimulada e, mesmo estando disfuncionais, as mitocôndrias estavam sendo mantidas no tecido, sugerindo um aumento da vulnerabilidade para o desenvolvimento de neurodegeneração, visto que a mitofagia gera efeitos neuroprotetores contra lesões neuronais hipocámpais induzidas por diabetes e também comprometimento cognitivo, sendo estimulada pelo aumento da ativação de AMPK (KONG et al., 2018).

Ainda, o exercício físico tem sido proposto como intervenção não farmacológica para prevenir o desenvolvimento de muitas doenças com progressão crônica, incluindo o declínio cognitivo (GRONWALD et al., 2019). No entanto, uma recente meta-análise de Sanders et al. (2019), demonstrou a carência de estudos em diferentes intensidades e das relações dose-resposta de exercício físico que levariam a resultados benéficos na cognição (SANDERS et al., 2019). Porém, a literatura demonstra uma íntima relação do exercício físico no aumento da atividade do BDNF através de alterações epigenéticas (COTMAN;

BERCHTOLD; CHRISTIE, 2007; ERICKSON, 2014; RIDLER, 2018; SLEIMAN et al., 2016).

Estudos em roedores conduzidos por Creer et al. (2010) e Van Praag et al. (2005) sugerem que alterações epigenéticas são associadas com proliferação celular na região do hipocampo. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o modelo de exercício físico voluntário pode aumentar a expressão de BDNF concomitante ao aumento da expressão de REST no hipocampo de ratos (DALLAGNOL et al., 2017). Ainda, Ashton et al. (2017) sugeriram uma possível associação entre os níveis plasmáticos de REST com neurodegeneração e risco de DA em humanos.

Embora o impacto negativo das doenças metabólicas na cognição tenha sido investigado extensivamente em humanos e animais experimentais, sua prevenção ou tratamento está longe de ser bem-sucedida. Sabe-se que a obesidade regula negativamente a expressão do BDNF hipocampal (BUCHMAN et al., 2016; SHARMA; TALIYAN; RAMAGIRI, 2015), e o baixo conteúdo sanguíneo e cerebral de BDNF foi observado em indivíduos obesos e modelos animais com comprometimento cognitivo (BUCHMAN et al., 2016). O exercício físico pode potencialmente reverter ou impedir alterações epigenéticas, no entanto, a compreensão do remodelamento da cromatina induzida por essa intervenção livre de drogas no comprometimento cognitivo orientado pela obesidade não foi extensamente elucidada ou confirmada.

Uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no aumento da cognição induzida pelo exercício, em particular aqueles relacionados a alterações epigenéticas reversíveis, permitirá a prescrição de protocolos de exercícios apropriados, o que acabará por resultar em melhores resultados cognitivos. Além disso, o REST pode ser um potencial biomarcador de declínio cognitivo.

## 9 CONCLUSÃO

Em ratos tratados com STZ foi observado uma relação de AMPK-p/AMPK diminuída e isso sugere que a desregulação metabólica presente na obesidade e/ou DM pode comprometer a atividade do principal regulador energético, a AMPK, acometendo a homeostase celular do hipocampo e provocando prejuízos na fisiologia mitocondrial que resultaria em declínio cognitivo e predisposição à neurodegeneração, como previamente demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa.

## 10 PERSPECTIVAS

O MG reage de forma não enzimática com resíduos de arginina, lisina e cisteína de proteínas intracelulares formando os produtos de glicação avançada (AGEs) (AHMED et al., 1997). A subunidade regulatória  $\gamma$  da AMPK possui 3 resíduos de arginina que são sensíveis a ação do MG (GUGLIUCCI, 2009). Dessa forma, o MG reage com resíduos de arginina para formação das bases de Schiff. Uma vez a subunidade  $\gamma$  estando oxidada, pode perder a capacidade de ativar a AMPK, prejudicando a homeostase energética. Para verificar essa hipótese, será analisado o conteúdo de bases de Schiff na proteína AMPK purificada do hipocampo de animais diabéticos, através do anti-corpo específico.

## 11 REFERÊNCIAS

- ADA, A. A. D. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2019. **Diabetes Care**, v. 42, p. 513–528, 2019.
- ADAMS, J. Intracellular control of AMPK via the  $\gamma$  subunit AMP allosteric regulatory site. **Protein Science**, v.13, p. 155-165, jan, 2004.
- AHMED, A. et al. Time-dependent impairments in learning and memory in Streptozotocin-induced hyperglycemic rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 3, p. 123–132, 2019.
- AHMED, M. U. et al. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. **The Biochemical Journal**, v. 324 ( Pt 2, p. 565–70, 1 jun. 1997.
- ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. **The molecular hallmarks of epigenetic control. Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 487-500, 2016.
- AMIN, K. A.; KAMEL, H. H.; ABD ELTAWAB, M. A. The relation of high fat diet, metabolic disturbances and brain oxidative dysfunction: modulation by hydroxy citric acid. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 74, 2011.
- ARNOLD, S. E. et al. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. **Neurobiology of Disease**, v. 67, p. 79–87, jul. 2014.
- ASHTON, N. J. et al. Plasma REST: a novel candidate biomarker of Alzheimer’s disease is modified by psychological intervention in an at-risk population. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 6, p. e1148–e1148, 6 jun. 2017.
- BAPTISTA, F. I. et al. Diabetes Alters KIF1A and KIF5B Motor Proteins in the Hippocampus. **PLoS ONE**, v. 8, e65515, 2013.
- BARROS, L. et al. **Epigenetic modifications induced by exercise: Drug-free intervention to improve cognitive deficits associated with obesity. Physiology and Behavior**, v. 204, p. 309-323, 2019.
- BLISS, T. V. P.; GARDNER-MEDWIN, A. R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, v. 232, p. 357-74, 1973.

- BORCHEL, A. et al. Creatine metabolism differs between mammals and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **SpringerPlus**, v. 3, p. 510, 2014.
- BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615 LP – 1625, 2005.
- BUCHMAN, A. S. et al. Higher brain BDNF gene expression is associated with slower cognitive decline in older adults. **Neurology**, v. 86, n. 8, p. 735–741, 23 fev. 2016.
- CABERLOTTO, L. et al. The central role of AMP-kinase and energy homeostasis impairment in Alzheimer's disease: A multifactor network analysis. **PLoS ONE**, v. 8, e78919, 2013.
- CAI, Z. et al. **Roles of AMP-activated protein kinase in Alzheimer's disease.** **NeuroMolecular Medicine**, v. 14, p. 1-14, mar. 2012.
- CANTÓ, C. et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. **Nature**, v. 458, p. 1056-60, abr. 2009.
- CASAS-AGUSTENCH, P. et al. Saturated Fat Intake Modulates the Association between an Obesity Genetic Risk Score and Body Mass Index in Two US Populations. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 114, p. 1954-66, dec. 2014.
- CERETTA, L. B. et al. Brain energy metabolism parameters in an animal model of diabetes. **Metabolic Brain Disease**, v.3, p.121-131, 2010.
- CHAIT, A.; IVERIUS, P. H.; BRUNZELL, J. D. Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 69, p. 490-493, feb. 1982.
- CHEN, B. S.; WU, S. N. Functional role of the activity of ATP-sensitive potassium channels in electrical behavior of hippocampal neurons: Experimental and theoretical studies. **Journal of Theoretical Biology**, v. 272, p. 16-25, mar. 2011.
- CHENG, R.-X. et al. The role of Na<sup>v</sup> 1.7 and methylglyoxal-mediated activation of TRPA1 in itch and hypoalgesia in a murine model of type 1 diabetes. **Theranostics**, v. 9, p. 4287-4307, 2019.
- CHUANG, Y.-C. et al. Resveratrol Promotes Mitochondrial Biogenesis and Protects against Seizure-Induced Neuronal Cell Damage in the Hippocampus Following Status Epilepticus by Activation of the PGC-1 $\alpha$  Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 998, 25 fev. 2019.
- CHUANG, Y. F. et al. Midlife adiposity predicts earlier onset of Alzheimer's dementia,

- neuropathology and presymptomatic cerebral amyloid accumulation. **Molecular Psychiatry**, v. 21, p. 910-5, jul. 2016.
- CHUN, H. J. et al. Methylglyoxal Causes Cell Death in Neural Progenitor Cells and Impairs Adult Hippocampal Neurogenesis. **Neurotoxicity Research**, v. 29, n. 3, p. 419–431, 2016.
- CICCARONE, F. et al. **DNA methylation dynamics in aging: how far are we from understanding the mechanisms?** **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 174, p. 3-17, sep. 2018.
- CLERK, L. H.; RATTIGAN, S.; CLARK, M. G. Lipid infusion impairs physiologic insulin-mediated capillary recruitment and muscle glucose uptake in vivo. **Diabetes**, v. 51, p. 1138-45, apr. 2002.
- COLDITZ, G. A. et al. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. **Annals of Internal Medicine**, v. 122, p. 481-6, apr. 1995.
- COPE, E. C. et al. Microglia Play an Active Role in Obesity-Associated Cognitive Decline. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, p. 8889-8904, october 2018.
- COSTA, A. et al. Brain-derived neurotrophic factor serum levels correlate with cognitive performance in Parkinson's disease patients with mild cognitive impairment. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 9, n. September, p. 253, 2015.
- 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.
- CRANE, P. K. et al. Glucose Levels and Risk of Dementia. **New England Journal of Medicine**, v. 369, p. 540-548, august 2013.
- CREER, D. J. et al. Running enhances spatial pattern separation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 5, p. 2367–2372, 2 fev. 2010.
- CRESPO, C. J. et al. Television Watching, Energy Intake, and Obesity in US Children. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 155, p. 360-365, mar. 2001.
- DALLAGNOL, K. M. C. et al. Running for REST: Physical activity attenuates neuroinflammation in the hippocampus of aged mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 61, p. 31–35, 2017.
- DAVIDSON, T. L. et al. The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. **Physiology and Behavior**, v. 107, p. 26-33, aug. 2012.

- DAVIES, S. P. et al. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C $\alpha$  and native bovine protein phosphatase-2Ac. **FEBS Letters**, v. 377, p. 421-5, dec. 1995.
- DE PAUL, A. L. et al. Heterogeneity of pituitary lactotrophs: Immunocytochemical identification of functional subtypes. **Acta Histochemica**, v. 99, p. 277-289, august 1997.
- DEHAY, B. et al. Pathogenic Lysosomal Depletion in Parkinson's Disease. **Journal of Neuroscience**, v. 30, p. 12535-44, sep. 2010.
- DEWAN, N. et al. Exposure to recurrent hypoglycemia alters hippocampal metabolism in treated streptozotocin-induced diabetic rats. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, n. March, p. cns.13186, 7 jul. 2019.
- DHLIWAYO, N. et al. Parp inhibition prevents ten-eleven translocase enzyme activation and hyperglycemia-induced DNA demethylation. **Diabetes**, v. 63, p. 3069-76, sep. 2014.
- DOBROVOLSKIENE, R. et al. The risk of early cardiovascular disease in Lithuanian diabetic children and adolescents: A type 1 diabetes register database based study. **Diabetes Research & Clinical Practice**, v. 100, n. 1, p. 119- 125, apr. 2013.
- DOS SANTOS, A. Q. et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 453, p. 161-7, sep. 2006.
- DRESNER, A. et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, p. 253-9, jan 1999.
- DUNN, W. A. **Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation** **Trends in Cell Biology**, v. 4, p. 139-143, april 1994.
- EDWARDS, J. L. et al. Diabetes regulates mitochondrial biogenesis and fission in mouse neurons. **Diabetologia**, v. 53, p. 160-9, jan. 2010.
- ERICKSON, I. K. ET AL. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 9, n. 4, p. 500–504, 2014.
- FALONE, S. et al. Long term running biphasically improves methylglyoxal-related metabolism, redox homeostasis and neurotrophic support within adult mouse brain cortex.

**PLoS ONE**, v. 7, e31401, february 2012.

FAN, W. et al. ERR $\gamma$  promotes angiogenesis, mitochondrial biogenesis and oxidative remodeling in PGC1 $\alpha/\beta$ -deficient muscle. **Cell Reports**, v. 22, p. 2521–2529, 2018.

FRANCKHAUSER, S. et al. Increased Fatty Acid Re-esterification by PEPCK Overexpression in Adipose Tissue Leads to Obesity Without Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 51, n. 3, p. 624–630, 1 mar. 2002.

GASPAR, J. M. et al. Diabetes differentially affects the content of exocytotic proteins in hippocampal and retinal nerve terminals. **Neuroscience**, v. 169, n. 4, p. 1589–1600, set. 2010.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 2, p. 94–108, fev. 2009.

GNAD, T. et al. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. **Nature**, v. 516, p. 395-9, dec. 2014.

GNAIGER, E. **Bioenergetics at low oxygen: Dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply**. *Respiration Physiology*, v. 128, p. 277-297, jul. 2001.

GOROSPE, E. C.; DAVE, J. K. **The risk of dementia with increased body mass index**. **Age and Ageing**, v.36, p. 23-29, jan. 2007.

GOWANS, G. J. et al. AMP is a true physiological regulator of amp-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. **Cell Metabolism**, v. 18, p. 556-66, oct. 2013.

GRAVES, J. A. et al. Mitochondrial structure, function and dynamics are temporally controlled by c-Myc. **PLoS ONE**, v. 7, e37699, may 2012.

GRAY, J. et al. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. **Diabetes**, v. 55, n. 12, p. 3366–3371, 2006.

GREER, E. L. et al. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 30107-19, oct. 2007.

GRILLO, C. A. et al. Immunocytochemical analysis of synaptic proteins provides new insights into diabetes-mediated plasticity in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 136, p. 477-86, oct. 2005.

GRILLO, C. A. et al. Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic



plasticity. **Diabetes**, v. 64, p. 3927-36, nov. 2015.

GRONWALD, T. et al. **Standardization of exercise intensity and consideration of a dose-response is essential. Commentary on “Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer’s models,” by Lourenco et al., published 2019 in Nature Medicine Journal of Sport and Health Science**, v. 8, p. 353-354, march 2019.

GUGLIUCCI, A. “Blinding” of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: A mechanism that allows perpetuation of hepatic insulin resistance? **Medical Hypotheses**, v. 73, p. 921-924, december 2009.

GUILHERME, A. et al. **Molecular pathways linking adipose innervation to insulin action in obesity and diabetes mellitus. Nature Reviews Endocrinology**, v.15, p. 207-225, feb. 2019.

GUIMARÃES, E. L. M. et al. Advanced glycation end products induce production of reactive oxygen species via the activation of NADPH oxidase in murine hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 52, n. 3, p. 389–397, mar. 2010.

GUNSTAD, J. et al. Obesity is associated with memory deficits in young and middle-aged adults. **Eating and Weight Disorders**, v. 11, e15-9, mar. 2006.

GUO, J. U. et al. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. **Nature Neuroscience**, v. 14, p. 1345-1351, august 2011.

HAGHIGHAT, N.; MCCANDLESS, D. W.; GERAMINEGAD, P. Responses in primary astrocytes and C6-Glioma cells to ammonium chloride and dibutyryl cyclic-AMP. **Neurochemical Research**, v. 25, p. 277-84, march 2000.

HAGHIGHAT, N.; MCCANDLESS, D. W.; GERAMINEJAD, P. Effect of alcohol on energy storage of primary astrocytes and C6-glioma cells in vitro. **Metabolic Brain Disease**, v. 14, p. 149-156, september 1999.

HALAAS, J. L. et al. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 16, p. 8878–8883, 5 ago. 1997.

HAN, Y. et al. Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 305, p. 123-31, nov. 2007.

- HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. **AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 251-62, mar. 2012.
- HASSENSTAB, J. J. et al. Metabolic Syndrome Is Associated with Learning and Recall Impairment in Middle Age. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 29, n. 4, p. 356–362, 2010.
- HAWLEY, S. A. et al. 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 27186–27191, 1995.
- HAWLEY, S. A. et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. **J Biol**, v. 2, n. 4, p. 28, 2003.
- HE, F. et al. Association between DNA methylation in obesity-related genes and body mass index percentile in adolescents. **Scientific Reports**, v. 9, e2079, february 2019.
- HEINONEN, S. et al. Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity. **Diabetes**, v. 64, p. 315-45, sep. 2015.
- HERNÁNDEZ-FONSECA, J. P. et al. Structural and Ultrastructural Analysis of Cerebral Cortex, Cerebellum, and Hypothalamus from Diabetic Rats. **Experimental Diabetes Research**, v. 2009, ID 329632, july 2009.
- HERZIG, S.; SHAW, R. J. **AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 121-135, feb. 2018.
- HOWSON, J. M. M. et al. Genetic analysis of adult-onset autoimmune diabetes. **Diabetes**, v.60, p.2645-2663, 2011.
- HUANG, J. et al. Exercise activates lysosomal function in the brain through AMPK-SIRT1-TFEB pathway. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 796–807, 12 jun. 2019.
- HUANG, Y.-T. et al. Epigenetic Patterns in Successful Weight Loss Maintainers: A Pilot Study. **Int J Obes (Lond)**, v. 39, p. 865-868, may 2015a.
- HUANG, Y. T. et al. Epigenetic patterns in successful weight loss maintainers: A pilot study. **International Journal of Obesity**, 2015b.
- HUGHES, B. P. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in

- comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. **Clinica Chimica Acta**, v. 7, n. 5, p. 597–603, set. 1962.
- HUNTER, D. Active ageing. **Perspectives in public health**, v. 131, n. 3, p. 106–107, 2011.
- HWANG, J. J. et al. Blunted rise in brain glucose levels during hyperglycemia in adults with obesity and T2DM. **JCI Insight**, v. 2, e95913, oct. 2017.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **ATLAS IDF 2017**. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2018/poster-atlas-idf-2017.pdf>>. Acesso em: 6 jul. 2019.
- IZQUIERDO, I. et al. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, p. 115–127, mar. 2008.
- JEONG, S. K. et al. Interactive effect of obesity indexes on cognition. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 19, p. 91-96, february 2005.
- JOST, C. R. et al. Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 1692-706, may 2002.
- JU, T. C. et al. Nuclear translocation of AMPK- $\alpha$ 1 potentiates striatal neurodegeneration in Huntington's disease. **Journal of Cell Biology**, v. 194, p. 209-27, july 2011.
- KABEYA, Y. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 5720-5728, nov. 2000.
- KINSKY, O. R. et al. Metformin Scavenges Methylglyoxal to Form a Novel Imidazolinone Metabolite in Humans. **Chemical Research in Toxicology**, v. 29, p. 227-34, feb. 2016.
- KLEMAN, A. M. et al. Physiological glucose is critical for optimized neuronal viability and AMPK responsiveness in vitro. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 167, n. 2, p. 292–301, jan. 2008.
- KOBOROVÁ, I. et al. Association between metabolically healthy central obesity in women and levels of soluble receptor for advanced glycation end products, soluble vascular adhesion protein-1, and activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase. **Croatian Medical Journal**, v. 58, p. 106-116, apr. 2017.
- KOLD-CHRISTENSEN, R. et al. ReactELISA method for quantifying methylglyoxal levels in plasma and cell cultures. **Redox Biology**, v. 26, e101252, june 2019.

- KONG, F.-J. et al. Liraglutide ameliorates cognitive decline by promoting autophagy via the AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway in a streptozotocin-induced mouse model of diabetes. **Neuropharmacology**, v. 131, p. 316–325, 2018.
- KOOP, D.R., J.P. (1985). Identification of ethanol- inducible P-450 isozyme 3a as the acetone and acetol monooxygenase of rabbit microsomes. *J Biol Chem* 260, 13607- 13612.
- KOU, X.; CHEN, D.; CHEN, N. Physical activity alleviates cognitive dysfunction of alzheimer’s disease through regulating the mtor signaling pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, e1591, march 2019.
- KUEHNEN, P. et al. An alu element-associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity. **PLoS Genetics**, v. 8, e1002543, march 2012.
- LAMANNA, J. C.; HARIK, S. I. Regional comparisons of brain glucose influx. **Brain Research**, v. 326, p. 299-305, feb. 1985.
- LAZZARINO, G. P. et al. Cafeteria diet differentially alters the expression of feeding-related genes through DNA methylation mechanisms in individual hypothalamic nuclei. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 450, p. 113-125, july 2017.
- LEHR, S. et al. Identification and Validation of Novel Adipokines Released from Primary Human Adipocytes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, e010504, jan. 2012.
- LEINNINGER, G. M. et al. Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. **Neurobiology of Disease**, v. 23, p. 11-22, july 2006.
- LI, J. et al. Mechanisms of Aerobic Exercise Upregulating the Expression of Hippocampal Synaptic Plasticity-Associated Proteins in Diabetic Rats. **Neural Plasticity**, v. 2019, e7920540, february 2019.
- LI, W. et al. Hyperglycemia Alters Astrocyte Metabolism and Inhibits Astrocyte Proliferation. **Aging and Disease**, v. 9, n. 4, p. 674, 2018.
- LIPMAN, I. J.; BOYKIN, M. E.; FLORA, R. E. Glucose intolerance in parkinson’s disease. **Journal of Chronic Diseases**, v. 27, n. 11–12, p. 573–579, 1974.
- LIPMAN, I. J.; BOYKIN, M. E.; FLORA, R. E. Glucose intolerance in parkinson’s disease. **Journal of Chronic Diseases**, v. 27, n. 11, p. 573–579, 2016.
- LO, T. et al. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-. **Journal of Biological Chemistry**, v. 51, p. 32299–32305, 1994.

- LOPES, M. W. et al. Time-Dependent Modulation of Mitogen Activated Protein Kinases and AKT in Rat Hippocampus and Cortex in the Pilocarpine Model of Epilepsy. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 9, p. 1868–1878, 22 set. 2012.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.
- LU, T. et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. **Nature**, v. 507, n. 7493, p. 448–454, 19 mar. 2014.
- LUCREDI, N. C. **Efeito de altas concentrações de glicose e seus derivados sobre a função mitocondrial em astrócitos**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.
- LUGLI, E. et al. Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. **Cytometry Part A**, v. 68, p. 28-35, nov. 2005.
- MAŁECKI, M.; SKUPIEŃ, J. **Problems in differential diagnosis of diabetes types**. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 118, p. 435-40, jul-aug. 2008.
- MARINANGELI, C. et al. AMP-Activated Protein Kinase Is Essential for the Maintenance of Energy Levels during Synaptic Activation. **iScience**, v. 9, p. 1-13, nov. 2018.
- MARTINA, J. A. et al. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. **Autophagy**, v. 8, n. 6, p. 903–914, 23 jun. 2012.
- MASLIAH, E. et al. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: Identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. **Epigenetics**, v. 8, n. 10, p. 1030–1038, 2013.
- MCKENNA, M. C.; HOPKINS, I. B.; CAREY, A.  **$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate decreases both glucose and lactate metabolism in neurons and astrocytes: Implications for lactate as an energy substrate for neurons**. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, p. 747-54, dec. 2001.
- MEYER, L. E. et al. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: Antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 37361-71, dec. 2006.
- MOAZED, D. **Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence** **Nature**, v. 457, p.413-420, 2009.
- MOORE, F. et al. PTPN2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Interferon- $\gamma$ -Induced Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis. **Diabetes**, v. 58, n. 6, p. 1283–1291, 1 jun. 2009.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6th. ed. New York: [s.n.].
- NOEMAN, S. A.; HAMOODA, H. E.; BAALASH, A. A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 3:17, august 2011.
- ODAIRA, T. et al. Mechanisms underpinning AMP-activated protein kinase-related effects on behavior and hippocampal neurogenesis in an animal model of depression. **Neuropharmacology**, v. 150, p. 121–133, maio 2019.
- OLSEN, N. J. et al. Interactions between genetic variants associated with adiposity traits and soft drinks in relation to longitudinal changes in body weight and waist circumference. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, p. 816-26, sep. 2016.
- OSORIO-PAZ, I. et al. Mitochondrial activity in different regions of the brain at the onset of streptozotocin-induced diabetes in rats. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 871–879, 7 out. 2018.
- OTT, A. et al. Association of diabetes mellitus and dementia: The Rotterdam Study. **Diabetologia**, v. 39, n. 11, p. 1392–1397, 23 out. 1996.
- PALACIOS, N. et al. Obesity, diabetes, and risk of Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 26, n. 12, p. 2253–9, 2011.
- PAPOULIS, A.; AL-ABED, Y.; BUCALA, R. Identification of N2-(1-carboxyethyl)guanine (CEG) as a guanine advanced glycosylation end product. **Biochemistry**, v. 34, p. 648-655, january 1995.
- PARK, H. S.; CHO, H. S.; KIM, T. W. Physical exercise promotes memory capability by enhancing hippocampal mitochondrial functions and inhibiting apoptosis in obesity-induced insulin resistance by high fat diet. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, p. 283-292, feb. 2018.
- PEILA, R.; RODRIGUEZ, B. L.; LAUNER, L. J. Type 2 Diabetes, APOE Gene, and the Risk for Dementia and Related Pathologies. **Diabetes**, v. 51, n. April, p. 1256–1262, 2002.
- PERRY, R. J. et al. Hepatic Acetyl CoA Links Adipose Tissue Inflammation to Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Cell**, v. 160, n. 4, p. 745–758, feb. 2015.
- PETER, A. et al. Individual stearoyl-CoA desaturase 1 expression modulates endoplasmic reticulum stress and inflammation in human myotubes and is associated with skeletal muscle lipid storage and insulin sensitivity in vivo. **Diabetes**, v. 58, p. 1757-65, aug. 2009.

- PHILLIPS, S. A.; THORNALLEY, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates: Investigation using a specific assay for methylglyoxal. **European Journal of Biochemistry**, v.3, p.12-19, 1993.
- PITKÄNEN, S.; ROBINSON, B. H. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, p. 345-51, july 1996.
- PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. **Journal of Physiology**, v. 587, p. 4963-76, oct. 2009.
- PRESSLEY, J. C. et al. The impact of comorbid disease and injuries on resource use and expenditures in parkinsonism. **Neurology**, v. 60, n. 1, p. 87–93, 2003.
- PROFENNO, L. A.; PORSTEINSSON, A. P.; FARAONE, S. V. Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 6, p. 505–512, 2010.
- POMPLIANO, D. L.; PEYMAN, A.; KNOWLES, J. R. Stabilization of a Reaction Intermediate as a Catalytic Device: Definition of the Functional Role of the Flexible Loop in Triosephosphate Isomerase. **Biochemistry**, v.5, p.231-239, 1990.
- QI, Q. et al. Television watching, leisure time physical activity, and the genetic predisposition in relation to body mass index in women and men. **Circulation**, v. 126, p. 1821-7, oct. 2012.
- QI, Q. et al. Sugar-Sweetened Beverages and Genetic Risk of Obesity. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 68, n. 3, p. 211–213, mar. 2013.
- RAMAMURTHY, S. et al. AMPK activation regulates neuronal structure in developing hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 259, p. 13–24, fev. 2014.
- RAMÍREZ RÍOS, S. et al. Regulation of brain-type creatine kinase by AMP-activated protein kinase: Interaction, phosphorylation and ER localization. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1837, p. 1271-1283, august 2014.
- REMOR, A. P. et al. Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: Involvement of advanced glycosylated end products. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1812, p. 1460-71, nov. 2011.
- REMOR, A. P. et al. Chronic Metabolic Derangement-Induced Cognitive Deficits and

- Neurotoxicity Are Associated with REST Inactivation. **Molecular Neurobiology**, v. 56, p. 1539-1557, march 2019.
- REN, T. et al. Chronic oleoylethanolamide treatment attenuates diabetes-induced mice encephalopathy by triggering peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the hippocampus. **Neurochemistry International**, v. 129, n. July, p. 104501, out. 2019.
- RIDLER, C. Exercise wards off Alzheimer disease by boosting neurogenesis and neuroprotective factors. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 11, p. 632–632, 2018.
- RINN, J. L.; CHANG, H. Y. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p.145-66, 2012.
- ROMIEU, I. et al. Energy balance and obesity: what are the main drivers? **Cancer Causes and Control**, v. 28, n. 3, p. 247–258, 2017.
- RUDERMAN, N. B. et al. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 7, p. 2764–2772, 2013.
- RUGGIERO-LOPEZ, D. et al. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 1765-73, dec 1999.
- RYAN, J. P.; FINE, D. F.; ROSANO, C. Type 2 diabetes and cognitive impairment: contributions from neuroimaging. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v. 27, n. 1, p. 47–55, 2014.
- SAKS, V. et al. The Creatine Kinase Phosphotransfer Network: Thermodynamic and Kinetic Considerations, the Impact of the Mitochondrial Outer Membrane and Modelling Approaches. **Subcellular Biochemistry**, v. 46, p. 27-65, 2007.
- SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K. **AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. Ageing Research Reviews**, v. 11, p. 230-41, apr. 2012.
- SANDERS, L. M. J. et al. Dose-response relationship between exercise and cognitive function in older adults with and without cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0210036, 10 jan. 2019.
- SAWAN, C. et al. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutation research**, v. 642, n. 1–2, p. 1–13, jul. 2008.
- SBD. **Diretrizes SBD 2015-2016**. [s.l: s.n.].
- SCHERER, P. E. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in



- adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26746-9, nov. 1995.
- SCHLATTNER, U. et al. Cellular compartmentation of energy metabolism: creatine kinase microcompartments and recruitment of B-type creatine kinase to specific subcellular sites. **Amino Acids**, v. 48, n. 8, p. 1751–1774, 2016.
- SCHLATTNER, U.; TOKARSKA-SCHLATTNER, M.; WALLIMANN, T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1762, n. 2, p. 164–180, fev. 2006.
- SCHLENSOG, M. et al. Epigenetic loss of putative tumor suppressor SFRP3 correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients. **Epigenetics**, v. 13, p. 214-227, apr. 2018.
- SEVUSH, S. et al. A three-factor model of cognition in Alzheimer disease. **Cognitive and behavioral neurology: official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology**, v. 16, n. 2, p. 110–117, 2003.
- SHARMA, S.; TALIAN, R.; RAMAGIRI, S. Histone Deacetylase Inhibitor , Trichostatin A , Improves Learning and Memory in High-Fat Diet-Induced Cognitive Deficits in Mice. p. 1–11, 2015.
- SHENG, Z. et al. Capability of polygonum cuspidatum extract in inhibiting AGEs and preventing diabetes. **Food Science & Nutrition**, p. fsn3.1029, maio 2019.
- SHI, X. X. et al. Xylazine activates adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway in the central nervous system of rats. **PLoS ONE**, v. 11, e0153169, april 2016.
- SHIN, J. et al. SDF-1 Is an Autocrine Insulin-Desensitizing Factor in Adipocytes. **Diabetes**, v. 67, n. 6, p. 1068–1078, jun. 2018.
- SLEIMAN, S. F. et al. Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body  $\beta$ - hydroxybutyrate. **Elife**, v. 5, e15092, jun. 2016.
- SMITH, A. R. et al. Increased DNA methylation near TREM2 is consistently seen in the superior temporal gyrus in Alzheimer’s disease brain. **Neurobiology of Aging**, v. 47, p. 35-40, nov. 2016.
- SONG, Z. et al. REST alleviates neurotoxic prion peptide-induced synaptic abnormalities, neurofibrillary degeneration and neuronal death partially *via* LRP6-mediated Wnt-B-catenin signaling. **Oncotarget**, v. 7, p. 12035-12052, mar. 2016.
- SONG, Z. et al. Downregulation of the Repressor Element 1-Silencing Transcription Factor

- (REST) Is Associated with Akt-mTOR and Wnt- $\beta$ -Catenin Signaling in Prion Diseases Models. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, 3 maio 2017.
- SPELIOTES, E. K. et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. **Nature Genetics**, v. 42, p. 937-48, nov. 2010.
- SPINELLI, M. et al. Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GluA1 palmitoylation through Fox O3a. **Nature Communications**, v. 8, e2009, dec. 2017.
- STÖCKLER-IPSIROGLU, S.; MERCIMEK-MAHMUTOGLU, S.; SALOMONS, G. S. Creatine Deficiency Syndromes. **Inborn Metabolic Diseases**, Springer Link, p. 239–247, 2012.
- STRANAHAN, A. M. et al. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. **Nature Neuroscience**, v. 11, p. 309-17, mar. 2008a.
- STRANAHAN, A. M. et al. Accelerated cognitive aging in diabetic rats is prevented by lowering corticosterone levels. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, p. 479-83, sep. 2008b.
- SWINBURN, B. A. et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. **The Lancet**, v. 378, n. 9793, p. 804–814, ago. 2011.
- TALLA, V. et al. Complex I subunit gene therapy with NDUFA6 ameliorates neurodegeneration in EAE. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 56, p. 1129-1140, feb. 2015.
- TANOKASHIRA, D. et al. Metformin treatment ameliorates diabetes-associated decline in hippocampal neurogenesis and memory via phosphorylation of insulin receptor substrate 1. **FEBS Open Bio**, v.23, p.212-220, 2018.
- THIELEN, J. et al. Higher GABA concentration in the medial prefrontal cortex of Type 2 diabetes patients is associated with episodic memory dysfunction. **Human Brain Mapping**, n. March, p. hbm.24702, 2 jul. 2019.
- TINAHONES, F. J. et al. Caspase Induction and BCL2 Inhibition in Human Adipose Tissue: A potential relationship with insulin signaling alteration. **Diabetes Care**, v. 36, p. 513-21, mar. 2013.
- TITCHENELL, P. M. et al. Direct Hepatocyte Insulin Signaling Is Required for Lipogenesis but Is Dispensable for the Suppression of Glucose Production. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6,

p. 1154–1166, jun. 2016.

TOST, J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. **Molecular biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 71–81, jan. 2010.

TOWNSEND, K.; TSENG, Y.-H. Brown adipose tissue. **Adipocyte**, v. 1, n. 1, p. 13–24, 20 jan. 2012.

TUREK-PLEWA, J.; JAGODZINSKI, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. **Cellular & molecular biology letters**, v. 10, n. 4, p. 631–647, 2005.

TURNLEY, A. M. et al. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, p. 1707-16, april 1999.

VAN PRAAG, H. Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 8680-5, sep. 2005.

VANDER JAGT, D. L.; HUNSAKER, L. A. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: Roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. **Chemico-Biological Interactions**, v. 143, p. 341-51, feb. 2003.

VIGITEL. **Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão.** Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2019.

VINGTDEUX, V. et al. AMPK is abnormally activated in tangle-and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies. **Acta Neuropathologica**, v. 121, p. 337-49, mar. 2011.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 10–13, fev. 2012.

WALLIMANN, T. et al. Some new aspects of creatine kinase (CK): Compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. **BioFactors**, v. 8, n. 3–4, p. 229–234, 1998.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1796-808, dec. 2003.

- WESTWOOD, M. E.; MCLELLAN, A. C.; THORNALLEY, P. J. Receptor-mediated endocytic uptake of methylglyoxal-modified serum albumin: Competition with advanced glycation end product-modified serum albumin at the advanced glycation end product receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p.32293-8, dec. 1994.
- WEYER, C. et al. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 6, p. 787–794, 15 set. 1999.
- WHO. Active Ageing: A Policy Framework. **The Aging Male**, v. 5, n. 1, p. 1–37, 2002.
- WHO. **Global Report on Diabetes** ISBN. [s.l: s.n.].
- WHO. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 20 jun 2019.
- WHO. **Diabetes**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>>. Acesso em: 22 jun 2019.
- XIAO, B. et al. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. **Nature**, v. 449, p. 496-500, sep. 2007.
- XU, J. et al. Mitochondrial Creatine Kinase is Decreased in the Serum of Idiopathic Parkinson's Disease Patients. **Aging and disease**, v. 10, n. 3, p. 601, 2019.
- XU, W. et al. Mid- And late-life diabetes in relation to the risk of dementia: A population-based twin study. **Diabetes**, v. 58, n. 1, p. 71–77, 2009.
- XU, W. L. et al. Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: A population-based twin study. **Neurology**, v. 76, n. 18, p. 1568–1574, 3 maio 2011.
- ZERVOU, S. et al. Increasing creatine kinase activity protects against hypoxia / reoxygenation injury but not against anthracycline toxicity in vitro. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–14, 2017.
- ZHA, Z. et al. Pitavastatin attenuates AGEs-induced mitophagy via inhibition of ROS generation in the mitochondria of cardiomyocytes. **Journal of Biomedical Research**, v. 32, p. 281-287, july 2018.
- ZHANG, B. B.; ZHOU, G.; LI, C. AMPK: An Emerging Drug Target for Diabetes and the Metabolic Syndrome. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 5, p. 407–416, maio 2009.
- ZHANG, W.-J. et al. Impairment of hippocampal neurogenesis in streptozotocin-treated diabetic rats. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 117, n. 3, p. 205–210, mar. 2008.
- ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.

*Nature*, v. 372, n. 6505, p. 425–432, dez. 1994.

## SEÇÃO 2: MANUSCRITO PUBLICADO EM PERIÓDICO

Modificações epigenéticas induzidas pelo exercício: intervenção não farmacológica para melhorar os déficits cognitivos associados à obesidade

Artigo publicado na revista *Physiology & Behavior* em janeiro de 2019, volume 204, páginas 309-323: “*Epigenetic modifications induced by exercise: Drug-free intervention to improve cognitive deficits associated with obesity*”. Barros et al.

A obesidade e os distúrbios metabólicos estão aumentando em todo o mundo e estão associados à atrofia e disfunção cerebral, que são fatores de risco para demência de início tardio e doença de Alzheimer. Estudos epidemiológicos demonstraram que mudanças no estilo de vida, incluindo a prática frequente de exercícios físicos, são capazes de prevenir e tratar não apenas obesidade / distúrbios metabólicos, mas também melhorar a função cognitiva e a demência dos acometidos. Durante a última década, várias vias bioquímicas foram investigadas para compreender os mecanismos subjacentes envolvidos nos efeitos benéficos do exercício físico na cognição, obesidade e muitas outras condições com progressão crônica. Embora o desempenho, o tamanho muscular e a sensibilidade à insulina possam diminuir após algumas semanas de inatividade física (JEON et al., 2013), alguns outros efeitos induzidos pelo exercício duram um tempo considerável, a ponto de afetar gerações futuras como mostrado recentemente em roedores experimentais (BENITO et al., 2018). Esta mini-revisão resume as pesquisas fundamentais em andamento sobre os mecanismos epigenéticos induzidos pelo exercício físico e os efeitos benéficos no declínio

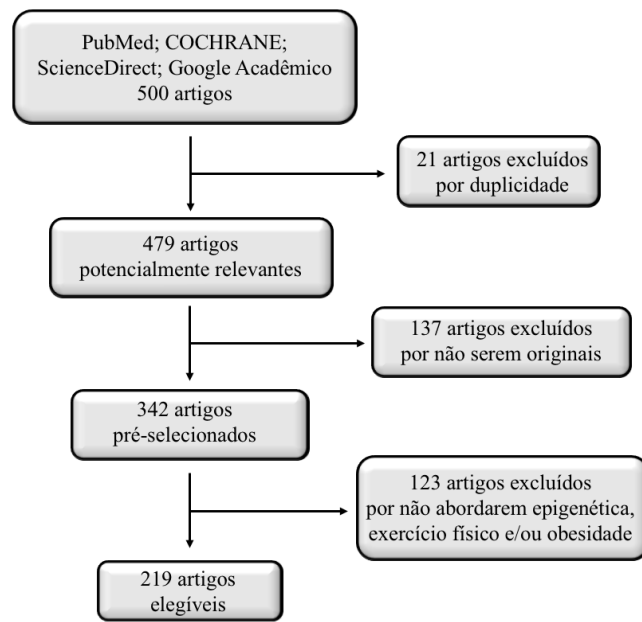
cognitivo associado à obesidade, destacando potenciais contribuintes e mediadores bioquímicos.

O principal objetivo deste trabalho foi revisar o estado-da-arte dos mecanismos neuroprotetores induzidos pelo exercício físico sobre o declínio cognitivo associado à obesidade e distúrbios metabólicos como no diabetes *mellitus*.

O trabalho foi apresentado na forma de uma revisão narrativa. Para tal foram pesquisados, no período de agosto de 2018 até janeiro de 2019, artigos em língua inglesa entre 1976 a 2019 disponíveis na base de dados eletrônica *US National Library of Medicine (PubMED)*, *Cochrane Central Register de Ensaio Controlados (CENTRAL)*, *ScienceDirect* e *Google Acadêmico*. Foram adotados os seguintes indexadores com diferentes combinações: *Epigenetics and Exercise and Cognitive impairment and Obesity*. Buscas manuais adicionais foram realizadas a partir das referências encontradas. Foram definidos como critérios de exclusão artigos duplicados, que não fossem originais ou que não apresentassem conteúdo relevante para esta revisão, bem como artigos que não abordassem epigenética, exercício físico, cognição e/ou obesidade.

No total, foram consultados 500 artigos, dos quais 291 foram excluídos por não serem originais, por duplicidade no banco de dados ou por não abordarem epigenética, exercício físico, cognição e/ou obesidade, resultando em 219 artigos elegíveis para essa revisão por serem originais e abordarem os temas de interesse (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma



Trajetória da pesquisa bibliográfica e critérios de inclusão e exclusão dos artigos encontrados

## Conteúdo da Revisão



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology &amp; Behavior

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/physbeh](http://www.elsevier.com/locate/physbeh)

Review

## Epigenetic modifications induced by exercise: Drug-free intervention to improve cognitive deficits associated with obesity



Leonardo Barros<sup>a</sup>, Tuany Eichwald<sup>a</sup>, Alexandre Francisco Solano<sup>a</sup>, Débora Scheffer<sup>a</sup>,  
Rodrigo Augusto da Silva<sup>b</sup>, Joana M. Gaspar<sup>a,c</sup>, Alexandra Latini<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX), Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química e Bioquímica, Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus Botucatu, Botucatu, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFSC, Florianópolis, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Epigenetics  
Obesity  
Exercise  
Cognitive impairment  
BDNF  
Gene expression

## ABSTRACT

Obesity and metabolic disorders are increasing worldwide and are associated with brain atrophy and dysfunction, which are risk factors for late-onset dementia and Alzheimer's disease. Epidemiological studies demonstrated that changes in lifestyle, including the frequent practice of physical exercise are able to prevent and treat not only obesity/metabolic disorders, but also to improve cognitive function and dementia. Several biochemical pathways and epigenetic mechanisms have been proposed to understand the beneficial effects of physical exercise on cognition. This manuscript revised central ongoing research on epigenetic mechanisms induced by exercise and the beneficial effects on obesity-associated cognitive decline, highlighting potential mechanistic mediators.

## 1. Introduction

Obesity is a complex condition that has reached epidemic proportions worldwide and has become a major contributor to the global burden of chronic diseases and disabilities. Obesity coexists with undernutrition in developing countries, with serious social and psychological dimensions, affecting virtually all ages and socioeconomic groups. According to the World Health Organization (WHO), 1.9 billion adults were overweight and at least 650 million were clinically obese in 2016 [1].

Obesity is a risk factor for several metabolic diseases, such as insulin resistance and type 2 diabetes, whose prevalence is also increasing globally. A growing body of evidence has demonstrated that obesity, insulin resistance, and diabetes are associated with impairment of hippocampal-dependent cognition and memory, presenting a higher risk for the development of dementia [2,3]. In addition, obesity and higher body mass index (BMI) over the course of a lifetime are associated with lower cognitive performance, cognitive decline, reduced white matter, decreased blood brain barrier integrity, brain atrophy and increased risk for late onset Alzheimer's disease (AD) [4].

Changes in lifestyle, including reduced caloric intake and increased

physical activity, are recommended for prevention and treatment of obesity and associated metabolic disorders [5]. According to the Physical Activity Guidelines for Americans [6], adults with chronic health conditions such as cancer, osteoarthritis, hypertension, multiple sclerosis, type 2 diabetes, dementia and other cognitive disorders should practice 150 to 300 minutes a week of moderate-intensity aerobic activity, or 75 to 150 minutes a week of vigorous-intensity aerobic activity. With additional health benefits, these individuals should associate aerobic activity with moderate/higher intensity muscle-strengthening activities, that involve all major muscle groups. Lifestyle interventions can benefit not only loss of body mass and improve metabolic health or cardiovascular risk [7], but they can also improve cognitive function in children, adolescents and adults [8–10].

During the last decade, several biochemical pathways have been investigated to understand the underlying mechanisms involved in the beneficial effects of physical exercise on cognition, obesity and many other conditions with chronic progression. While performance, muscle size and insulin sensitivity may decline after a few weeks of physical inactivity [11], some other exercise-induced effects last for considerable time, to the point of affecting future generations as recently shown in experimental rodents [12]. This mini-review summarizes

\* Corresponding author at: Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX), Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus Universitário – Córrego Grande, Bloco C-201/214, Florianópolis 88040-900, Brazil.  
E-mail address: [a.latini@ufsc.br](mailto:a.latini@ufsc.br) (A. Latini).

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.03.009>

Received 31 December 2018; Received in revised form 11 March 2019; Accepted 11 March 2019

Available online 12 March 2019

0031-9384/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.



fundamental ongoing research on epigenetic mechanisms induced by physical exercise and the beneficial effects on obesity-associated cognitive decline, highlighting potential contributors and mechanistic mediators.

## 2. Epigenetics

The term epigenetics was originally conceived by Conrad Waddington to describe the existence of processes that alter gene activity without changing the DNA sequence, leading to modifications that can be transmitted to daughter cells [13]. These processes are natural and essential to the function of many organisms, but if they occur improperly, they can induce major adverse health and behavioural effects. Epigenetic modifications can influence gene activity at the transcriptional and post-transcriptional levels and/or at the translation and post-translational modifications. The most characterized epigenetic modifications are DNA methylation that includes methylation and hydroxymethylation and post-translational modifications of histones namely, acetylation, methylation, phosphorylation, poly-ADP ribosylation, ubiquitination, deamination, sumoylation and isomerization of proline. All these processes regulate gene activity and involve chemical modifications in the DNA [14].

### 2.1. DNA methylation

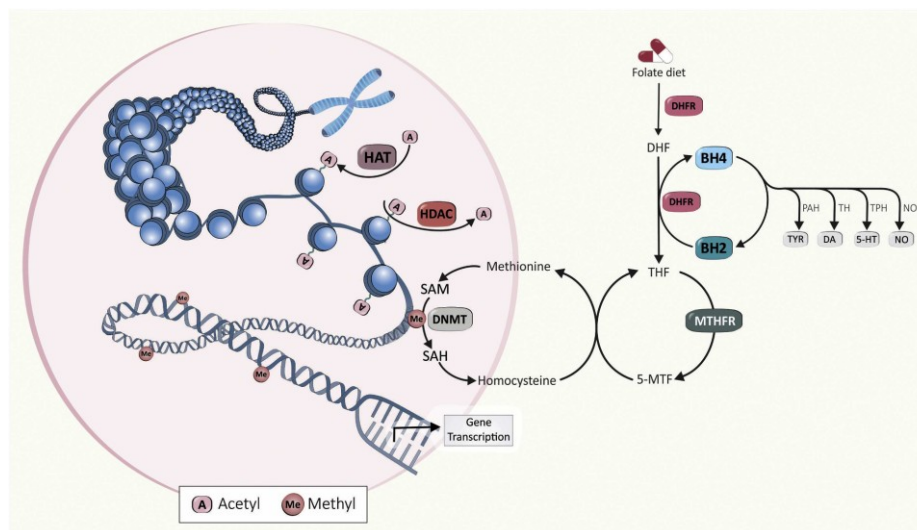
DNA methylation is the main form of epigenetic alteration, consisting of the covalent addition of a methyl group, transferred from S-adenosylmethionine to the carbon 5 of a cytosine that usually precedes

a guanine (CpG dinucleotide), forming 5-methyl cytosine (5mC; Fig. 1). This reaction is catalysed by DNA methyltransferases enzymes (DNMTs) [15] resulting in methylation of the DNA predominantly in promoter regions of functional genes called CpG islands, usually leading to the inhibition of gene expression [16]. In mammals, five members of the DNMT family have already been identified. DNMTs 1 and 2 are responsible for maintaining the epigenetic pattern and have high affinity for hemimethylated DNA strands and for the maintenance of DNA methylation patterns during replication. DNMTs 3A, 3B and 3L, are classified as *de novo* DNMTs and are responsible for the occurrence of *de novo* methylation of sequential waves in regions of the genome with no previous indication of methylation [17].

DNA can be demethylated by opposite mechanisms; by inhibition of DNMT or by active 5mC removal. Ten-eleven translocation (TET) proteins (2-oxoglutarate, ascorbate and Fe (II) dependent dioxygenases) convert 5mC into 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) [18,19], then 5hmC is transformed into 5-formylcytosine and finally into 5-carboxycytosine (5caC) [20,21]. The subsequent decarboxylation of 5caC leads to DNA demethylation [22] (Fig. 2). These changes lead to the activation of gene expression by the destabilization of the DNA structure, which allows the access of the transcriptional machinery to their respective transcription initiation sites.

### 2.2. Histone modifications

The nucleosome consists of two histone H3-H4 dimers surrounded by two dimers of H2A-H2B. Their N-terminal tails protrude from the nucleosomes to the nuclear lumen where they can undergo post-



**Fig. 1.** Role of tetrahydrobiopterin (BH4) on chromatin remodeling. The main epigenetic profiles are represented by a) methylation of the DNA, controlled by DNA methyltransferases (DNMT) enzymes and ten-eleven translocation (TET) proteins, and b) post-translational modifications of histones, represented mainly by acetylation and regulated by histone acetyltransferases (HAT) and histone deacetylases (HDAC). The DNA methylation results from the close communication between methionine, folate and biopterin cycles. The methylation pathway is formed by the interaction of three essential metabolic routes: the methionine, folate and biopterin cycles. The methionine cycle involves the methylation of homocysteine into methionine, which is further transformed into S-adenosylmethionine (SAM), the most important methyl donor. SAM can donate the methyl group in more than a hundred biological reactions, including DNA methylation, to yield S-adenosylhomocysteine (SAH) and the methylated acceptor (methyl-DNA). 5-Methyltetrahydrofolate (5-MTHF) functions as a methyl donor for homocysteine methylation. The resulting tetrahydrofolate (THF) is transformed back to 5-MTHF by methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Dietary folic acid is transformed into THF (active folate) by dihydrofolate reductase (DHFR), the same enzyme that catalyzes the reduction of dihydrobiopterin (BH2) into tetrahydrobiopterin (BH4). BH4 is a mandatory enzyme cofactor for the synthesis of nitric oxide (NO) and the neurotransmitters dopamine (DA) and serotonin (5-HT), and for the transformation of phenylalanine (PHE) into tyrosine (TYR). The transformation of BH2 into BH4 by DHFR occurs in the BH4 salvage pathway. Abbreviations: PAH, phenylalanine-4-hydroxylase; TH, tyrosine hydroxylase; TPH, tryptophan hydroxylase.

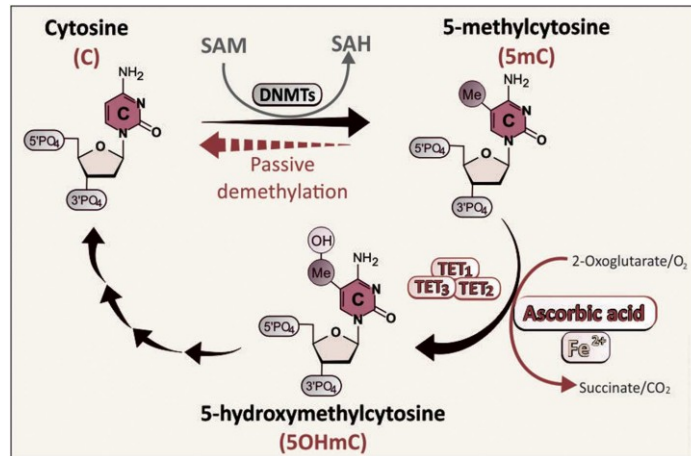


Fig. 2. DNA demethylation involves passive and active processes. Active DNA demethylation is achieved through ten-eleven translocation (TET1, 2, 3) proteins, by the oxidation of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) in a reaction dependent on ascorbic acid, iron, oxygen and 2-oxoglutarate. TET enzymes can further oxidize 5-hmC to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine, which can eventually be removed from the genome. Reproduction with authorization of Aline Pertile Remor.

translationally modified modifications, such as phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, acetylation and methylation [23,24]. These modifications alter chromatin structure to influence gene expression and can interfere with chromatin condensation and nucleosome positioning. In general, tightly folded chromatin tends to be shut down, or not expressed, while more open chromatin is functional, or expressed. Therefore, chromatin structure and gene accessibility to transcriptional machinery are regulated by modifications to both DNA and histone tails [24].

The histone acetylation at the  $\epsilon$ -amino group of lysine residues in H3 and H4 tails is most consistently associated with the promotion of transcription. Histones can be acetylated and deacetylated by the action of histone acetyltransferases (HAT) and histone deacetylases (HDACs), respectively. Acetylation is targeted to regions of chromatin by the recognition and binding of DNA sequence-specific transcription factors that recruit one of a growing family of HAT cofactors, such as the CREB binding protein, which promotes an essential pathway for cognition and memory [25,26]. Deacetylation of histones performed by HDACs correlates with CpG methylation and the inactive state of chromatin. The HDAC proteins are themselves subject to regulation by acetylation, phosphorylation, and sumoylation, which can affect their function, subcellular distribution, and protein-protein associations [27] (Fig. 1).

Histone lysine methylation patterns and their effects on transcription are more complex than acetylation, since some methylation sites are associated with transcriptionally permissive chromatin (euchromatin) and some are repressive, fostering heterochromatin formation. In addition,  $\epsilon$ -amino groups of lysine residues can be mono-, di-, or tri-methylated. Histone methylation is catalysed by histone methyltransferase (HMT) and demethylated by histone demethylase (DMH) [28]. The addition of the acetyl group to lysine (K) residues catalysed by HAT enzymes in the histone N-terminal tail, weakens the electrostatic interactions between histones, promoting an opening of the chromatin and consequently the activation of gene expression [29]. However, the addition of the methyl group by HMTs in the histone N-terminal tail can promote both activation and gene repression, depending on the type of amino acid modified and also on the amount of modifications (trimethylated, dimethylated or monomethylated) [30,31]. Overall, the methylation of lysine 9 and lysine 27 of the histone H3 are associated with gene silencing, whereas methylation of lysine 4 and lysine 36 of the same histone are transcriptionally permissive modifications [32].

### 2.3. Nonprotein-coding RNAs (ncRNAs)

Diverse classes of RNA, ranging from small to long ncRNAs, have emerged as regulators of gene expression, genome stability and defence against foreign genetic elements. ncRNAs are RNA molecules transcribed from genomic DNA that are not translated into proteins [33]. Some ncRNAs are represented by tRNA (transfer RNA), rRNA (ribosomal RNA), miRNA (micro RNA), snoRNA (small nucleolar RNAs), and pi-RNA (piwi-interacting RNA), etc. [34]. Small ncRNAs typically modify chromatin structure and silence transcription by guiding Argonaute-containing complexes to complementary nascent RNA scaffolds and then mediating the recruitment of HMT and DNMTs [35]. Long ncRNAs exhibit their biological functions by acting as *cis*- or *trans*-regulators in biological processes [36]. The long ncRNAs that control chromatin structure interact with nucleosome remodeling factors as well as chromatin modifying enzymes [37]. In general, long ncRNAs are found to play an important role in gene expression regulation of various diseases including cancer.

DNA methylation, histone modification and ncRNA regulation are the main epigenetic mechanisms that modulate the gene expression in physiology and several pathological processes [38,39].

### 2.4. Role of tetrahydrobiopterin (BH4) on DNA methylation

BH4 is an essential cofactor for aromatic amino acid hydroxylase, nitric oxide synthases, and alkylglycerol monooxygenase, making it indispensable for synthesis of serotonin, epinephrine, norepinephrine, dopamine, nitric oxide, and metabolism of glycerol ethers [40]. Physiological intracellular levels of BH4 are regulated by the combined action of three metabolic pathways, namely *de novo* synthesis, recycling, and salvage pathways. The *de novo* synthesis of BH4 from GTP through a three-step enzymatic metabolic route starting with the rate-limiting enzyme guanosine triphosphate cyclohydrolase I, followed by 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase [41]. The BH4 recycling pathway is a mechanism that economizes intracellular energy (without consuming GTP) and sustains the appropriate levels of BH4 in tissues with a high requirement of this pteridine. After BH4 participates as a mandatory enzyme cofactor, quinonoid dihydrobiopterin reductase (qDHPR) is formed by quinoid dihydropteridine reductase and reduced back to BH4 in a NADH-dependent reaction [41]. Alternatively, intracellular BH4 levels can be generated via the salvage pathway using sepiapterin and 7,8-dihydrobiopterin (BH2)

as metabolic intermediates. Although the salvage pathway is not fully understood, sepiapterin reductase and dihydrofolate reductase (DHFR) appears to be key generating BH4 enzymes [40,42].

DHFR is a ubiquitous enzyme that normally peaks at the G1/S cell cycle boundary, playing a key role in DNA methylation. DHFR catalyzes the NADPH-dependent reduction of dihydrofolate to tetrahydrofolate (THF) needed for several one-carbon transfer reactions, like in DNA methylation (Fig. 1) and in purine and pyrimidine synthesis [43]. DHFR is also required for the intracellular conversion of synthetic folic acid, consumed in supplements and fortified foods, into the THF forms that can participate in folate/homocysteine metabolism. Therefore, DHFR appears to be critical for the maintenance of BH4 and THF pools.

Reduction of DHFR enzymatic activity diminishes the THF pool inside the cell, affecting therefore, folate-dependent enzymes [44]. Folate deficits have been extensively associated with increased risk of cardiovascular diseases, multiple cancers, and neural tube defects, due to one-carbon metabolism impairment, which is required for DNA methylation [45–48]. However, the impact or relationship of BH4 metabolism on the THF pathway has not yet been studied. Excessive levels of BH4 have been associated with increased sensitivity to pain [49], immune cell proliferation [50], tumor angiogenesis [51] among other pathological processes, in humans and experimental systems. However, BH4 non-hereditary or genetic deficiencies have also been related to conditions where folate metabolism was reported to be compromised, including brain maturation defects [52] and cardiovascular diseases - however, in this case the systemic and local vascular regulation of BH4 levels has been reported to be different - (for a review see [53]), pointing to an intricate relationship between these two pathways, and possibly to BH4 regulating DNA methylation. In this scenario, it has been reported that DHFR can replace qDHPR activity in qDHPR-null mouse, under increased BH2 levels, generating therefore BH4 [54]. Furthermore, our group recently demonstrated that BH4 production is essential for proper mitochondrial activity [50], and compromised mitochondrial one-carbon metabolism has been shown to develop neural tube defects with 100% penetrance [55,56], strengthening the view that BH4 and folate metabolisms interact to control DNA methylation. Finally, DHFR inhibition is essential to the action of antifolate medications used to treat cancer and some inflammatory diseases, and it is well described that methotrexate reduces BH4 levels [57].

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is another key enzyme in folate metabolism that participates in DNA methylation, and the presence of MTHFR polymorphisms (C677T variants) is a risk factor for neural tube defects [58]. MTHFR catalyzes the irreversible reaction that establishes the balance between 5,10-methyltetrahydrofolate (5,10-MTHF) and 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) at the cellular level. 5,10-MTHF is used for DNA synthesis, while 5-MTHF is used for DNA methylation. 5-MTHF donates one carbon (methyl group) for the methylation of homocysteine into methionine, which is further transformed into S-adenosylmethionine (SAM). SAM can donate the methyl group in more than a hundred biological reactions (*i.e.* DNA methylation), to yield S-adenosylhomocysteine and the methylated acceptor, including DNA [59]. SAM also donates a methyl group to catechol-O-methyltransferase (COMT), which is involved in the catabolism of dopamine, epinephrine, and norepinephrine, catecholamine neurotransmitters, which biosynthesis is fully dependent on appropriate BH4 cellular levels. In this context, it has been demonstrated that 5-MTHF regenerates oxidized BH4 in the absence of adequate amounts of the pterin [54,60,61].

The structure of 5-MTHF is very similar to BH4; the direct infusion of 5-MTHF into the brachial artery of patients with hyperlipidemia mimicked the effects of BH4 on endothelial function, suggesting a direct interaction with endothelial nitric oxide synthase [62]. This fact further supports the idea of an intimate interplay between these two pathways, regulating the methylation of DNA (Fig. 1).

### 3. Epigenetic factors controlling the expression of metabolic and cytotoxic/neuroprotective genes in human obesity

Obesity is a complex condition that has reached epidemic proportions worldwide and has become a major contributor to the global burden of chronic diseases and disabilities. Obesity has a multifactorial aetiology which results from a complex interaction of social factors, culture, environment, epigenetics and individual genetic predisposition. Environmental factors such as socioeconomic status, lifestyle and cultural aspects are determinant for the establishment of this disease. High caloric intake associated with low energy expenditure due to sedentary lifestyle leads to an "obesogenic" environment that plays a fundamental role in predisposition to the development of chronic diseases [5].

Genetic factors are believed to be essential for the development of obesity, diabetes, AD, Parkinson's disease (PD), etc. [63–65]. However, gene modifications alone cannot explain the development of these chronic diseases or their related long-term complications. In this scenario, epigenetic alterations might strongly increase predisposition to the development of obesity-induced cognitive impairments. The main epigenetic alterations in physiology and several pathological processes, including DNA methylation, histone modification and ncRNAs have been demonstrated in obese individuals.

#### 3.1. DNA methylation in obesity

Individuals affected by common chronic metabolic diseases present altered patterns of DNA methylation [63–65] and compromised expression of neuroprotective genes, which will favor neurotoxicity and cognitive impairment or dementia [66]. However, when comparing global DNA methylation profiles in obese subjects vs. lean controls, several studies failed to demonstrate strong associations between obesity and global methylation [67]. DNA methylation in large-scale studies is routinely assessed in DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Since blood samples consist of a mixture of different cell types with different methylation profiles, the available data in the literature might lead to limited interpretations about global DNA methylation patterns in obesity [68]. Moreover, blood cell methylation profiles obtained from adults may not report the epigenetic state in specific tissues (including the brain), or whether the changes are causes or consequences of the obese state. Furthermore, there are numerous factors, including sex, ethnic background, age, exposure to toxins and diet that might also contribute to the lack of evident association [69,70].

Clear and defined patterns of global DNA methylation are observed, however, when at least one clinical variable is included in the statistical analysis of the obese and lean populations. BMI as a measure of adiposity was shown to positively correlate with global DNA methylation in adults affected by diabetes, metabolic syndrome and heart diseases, all conditions linked to obesity [71]. Moreover, two studies performed in obese children demonstrated that the correlation between obesity and epigenetics (global DNA methylation) may be stratified in obese and severely obese groups vs. lean controls [72,73]. Furthermore, genome-wide quantification of site-specific DNA methylation has led to the identification and validation of multiple adiposity-associated differentially-methylated sites and regions [74]. The candidate genes implicated in obesity are related to appetite control and/or metabolism, insulin signaling, immunity, growth, brain activity, circadian clock regulation and imprinted genes [67] (some examples are shown in Table 1). For example, increased methylation of proopiomelanocortin in whole blood [75], and of PGC-1 $\alpha$  in muscle and PBMC [76,77] have been shown in obese adults. Our group also demonstrated increased methylation in the promoter region of the repressor element 1 (RE1) silencing transcription factor (REST) in PBMC from obese children [72]. REST is a master transcription factor that, in differentiated neurons, down-regulates genes linked to cell-death and enhances the expression

**Table 1**  
Example of genes with increased DNA methylation and compromised expression in human obesity

Gene	Biological function	Biological sample
Proopiomelanocortin (POMC) [75]	Appetite; POMC neuron stimulation results in satiety	whole blood
PGC-1 $\alpha$ [76]	PGC-1 $\alpha$ ; master regulator of mitochondrial biogenesis	muscle; PBMC
PDK4 [76]	Regulation of metabolism	muscle
Glucocorticoid receptor [80]	Inhibition of inflammation	PBMC
IGF2/H19 gene cluster [82]	H19; gene for a lncRNA with negative regulation of body weight and cell proliferation IGF2; cell proliferation, metabolism and neuroprotection	whole blood
HIF3A [74]	Metabolism adaptation to hypoxia; related to endurance exercise	PBMC
UBASH3A and TRIM3 [67]	UBASH3A; suppressive effect on T-cell signaling and activation – promotion of inflammation TRIM3; autoimmunity	PBMC
REST [72]	Neuroprotective transcription factor in the adult and aging brain	PBMC
BDNF [82]	Neuroprotection	PBMC
Serotonin transporter [79]	Serotonin uptake	PBMC
CREB3L3 [67]	Hepatic regulation of metabolism	PBMC

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

of other genes that induce resistance to the ageing process and the preservation of cognitive function [78]. The increased DNA methylation was accompanied by reduced expression and content of REST in the obese group [72]. In addition, other associations between BMI, adiposity, and waist circumference with methylation in PDK4 in muscle [76], the serotonin transporter gene [79], glucocorticoid receptor [80] and IGF2/H19 imprinting region in blood cells [81], and hypoxia inducible factor 3, alpha subunit (HIF3A) [74], ubiquitin associated and SH3 domain containing A (UBASH3A) and tripartite motif containing 3 (TRIM3) [67], cAMP responsive element binding protein 3-like 3 (CREB3L3), and BDNF (brain-derived neurotrophic factor) in PBMC [82] have also been reported. BDNF is a protein synthesized in neurons that participate in cognitive processes, including neuroplasticity, neurogenesis and neuroprotection of the hippocampus. It may also enhance learning, memory and cognition [83,84]. Obesity negatively regulates hippocampal BDNF expression [85,86], and low blood BDNF content has been observed in obese individuals and its reduction has been extensively associated with cognitive impairment [87].

Collectively, these studies provide evidence that obesity is associated with altered epigenetic regulation of a number of genes involved in metabolism and cytoprotection. The association between DNA methylation and gene expression is dependent on the region of CpG that is methylated. The best understood relationship is the methylation of CpG islands (300 to 3000 base pairs in length with a CpG -cytosine and guanine separated by one phosphate- content greater than 0.6), a DNA region where many mammalian promoter regions are located. Under a simplistic view, hypermethylation, a characteristic of obesity, will induce stable silencing of genes. The opposite has been described in several cancers where repressed oncogenes are hypomethylated, therefore promoting its expression.

### 3.2. Histone post-translational modifications in obesity

In addition to DNA methylation, histone post-translational modifications, in particular altered histone acetylation, have also been demonstrated in obesity and in many other human diseases.

HATs require the central mitochondrial metabolite of metabolism, acetyl-coA, as the acetyl-donor, connecting metabolism to the transcriptional regulation of many genes, including pro-inflammatory genes. Histone acetylation, in general terms, allows interconversion between repressive and permissive chromatin structures and domains, and it is the major regulator of gene expression [88]. For example, acetylation of histone H3 at the promoters of several cytokines and chemokines after inflammation results in the increased recruitment of NF- $\kappa$ B to these regions, thus promoting NF- $\kappa$ B-dependent inflammatory gene expression in human obesity [89]. In this context, obesity, described for the first time by Hippocrates (460 BC–370 BC) as a surplus of four humors (fluids): blood, black bile, yellow bile, and phlegm that induces early mortality (reviewed in [90]), was understood as a low-

grade chronic inflammation disease after more than two thousand years. However, inflammation at the chromatin level results from the acetylation status of histones, as a balance between the activities of HATs and HDAC; i.e. the increased H3 acetylation of the promoters that drive inflammation can be reverted by increased histone acetylation of the glucocorticoid receptor promoter or increased HDAC2 activity [89].

Mammalian HDACs are divided into 4 classes (I, IIa, IIb, III, and IV) [27]. Class III HDACs, known as sirtuins due to the shared homology with yeast Sir2 (Silent information regulator 2), are structurally distinct from Classes I, II, and IV. Mammalian sirtuins (SIRT 1-7) deacetylate lysine residues on targeted proteins, utilizing a mechanism that requires NAD<sup>+</sup> as a co-substrate, releasing nicotinamide (NAM), O-acetyl ADP ribose, and deacetylated protein [27,91]. The list of SIRT's targets in mammals includes, among others, those involved in aging, cognition, neuroplasticity, memory, calorie restriction, thermogenesis, malignancy, stress responses, metabolic and transcriptional regulations, and in genome maintenance [27,91]. Most of the SIRT enzymes are highly sensitive to several environmental factors, including calorie restriction, exercise and cold exposure, due to fluctuations in intracellular NAD<sup>+</sup> levels in response to nutrient availability [92].

Numerous studies performed in obese individuals have shown reduced availability of SIRT's in different tissues (see Table 2), when comparing with normal-weight controls [93–96]. Thus, considering the inflammatory component of obesity and the main biological functions of these type III HDACs (Table 2), increasing SIRT activity seems to be a promising target for the treatment of obesity and obesity-associated comorbidities. In this context, the non-pharmacological treatment of obesity, the regular practice of physical exercise, is known to increase the activity of sirtuins. For example, the first effort to demonstrate increased activity of SIRT's in humans induced by exercise was performed in PBMC from athletes of the Italian male rowing team [97].

Other HDACs have also been shown to be altered in human obesity. For example, HDAC5, HDAC6 and HDAC10 (class II HDACs) are markedly reduced in adipose tissue from obese subjects [103,104]. These class II HDACs have been proposed to be negative regulators of obesity development [104]. However, the best understood relationship between HDACs and obesity (cause or consequence?) is the compromised content of SIRT's in tissues from obese individuals.

### 3.3. ncRNAs in obesity

Only 1.2% of the human genome encodes protein, and a large fraction of it is transcribed. About 98% of the transcriptional output in humans consists of ncRNA from the introns of protein-coding genes and the exons and introns of non-protein-coding genes. The function of ncRNA has begun to be elucidated in recent years, and it has been shown to be involved in various aspects of gene expression and in the pathophysiology of many diseases, including obesity [105].

**Table 2**  
Reduced levels of sirtuins in biological samples from obese subjects

Sirtuin	Tissue (cellular localization)	Biological functions	Biological sample
SIRT1	Ubiquitous (nucleus <sup>a</sup> , cytosol)	Cell survival; metabolism; DNA damage repair; lipid and glucose homeostasis; stress resistance; insulin secretion; mitochondrial biogenesis; antioxidant; antiapoptotic; global health	adipose tissue [93,95,96,98] PBMC [93,94] liver [93]
SIRT2	Muscle <sup>a</sup> , brain, spinal cord, testes, heart (cytosol)	Cell cycle control; thermogenesis; metabolism; neuroprotection; DNA repair	PBMC [94]
SIRT3	Heart, brain, testes, liver, kidney, muscle, and adipose tissues (mitochondria <sup>a</sup> , nucleus, cytosol)	Metabolism; mitochondrial health; neuroprotection; antioxidant; longevity	PBMC [93] liver [93]
SIRT4	Ubiquitous, pancreas <sup>a</sup> (mitochondria <sup>a</sup> , nucleus, cytosol)	Metabolism; insulin release, mitochondrial ATP synthesis	adipose tissue [98]
SIRT5	Ubiquitous, brain <sup>a</sup> , kidney <sup>a</sup> (mitochondrial matrix <sup>a</sup> , cytosol)	Regulation of cellular homeostasis, mitochondrial function; metabolism; reactive species detoxification	adipose tissue [99]
SIRT6	Ubiquitous (nucleus)	DNA repair; lifespan	PBMC [93] liver [93]
SIRT7	Proliferative tissues <sup>a</sup> including spleen, ovary, thyroid, liver and testis. Absent or low in muscle (nucleolus)	Cellular growth; metabolism; cell survival	increased in adipose tissue [98]

SIRT: Sirtuin; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells.

<sup>a</sup> Denotes predominant localization. Localization and biological functions of sirtuins are reviewed in [27,100–102].

**3.3.1.1. Long ncRNAs in obesity.** Long ncRNAs are reported to play an important role in the control of adipogenesis and obesity [106], and small ncRNAs, in particular miRNAs, have been shown to be involved in human adipocyte differentiation, lipid metabolism, and obesity [107,108].

Table 3 shows the main long ncRNAs associated with human obesity and obesity-associated comorbidities. These long ncRNAs were shown to participate in adipocyte differentiation and function in humans. However, it should be considered that long ncRNAs on metabolism is still an open field for research.

**3.3.1.2. Small ncRNAs in obesity.** More than two thousand miRNAs have been described in humans. Once generated, miRNA represses the expression of target genes contributing to the regulation of many biological processes. Numerous miRNAs are present in human adipose tissue; however, the expression of only a few is altered in individuals with obesity and type 2 diabetes mellitus, or differentially expressed in various adipose depots. miRNAs can also be secreted from cells into the circulation and serve as markers of a pathological condition, *i.e.* disturbed adipose tissue function. The miRNA concentration in biological fluids is relatively stable and can be used as a biomarker for disease diagnosis [109]. For example, the plasma level of miR-375 could potentially be used to estimate the beta-cell mass in patients with insulin resistance [110]. Moreover, multiple studies have suggested that circulating miRNAs, including miR-122, are strongly associated with the risk of obesity and insulin resistance in young adults [111]. Tables 4a and 4b show the main miRNAs increased in biological samples obtained from obesity-related diseases.

With the proper development, miRNA-based biomarkers have the potential to identify metabolic problems during disease latency (pre-clinical), assess the severity of disease, identify patients with a predisposition to metabolic disease (assess risk, for example, for obesity-driven cognitive decline [2]), address disease etiology, confirm

**Table 3**  
Long ncRNAs differentially expressed in adipose tissue of obese individuals

Long ncRNA	Disease condition
CATG00000111229.1 (ASMER-1)	Obese + IR
CATG00000072281.1	Obese
CATG00000000027.1	Obese + IR
ENSG00000235609.4 (ASMER-1)	Obese + IR
ENSG00000229807.5	Obese
ENSG00000231528.2	Obese

IR: insulin resistant.

diagnosis/ reduce misdiagnosis on the basis of current clinical markers and monitor response to interventions.

#### 4. Epigenetic biomarkers of human cognitive impairment

A growing body of evidence has demonstrated that obesity, insulin resistance, and diabetes are associated with impairment of hippocampal-dependent cognition and memory, presenting a higher risk for the development of dementia [2,3]. In addition, obesity and higher BMI over the course of a lifetime are associated with lower cognitive performance, cognitive decline, reduced white matter, decreased blood brain barrier integrity, brain atrophy and increased risk for late onset AD [4].

Although there is a higher risk for obese individuals to develop cognitive impairment or memory loss, and obesity is characterized by several epigenetic modifications in tissues and biological fluids, there is no set or unique epigenetic hallmark in obesity linking or predicting the development of cognitive decline in humans. ApoE is the strongest genetic risk factor for late onset Alzheimer's disease. ApoE encodes three common alleles ( $\epsilon$  2,  $\epsilon$  3,  $\epsilon$  4). ApoE  $\epsilon$  4 is associated with an increased cumulative AD risk, such that one ApoE  $\epsilon$  4 allele increases AD risk 3-fold, and two ApoE  $\epsilon$  4 alleles increase AD risk 12-fold [121].

In an effort to associate epigenetic markers of obesity with cognitive performance, Table 5 shows the main epigenetic modifications identified in blood or *postmortem* tissues from individuals affected by AD or mild cognitive impairment.

#### 5. Beneficial role of physical exercise on obesity-driven cognitive impairment: Supporting data obtained mainly from animal studies

Data generated from studies performed in experimental systems, including rodents, non-rodents, primates, iPSC (induced pluripotent stem cells), primary cultured cells, etc., have contributed to increase the knowledge on the processes involved in cognitive decline. It is clear, that the main objective to perform pre-clinical studies in this field of cognition and memory is to contribute to finding solutions to this medical question. Decline of cognitive abilities is a major risk factor for age-associated neurodegenerative disorders, in particular AD. Two main conditions favor this outcome: *i)* ageing, which is a consequence of the increased life expectancy, and *ii)* obesity and the related biggest pandemic in human history, the type 2 diabetes. In this context, calorie restriction and the regular practice of physical exercise increases longevity and prevent cognitive decline. In addition, long-term regular exercises may slow the loss of muscle mass and prevent age-associated increases in body fat.

Although, pre-clinical data might lead to negative or inconsistent

**Table 4a**  
Main miRNAs increased in biological samples obtained from obesity-related diseases

miRNA	Pathological condition	Biological sample
miR-23a; miR-27a; miR-130; miR-195; miR-197; miR-320a; miR-509-5p [112]	Metabolic syndrome	serum
let-7g; miR-221 [113]	Female-specific miRNA in metabolic syndrome atherogenesis; adipogenesis	serum
miR-625 [114]	Pre-gestational and gestational obesity	plasma
miR-140-5p; miR-142-3p; miR-222 [115]	Morbidly obese patients	serum
miR-222 [116]	Insulin resistance, obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and an adverse lipid profile	plasma
miR-122; miR-199a [117]	Childhood obesity	serum
miR-486; miR-146b; miR-15b [117]	Risk of type 2 diabetes in obese children	serum
miR-132; miR-181a; miR-17-5p; miR-155 [118]	Correlation with macrophage infiltration	Adipose tissue

**Table 4b**  
Main miRNAs reduced in biological samples obtained from obesity-related diseases

miRNA	Pathological condition	Biological sample
miR-126 [119]	Type 2 diabetes	plasma
miR-17-5p; miR-132 [120]	Obesity	serum
miR-532-5p; miR-125b; miR-130b;	Morbidly obese patients	serum
miR-221; miR-15a; miR-423-5p;		
miR-520c-3p [115]		

results when projecting to the human condition, a number of major breakthroughs in basic science and medical research have been possible because of observations and testing on animal models. Indeed, the discoveries in which animal models played a critical role are numerous and have led to many Nobel Prizes.

The regular practice of physical exercise has been used as a non-pharmacological treatment for preventing the development of many diseases with chronic progression, including cognitive decline [143]. During the last decade, several biochemical pathways have been investigated to understand the underlying mechanisms involved in the beneficial effects of physical exercise on cognition. The Physical Activity Guidelines for Americans states that regular practice of physical activity is one of the most important things people can do to improve their health [6]. The Guidelines stressed that the beneficial effects are highly dependent on overload, progression, and specificity; *i.e.* the physiological effects of walking are largely specific to the lower body and the cardiovascular system. This implies that this free-drug treatment will require a specific dose and administration time to achieve its maximal therapeutic effect. In agreement, rehabilitation and/or exercise prescription for humans relies on different exercise intensities and the dose-response relationships, specificities that will lead to diverse effects over disease/health states [144]. Unfortunately, most of the data generated in this field so far, lack of essential details about the protocols applied to induce the neuroprotection. Thus, it is not clear whether physical activity, physical exercise, or exercise training (definitions commented in [145]) is driving the cognition-enhancing responses, leading therefore, to confounding results. However, having this in mind, the literature is extremely robust regarding the neuroprotective of exercise induced, *i.e.* by increased activity of BDNF driven by epigenetics alterations [146–152].

### 5.1. Epigenetics and cognition

#### 5.1.1. Histone acetylation is involved in learning, cognition and memory

It has been shown that cognitive activity relies on the three main types of epigenetic modifications observed in obesity, including DNA methylation, histone modifications and ncRNAs. It has also been shown that histone acetylation is most robustly associated with promoting memory formation. However, the process works in concert with other histone modifications and DNA methylation processes to regulate

memory formation and synaptic plasticity [153,154]. Two well-characterized epigenetic modifications involved in cognition and memory are the co-existence of *i)* the acetylation of lysine residue 14 on H3 with the phosphorylation of serine 10 and the trimethylation of H3K36 [155,156], and *ii)* H3 acetylation with DNA methylation [154]. When these modifications are induced, cognition and memory are enhanced.

H3 acetylation is rapid and reversible, as it is controlled by the activities of HAT and HDAC. HATs are often transcriptional coactivators that contain bromodomains, whereas histone deacetylase are corepressors. A bromodomain is comprised of about 110 amino acids that recognize acetylated lysines on the N-terminals of histone tails [157].

Class I HDACs, HDAC2 and HDAC3, negatively regulate learning and memory, while HDAC1 plays a role in memory extinction. For example, the overexpression of HDAC2 in neurons provoked dendritic synaptic plasticity and memory formation impairment, while HDAC2 deletion enhanced memory [158]. Also, mutations in CBP, a well-known transcriptional coactivator that has HAT activity, contributes to the pathology of Rubinstein-Taybi syndrome, a neurodevelopment disorder characterized by cognitive impairment [159]. The cognitive enhancement provoked by the deletion of HDAC was accompanied by increased hippocampal histone acetylation, specifically at the promoter region of genes involved in synaptic plasticity and memory, such as synaptophysin and BDNF. Acetylation of H3 and H4 around BDNF promoters is characterized by fear conditioning memory [160]. It has also been shown that CBP is recruited to the *c-fos* gene promoter in an activity-dependent manner, which promotes memory formation and consolidation [38].

#### 5.1.2. Cognition and the methylation of the BDNF promoter IV

BDNF is a member of the nerve growth factor family of neurotrophins, and plays central roles in the development, physiology, and pathology of the nervous system. BDNF induces neuroprotective activities, including survival and differentiation of neurons, by binding and activating the tropomyosin receptor kinase B (TrkB), a member of the larger family of Trk receptors, localized both on the pre-synaptic and post-synaptic membranes. TrkB-binding orchestrates the stabilization and strengthening of synaptic connections by the induction of several signaling cascades that are involved in the regulation of synaptic plasticity and cAMP-responsive, element-binding, protein (CREB)-dependent gene expression [161]. One of the downstream targets of BDNF signaling is the activity-regulated, cytoskeleton-associated protein (ARC), which is a member of the immediate-early gene family and is important in synaptogenesis and synaptic plasticity as well as anxiety and alcohol intake phenotypes [162]. Therefore, BDNF regulates synaptic transmission and plasticity and also plays a fundamental role in learning and memory during development and in adults [163]. In the adult rodent brain, BDNF is widely distributed with the highest mRNA and protein levels in the hippocampus, amygdala, cerebral cortex, and hypothalamus [164]. In humans, BDNF has a similar brain distribution, and it is also present in peripheral tissues and blood [165]. Blood BDNF levels reflect brain concentrations [165].

**Table 5**  
Epigenetic modifications identified in blood or *postmortem* tissues from individuals affected by reduced cognitive performance.

DNA methylation	Cognitive impairment	Biological sample
Hypomethylation of pro-inflammatory genes: NF- $\kappa$ B; COX-2	AD	frontal cortex [122]
Hypermethylation of neuronal genes: BDNF and synaptophysin with reduced content of BDNF (neuroplasticidade; cognition)	AD	frontal cortex [122,123]
Global hypomethylation in neuronal nuclei in neocortex	AD	temporal neocortex and cerebellum [124]
Global hypomethylation and hydroxymethylation in glia and neurons	AD	hippocampus [125]
Genome-wide analysis: 918 differentially methylated genes (CpG sites); highest ranking genes: TMEM59 and TMEM2	AD	frontal cortex [126–128]
Hypomethylation of S100A2 gene	AD	temporal neocortex [129]
Hypermethylation of SORBS3 gene (cytoskeleton organization)	AD	temporal neocortex [129]
Hypomethylation of APP gene (amyloid deposit)	AD	frontal cortex [130]
Hypermethylation of OPRK1 OPRM1-CpG1 hypermethylation and OPRM1-CpG2-4 hypomethylation (risk factors for MCI is specific Chinese populations; opioid receptor)	MCI	blood [131]
Hypermethylation of SORL1 gen (receptor of APOE in the brain; higher methylation in MCI + T2D than in T2D or MCI alone)	MCI	PMBC [132]
Hypermethylation of the SORL1 gene promoter region	AD	hippocampus [133] frontal cortex [133]
Histone modification	Cognitive impairment	Biological sample
Decreased acetylation of H3 (repression of gene expression)	AD	temporal lobe [134]
Increased phosphorylation of H3 in neurons (cytoplasmic)	AD	hippocampus [135]
Increased levels of HDAC2 in CA1 neurons (negative regulation of synaptic function)	AD	hippocampus [136]
Reduced SIRT1 levels (AD: 4X reduction and MCI: 2X reduction vs. young controls and 2X and 1.3X vs. geriatric controls, respectively)	AD / MCI	plasma [137]
ncRNA	Cognitive impairment	Biological sample
hsa-miR-34a <sup>*</sup> ; hsa-miR-579; hsa-miR-181b <sup>*</sup> ; hsa-miR-520h; hsa-miR-155; hsa-miR-517 <sup>*</sup> ; hsa-let-7f <sup>*</sup> ; hsa-miR-200a <sup>*</sup> ; hsa-miR-37 <sup>*</sup> (downregulate APP catabolism; hsa-let-7f: activation TLR7 and causes neurodegeneration)	AD #AD + positive for ApoE <sub>4</sub> *AD + negative for ApoE <sub>4</sub>	PBMC [138]
hsa-let-7d-5p; hsa-let-7g-5p; hsa-miR-15b-5p; hsa-miR-142-3p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-301a-3p; hsa-miR-545-3p (AD signature)	AD	plasma [139]
Reduced expression of hsa-miR-27a-3p	AD	CSF [140]
Reduced expression of miR-9 and miR-132 (miR-9: neurogenesis; miR-132: BDNF expression, neurite extension and neurogenesis)	AD	Hippocampus [140]
Increased expression of miR-146b; miR-181a; miR-142 (miR-146b: innate immunity; miR-181a and miR-142: T-cell activation and differentiation)	AD	CSF [140]
miR-34c (repression of Bcl2 and Sirt1 involved in cell survival and oxidative defense pathways)	AD	plasma [141] PBMC [141]
Top 10 upregulated long ncRNAs: lnc-FAM53B-2_1, ENST00000615844.1, lnc-MYL2-2_1, lnc-NKD2-1_1, lnc-EVC-3_1, lnc-SLCSA7-1_1, NR_024101, lnc-DCP1B-6_1, lnc-MNAT1-8_1, and lnc-TNFRSF19-4_1	POCD	serum [142]
Top 10 downregulated long ncRNAs: NR_024187, lnc-PTPRU-7_1, lnc-LIPC-6_1, lnc-CTD-2144E22.5.1-26_1, lnc-OTX1-7_1, ENST00000618386.1, lnc-PRL-9_1, lnc-PAG1-9_1, lnc-ZNF729-4_1, and lnc-RAP2C-5_1	POCD	Serum [142]

AD: Alzheimer's disease; APP:  $\beta$ -amyloid precursor protein; MCI: Mild cognitive impairment; T2D: Type 2 diabetes; POCD: Postoperative cognitive dysfunction

The BDNF gene has a complex regulatory and genetic structure, with 9 different promoters encoding at least 20 different splice variants, sharing one common exon that encodes the BDNF protein (known as exon IX) [166]. A BDNF-antisense transcript has been described to be a negative regulator of BDNF exon IX expression and to compromise neurogenesis and cognition [167–169]. Each exon is regulated by its own unique promoter, conferring temporal and spatial control of BDNF expression in an activity-dependent manner. The eight upstream exons encode promoters regulating regional and cell-type-specific expression. Exon IV has been the most extensively characterized, since the containing-promoter elements regulate activity-dependent BDNF expression. Elevated BDNF exon IV DNA methylation is a mechanism for BDNF down-regulation demonstrated in rodents and in humans, leading to lower content of BDNF in the brain (hippocampus and pre-frontal cortex) and in the blood [170–173].

### 5.1.3. Cognition and the methylation of the REST promoter

REST [RE1-silencing transcription factor (otherwise called neuron-restrictive silencer factor)] is widely known to work as a master transcription factor that represses neuronal genes in non-neuronal cells

during differentiation [174]. However, the better understanding of the REST-binding motifs increased the number of potential REST targets, at all stages of cell differentiation (by several thousand), and now it is known that REST also promotes gene expression at all stages of cell differentiation [175,176].

REST down-regulates genes linked to cell-death and enhances the expression of others that induce resistance to ageing and the preservation of cognitive function in adult neurons [66,177]. For example, it was reported that REST positively modulates CREB expression, inhibits reactive oxygen species production, preserves mitochondrial integrity, physiology and distribution and prevents apoptosis [78,178,179]. In this scenario, it has been proposed that REST may play a role in protecting against neurodegenerative processes [78,177,180].

In the adult rat brain, REST mRNA has been detected at higher levels in cells displaying neuronal properties, including the olfactory system (in the granule cell layer and the plexiform layers), cerebral cortex, hippocampal formation, diencephalon (thalamus and hypothalamus), midbrain (such as substantia nigra pars compacta), brain stem (such as pontine nuclei), and cerebellum, with the highest levels detected in the neurons of the hippocampus, pons/medulla, and midbrain

**Table 6**  
Main epigenetics alterations induced by exercise to promote enhanced cognition

Exercise paradigm (model)	Epigenetic mechanism (brain region)	Mediators of enhanced cognition (brain region)
Voluntary wheel running (adult rats; 7 days of exercise) [187]	DNA demethylation at the BDNF promoter IV; increased levels of MeCP2; increased H3 acetylation; reduction of HDAC5 mRNA levels and protein (hippocampus)	Increased mRNA and content of BDNF (hippocampus)
Voluntary wheel running (adult and aged mice; 8 weeks of exercise) [177]	Possibly hypomethylation of REST promoter (hyperglycemia-induced hypermethylation of REST promoter reduces REST and BDNF levels [72]) (hippocampus)	Increased mRNA of BDNF and REST; attenuation of inflammation (hippocampus)
Voluntary wheel running (young mice; 4 weeks of exercise) [149]	Reduced HDAC2 and HDAC3 expression; reduced HDAC3 occupancy (binding) (hippocampus)	Increased D- $\beta$ -hydroxybutyrate levels (HDAC inhibitor); increased BDNF promoter I and II expression; increased BDNF content (hippocampus)
Voluntary wheel running (adolescent mice; 7 days of exercise) [188]	Increased global H3 acetylation; reduction activity of DNMTs; reduction activity of DNMTs; (hippocampus; cerebellum)	Increased BDNF gene expression (hippocampus)
Voluntary wheel running (adult rats with blocked BDNF action; 3 days) [189]	TrkB-IgG chimera antagonist of BDNF (hippocampal injection)	Reduction of exercised-induced increased synapsin I and synaptophysin (hippocampus)
Voluntary wheel running (adult mice; 15 days) [190]	Upregulation of 20 miRNAs; downregulation of 12 miRNA (hippocampus)	Reduced miR-21; reduced miR-34a (hippocampus)
Voluntary wheel running (adult mice; 4 weeks) [191]	Increased glucocorticoid receptor (Nr3c1) expression; increased methylation of Nr3c1-1F promoter (hippocampus)	Reduced miR-34a (hippocampus)
Treadmill running (adult senescent mice; 60 min a day, 5 days a week; 4 weeks) [192]	Activation of HAT and HDAC (1-11) (hippocampus)	Increased BDNF expression; reduced p75 transcription (apoptosis signaling) (hippocampus)
Treadmill running (adult and aged rats; 20 min, 2 weeks) [193]	Increased global H4 activity in aged rats (hippocampus)	Reduced inflammation (hippocampus)
Treadmill running (adult paternal rats; 60% of VO2 max, 22 days)	Unknown (paternal exercise-induced changes in the offspring)	Reduced global DNA methylation (adult male offspring hippocampus)
Swimming exercise (adult mice; 4 sessions of 5 min per day; 4 weeks) [194]	Increased acetylation of H3K9, H3K14, H4K5, H4K8, and H4K12 1h after the first session and 24 h after the fifth session; increased acetylation of H3K9 up to 4 weeks (hippocampus)	Increased cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP) levels (CA1 – hippocampus)

[181]. Increased expression of REST could be induced acutely by toxicants as a compensatory neuroprotection [181,182]. However, our group recently demonstrated that REST expression could be physiologically induced in the adult hippocampus by voluntary exercise. The increased REST gene expression induced by physical exercise was shown to occur in parallel to the increased BDNF expression and inversely to the pro-inflammatory status in the aged mouse hippocampus [177].

It has been reported that REST is lost from the nucleus of hippocampal and cortical neurons in many diseases of chronic progression with cognitive impairments, including several forms of dementia, such as AD, frontotemporal dementia, and dementia with Lewy bodies [66]. However, REST levels were shown to be associated with a significant induction of REST in neuronal nuclei together with increased REST binding to target genes in post-mortem samples of prefrontal cortices (PFC) from aged individuals. REST expression is significantly higher in aged individuals (73–106 years) than in younger adults (20–35 years) and also in aged mice [66,177].

The relationship between enhanced cognition and REST activity appears to be related to the repression of cell death-associated genes, suggesting that REST might be neuroprotective. Indeed, mice lacking REST exhibited cognitive impairment and progressive neurodegeneration, including neuronal loss in the hippocampus and cortex.

Our group recently demonstrated that the REST promoter is hypermethylated, leading to lower expression and content of REST specifically in the hippocampus of hyperglycemic rats with cognitive impairment [72]. Hypermethylated DNA has been linked to reduced binding of many transcription factors, including phosphorylated CREB [183], and REST is known to bind promoter regions with low methylation levels [184]. The increased methylation of REST was not due to increased methylation activities by DNMTs, but due to defective active demethylation. In addition, our group also demonstrated that the correction of the metabolic disturbances by administering insulin prevented the cognitive alterations in hyperglycemic rats and also rescued compromised REST expression and levels in the hippocampus [72]. Lower levels of REST were also observed in PBMC from obese children,

and were more compromised in severely obese children, linking REST promoter methylation to BMI, adiposity and obesity.

## 5.2. Exercise promoting epigenetic neuroprotective modifications

It is well understood that the regular practice of physical exercise improves health by contributing to disease prevention and helping recovery from illness. It has been extensively demonstrated that exercise, with or without dietary intervention, can cause modification in the genome allowing gene expression/repression of genes that will enhance, *i.e.*, learning, cognition and memory. These processes are accompanied by increased cell proliferation and survival in the hippocampus of rodents [185,186]; effects that are mediated, in part, by increased production and secretion of BDNF and possibly by hypomethylation of REST promoter. Table 6 shows the main epigenetics alterations induced by exercise to promote enhanced cognition.

As shown in Table 6, exercise has the extraordinary potential to promote immediate and stable changes in hippocampal gene function that enhances cognition (upregulating mnemonic and repressing harmful pathways), independently of the exercise paradigm. Although Table 6 denotes the main epigenetic modifications induced by exercise (DNA methylation and histone modifications, and miRNAs) and the increased hippocampal biochemical mediators of cognition, enhanced mnemonic activity driven by exercise also provokes increased levels of hippocampal IGF-1,  $\beta$ -CaMKII and Akt [195], pCREB [194], glutamate [196], growth factors [197], lactate [198], irisin [199,200] or IL-6 [201], which might also be controlled by epigenetics modifications. Altogether, the exercise-induced adaptations, specifically in the hippocampus, remodeled chromatin, facilitating the access of cognitive mediators to BDNF promoter regions, resulting in greater BDNF expression and content.

### 5.2.1. Exercise modifications induced by the ergogenic drug caffeine

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is a widely consumed social psychoactive drug in western society that increases physical and cognitive performance [202–205]. It is the main ergogenic resource used by elite



athletes [206]. Besides ergogenic and psychoactive effects, several epidemiologic studies have shown that regular consumption of caffeine, mainly in infusions, delays the progression of dementia [207–209] and also decreases the probability of developing neurodegenerative diseases, including AD and PD. Studies of dementia in animal models have also highlighted the neuroprotective effects of caffeine [210–213].

Most biological effects of caffeine are mediated through the antagonism of all types of adenosine receptors (AR). Caffeine antagonizes mostly A1R and A2R subtypes in the CNS. Caffeine is also an inhibitor of phosphodiesterases, which provokes increased levels of cAMP, induces the release of calcium from intracellular storages, and acts as a non-competitive inhibitor of acetylcholinesterase [214–216]. These effects appear to underlie caffeine-driven enhanced learning and memory. However, there is some evidence that caffeine may also inhibit HDAC activity, allowing for higher BDNF expression and content in the hippocampus of rats [217,218].

### 5.3. Epigenetic benefits of exercise on cognition in obesity

Individuals affected by common chronic metabolic diseases present altered patterns of DNA methylation [63–65] and compromised expression of neuroprotective genes, which favors neurotoxicity and cognitive impairment or dementia [66]. Although the negative impact of this pandemic chronic disease on cognition has been investigated extensively in humans and experimental animals, its prevention or treatment is far from being successful. It is known that obesity negatively regulates hippocampal BDNF expression [85,86], and low blood and brain BDNF content has been observed in obese individuals and animal models with cognitive impairment [87]. Therapy for obesity, including GLP-1 signaling or physical exercise, among others, is known to increase BDNF levels (see Table 6) [219]. An increasing number of identified harmful pathways induced by obesity compromise cognition by promoting specific epigenetic profiles (see Table 1, Table 4a and Table 4b). Some of these alterations, including the induction of oxidative stress, inflammation, mitochondrial dysfunction, and reduced mneemonic activity have been linked to epigenetic modifications (Table 1, Table 4a and Table 4b). Physical exercise can potentially revert or prevent many of them; however, the understanding of chromatin remodeling induced by this drug-free intervention in obesity-driven cognitive impairment has not been extensively elucidated or confirmed.

## 6. Conclusion

The high caloric intake associated with low-energy expenditure is a major risk factor for the development of obesity in individuals from all age groups. It is well established that insulin resistance and obesity are primary factors for cognitive impairment and are associated with higher risk of developing neurodegenerative diseases. Obesity and peripheral metabolic alterations negatively modulate gene transcription pathways that interplay to compromise BDNF and REST levels in the hippocampus, two primordial mediators of cognitive processes. To counterbalance the harmful scenario induced by obesity, physical exercise has been prescribed by doctors as the first line of non-pharmacological treatment. A better understanding of the molecular mechanisms involved in enhanced cognition induced by exercise, in particular those related to reversible epigenetic alterations, will allow for the prescription of appropriate exercise protocols, which will ultimately result in better cognitive outcomes.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgements and funding

The authors are grateful to Theodore Griswold for language editing.

This work was supported by the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, grant numbers 304650/2016-1;401842/2018-5), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil, grant number 88887.192493/2018-00), FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina, grant number TO2018TR1196), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, grant number 2016/01139-0) and PAHO (Pan American Health Organization, grant number SCON2018-00402). Latini A is a CNPq fellow.

## References

- [1] WHO. Obesity and Overweight. *WORLD Heal. Organ*, 2018, p. 1.
- [2] E. Smith, P. Hay, L. Campbell, J.N. Trollor, A review of the association between obesity and cognitive function across the lifespan: implications for novel approaches to prevention and treatment. *Obes. Rev.* 12 (2011) 740–755. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2011.00920.x>.
- [3] X.E.C. Cope, E.A. Lamarca, X.P.K. Monari, L.B. Olson, S. Martinez, A.D. Zych, X.N.J. Katchur, X.E. Gould, Microglia Play an Active Role in Obesity-Associated Cognitive Decline. *J Neurosci.* 38 (2018) 8889–8904. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0799-18.2018>.
- [4] L.A. Profenno, A.P. Porsteinsson, S.V. Faraone, Meta-analysis of alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol. Psychiatry.* 67 (2010) 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.02.013>.
- [5] B. Strasser, Physical activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 1281 (2013) 141–159. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06785.x>.
- [6] U.S. Department of Health and Human Services, *Physical Activity Guidelines for Americans*, Washington, D.C (2018).
- [7] F. Rosa Jr., J. Pedro Fuentes, A. Pertile Remor, K. Ghisoni, P. César Lock Silveira, V. Costa, R. Luiz Prim, D. da Luz Scheffer, A. Silva Aguiar, L.G. Antonacci Guglielmo, A. Latini, A tennis-based health program for middle-aged men who are at risk for heart disease. *Integr. Obes. Diabetes* 3 (2017) 1–6.
- [8] F. Gomez-Pinilla, C. Hillman, The influence of exercise on cognitive abilities. *Compr. Physiol.* 3 (2013) 403–428. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110063>.
- [9] C.H. Hillman, M.B. Pontifex, L.B. Raine, D.M. Castelli, E.E. Hall, A.F. Kramer, The effect of acute treadmill walking on cognitive control and academic achievement in preadolescent children. *Neuroscience.* 159 (2009) 1044–1054. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.057>.
- [10] T. Ngandu, J. Lehtisalo, A. Solomon, E. Levähti, S. Ahtiluoto, R. Antikainen, L. Bäckman, T. Hänninen, A. Jula, T. Laatikainen, J. Lindström, F. Mangialasche, T. Paajanen, S. Pajala, M. Peltonen, R. Rauramaa, A. Stigsdotter-Neely, T. Strandberg, J. Tuomilehto, H. Soininen, M. Kivipelto, A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet* 385 (2015) 2255–2263.
- [11] J. Jeon, J. Han, H. Kim, M. Soo, D. Yun, Y. Kwak, The Combined Effects of Physical Exercise Training and Detraining on Adiponectin in Overweight and Obese Children. *J. Child Psychol. Psychiatr.* 54 (2013) 145–150.
- [12] E. Benito, C. Kerimoglu, B. Ramachandran, T. Pena-Centeno, G. Jain, R.M. Stilling, M.R. Islam, V. Capece, Q. Zhou, D. Edbauer, C. Dean, A. Fischer, RNA-dependent intergenerational inheritance of enhanced synaptic plasticity after environmental enrichment. *Cell Rep.* 23 (2018) 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.059>.
- [13] C.H. Waddington, The epigenotype. *Int. J. Epidemiol.* 41 (2012) (1942) 10–13. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>.
- [14] J. Tost, DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol. Biotechnol.* 44 (2010) 71–81. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9216-2>.
- [15] C. Sawan, T. Vaissiere, R. Murr, Z. Herceg, Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat. Res.* 642 (2008) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.mrfimm.2008.03.002>.
- [16] J. Turek-Plewa, P.P. Jagodzinski, The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10 (2005) 631–647.
- [17] J.T. Attwood, R.L. Yung, B.C. Richardson, DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 241–257. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11915942>.
- [18] C. Loenarz, C.J. Schofield, Oxygenase catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation. *Chem. Biol.* 16 (2009) 580–583. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.06.002>.
- [19] E.A. Minor, B.L. Court, J.I. Young, G. Wang, Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 13669–13674. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.464800>.
- [20] A. Inoue, Y. Zhang, Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* 80 (2011) 334.
- [21] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S.C. Wu, L.B. Collins, J.A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science.* 333 (2011) 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>.
- [22] Y. He, B. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, Tet-mediated Formation of 5-Carb. *Science* 333 (2012) 1303–1307.
- [23] T. Kouzarides, Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128 (2007)

- 693–705, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
- [24] E. Fedorova, D. Zink, Nuclear architecture and gene regulation, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783 (2008) 2174–2184, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.018>.
- [25] E.R. Kandel, The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB, *Mol. Brain*. 5 (2012) 1–12, <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-14>.
- [26] S. Ortega-Martínez, A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis, *Front. Mol. Neurosci.* 8 (2015) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00046>.
- [27] N. Sengupta, E. Seto, Regulation of histone deacetylase activities, *J. Cell. Biochem.* 93 (2004) 57–67, <https://doi.org/10.1002/jcb.20179>.
- [28] G.P. Delcuve, D.H. Khan, J.R. Davie, Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors, *Clin. Epigenetics*. 4 (2012) 5, <https://doi.org/10.1186/1868-7083-4-5>.
- [29] B.D. Strahl, C.D. Allis, The language of covalent histone modifications, *Nature*. 403 (2000) 41–45, <https://doi.org/10.1038/47412>.
- [30] J.C. Black, C. Van Rechem, J.R. Whetstone, Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact, *Mol. Cell*. 48 (2012) 491–507, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.006>.
- [31] C. Martin, Y. Zhang, The diverse functions of histone lysine methylation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 838–849, <https://doi.org/10.1038/nrm1761>.
- [32] S. Rea, F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B.D. Strahl, Z.W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C.P. Ponting, C.D. Allis, T. Jenuwein, Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases, *Nature*. 406 (2000) 593–599, <https://doi.org/10.1038/35020506>.
- [33] D. Moazed, Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence, *Nature*. 457 (2009) 413–420, <https://doi.org/10.1038/nature07756>.
- [34] T. Kiss, Biogenesis of small nuclear RNPs, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 5949–5951, <https://doi.org/10.1242/jcs.01487>.
- [35] P.D. Zamore, M. Ghildiyal, Small silencing RNAs: an expanding universe, *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 94–108, <https://doi.org/10.1038/nrg2504>.
- [36] K.C. Wang, H.Y. Chang, Molecular mechanisms of long noncoding RNAs, *Mol. Cell*. 43 (2011) 94–914, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>.
- [37] J.L. Rinn, H.Y. Chang, Genome regulation by long noncoding RNAs, *Annu. Rev. Biochem.* 81 (2012) 145–166, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051410-092902>.
- [38] E. Korzus, M.G. Rosenfeld, M. Mayford, CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation, *Neuron*. 42 (2004) 961–972, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.002>.
- [39] T. Takizawa, E. Meshorer, Chromatin and nuclear architecture in the nervous system, *Trends Neurosci.* 31 (2008) 343–352, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.03.005>.
- [40] E.R. Werner, N. Blau, B. Thöny, Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology, *Biochem. J.* 438 (2011) 397–414, <https://doi.org/10.1042/BJ20110293>.
- [41] B. Thöny, G. Auerbach, N. Blau, B. Thöny, G. Auerbach, N. Blau, Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions, *Biochem. J.* 347 (Pt 1) (2000) 1–16, <https://doi.org/10.1042/0264-6021.3470001>.
- [42] H. Hirakawa, H. Sawada, Y. Yamahama, S.I. Takikawa, H. Shintaku, A. Hara, K. Mase, T. Kondo, T. Iino, Expression analysis of the Aldo-keto reductases involved in the novel biosynthetic pathway of tetrahydrobiopterin in human and mouse tissues, *J. Biochem.* 146 (2009) 51–60, <https://doi.org/10.1093/jb/mvp042>.
- [43] D.E. Jensen, A.R. Black, A.G. Swick, J.C. Azizkhan, Distinct roles for Sp1 and E2F sites in the growth/cell cycle regulation of the DHFR promoter, *J. Cell. Biochem.* 67 (1997) 24–31, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19971001\)67:1<24::AID-JCB3>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19971001)67:1<24::AID-JCB3>3.0.CO;2-Y).
- [44] M.J. Chen, T. Shimada, A.D. Moulton, A. Cline, R.K. Humphries, J. Maizel, A.W. Nienhuis, The functional human dihydrofolate reductase gene, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 3933–3943.
- [45] C. Holmquist, S. Larsson, A. Wolk, U. de Faire, Multivitamin supplements are inversely associated with risk of myocardial infarction in men and women—Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP), *J. Nutr.* 133 (2003) 2650–2654, <https://doi.org/10.1093/jn/133.8.2650>.
- [46] S.A. Lamprecht, M. Lipkin, Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms, *Nat. Rev. Cancer*. 3 (2003) 601–614, <https://doi.org/10.1038/nrc1144>.
- [47] R.W. Smithells, S. Sheppard, C.J. Schorah, Vitamin deficiencies and neural tube defects, *Arch. Dis. Child.* 51 (1976) 944–950, <https://doi.org/10.1136/adc.51.12.944>.
- [48] K.M. Laurence, N. James, M.H. Miller, G.B. Tennant, H. Campbell, Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects, *BMJ*. 282 (1981) 1509–1511, <https://doi.org/10.1136/bmj.282.6275.1509>.
- [49] C.M. Campbell, R.R. Edwards, C. Carmona, M. Uhart, G. Wand, A. Carteret, Y.K. Kim, J. Frost, J.N. Campbell, Polymorphisms in the GTP cyclohydrolase gene (GCH1) are associated with ratings of capsacin pain, *Pain*. 141 (2009) 114–118, <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.10.023>.
- [50] S.J.F. Cronin, C. Seehus, A. Weidinger, S. Talbot, S. Reissig, T. Kreslavsky, M. Kogler, D. Hoffmann, M. Ticevic, D. Luz, The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer, *Nature* 563 (2018) 564–568.
- [51] L. Chen, X. Zeng, J. Wang, S.S. Briggs, E. O'Neill, J. Li, R. Leek, D.J. Kerr, A.L. Harris, S. Cai, Roles of tetrahydrobiopterin in promoting tumor angiogenesis, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 2671–2680, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100025>.
- [52] Y.-I. Yoshida, S. Eda, M. Masada, Alterations of tetrahydrobiopterin biosynthesis and pteridine levels in mouse tissues during growth and aging, *Brain Dev.* 22 (2000) 45–49, [https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(00\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(00)00144-3).
- [53] J.K. Bendall, G. Douglas, E. McNeill, K.M. Channon, M.J. Crabtree, Tetrahydrobiopterin in cardiovascular health and disease, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 3040–3077, <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5566>.
- [54] F. Xu, Y. Sudo, S. Sanechika, J. Yamashita, S. Shimaguchi, S. Honda, C. Sumiichinose, M. Mori-Kojima, R. Nakata, T. Furuta, M. Sakurai, M. Sugimoto, T. Soga, K. Kondo, H. Ichinose, Disturbed biopterin and folate metabolism in the Qdpr-deficient mouse, *FEBS Lett.* 588 (2014) 3924–3931, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.004>.
- [55] J.D. Bryant, S.R. Sweeney, E. Sentandreu, M. Shin, H. Ipas, B. Xhemalce, J. Momb, S. Tiziani, D.R. Appling, Deletion of the neural tube defect-associated gene Mthfd11 disrupts one-carbon and central energy metabolism in mouse embryos, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 5821–5833, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002180>.
- [56] Y. Zheng, T.-Y. Lin, G. Lee, M.N. Paddock, J. Momb, Z. Cheng, Q. Li, D.L. Fei, B.D. Stein, S. Ramsamooj, G. Zhang, J. Blenis, L.C. Cantley, Mitochondrial one-carbon pathway supports cytosolic folate integrity in cancer cells, *Cell* 175 (2018) 1546–1560.
- [57] M.J. Crabtree, A.L. Tatham, A.B. Hale, N.J. Alp, K.M. Channon, Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 28128–28136, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041483>.
- [58] L. Wang, S. Shanguan, S. Chang, X. Yu, Z. Wang, X. Lu, L. Wu, T. Zhang, Determining the association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and genomic DNA methylation level: A meta-analysis, *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 106 (2016) 667–674, <https://doi.org/10.1002/bdra.23511>.
- [59] P.K. Chiang, R.K. Gordon, J. Tal, G.C. Zeng, B.P. Doctor, K. Pardhasaradhi, P.P. McCann, S-Adenosylmethionine and methylation, *FASEB J.* 10 (1996) 471–480.
- [60] M.E. Hyndman, S. Verma, R.J. Rosenfeld, T.J. Anderson, H.G. Parsons, Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 282 (2002) H2167–H2172, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00935.2001>.
- [61] A.L. Miller, The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression, *Altern. Med. Rev.* 13 (2008) 216–226, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18950248>.
- [62] E.S.G. Stroes, E.E. Van Faassen, M. Yo, P. Martasek, P. Boer, R. Govers, T.J. Rabelink, Folic acid reverses dysfunction of endothelial nitric oxide synthase, *Circ. Res.* 9 (2000) 1129–1134, <https://doi.org/10.1161/01.RES.86.11.1129>.
- [63] M. Schlenos, L. Magnus, T. Heide, J. Eschenbruch, F. Steib, M. Tator, V. Kloten, M. Rose, E. Noetzel, N.T. Gaisa, R. Knuchel, E. Dahl, Epigenetic loss of putative tumor suppressor SFRP3 correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients, *Epigenetics*. 13 (2016) 214–227, <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1229730>.
- [64] E. Masliah, W. Dumaop, D. Galasko, P. Desplats, Identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes: Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease, *Epigenetics*. 8 (2013) 1030–1038, <https://doi.org/10.4161/epi.25865>.
- [65] A.R. Smith, R.G. Smith, D. Condliffe, E. Hannon, L. Schalkwyk, J. Mill, K. Lunnon, Increased DNA methylation near TREM2 is consistently seen in the superior temporal gyrus in Alzheimer's disease brain, *Neurobiol. Aging*. 47 (2016) 35–40, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.008>.
- [66] T. Lu, L. Aron, J. Zullo, Y. Pan, H. Kim, Y. Chen, T.-H. Yang, H.-M. Kim, D. Drake, X.S. Liu, D.A. Bennett, M.P. Colaiacovo, B.A. Yankner, REST and stem resistance in ageing and Alzheimer's disease, *Nature*. 507 (2014) 448–454, <https://doi.org/10.1038/nature13163>.
- [67] X. Wang, H. Zhu, H. Snieder, S. Su, D. Munn, G. Harshfield, B.L. Maria, Y. Dong, F. Treiber, B. Gutin, H. Shi, Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes, *BMC Med.* 8 (2010) 87–94, <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-87>.
- [68] H.C. Wu, L. Delgado-Cruzada, J.D. Flom, M. Kappil, J.S. Ferris, Y. Liao, R.M. Santella, M.B. Terry, Global methylation profiles in DNA from different blood cell types, *Epigenetics*. 6 (2011) 76–85, <https://doi.org/10.4161/epi.6.1.13391>.
- [69] F.F. Zhang, R. Cardarelli, J. Carroll, K.G. Fulda, M. Kaur, K. Gonzalez, J.K. Vishwanatha, R.M. Santella, A. Morabia, Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood, *Epigenetics*. 6 (2011) 623–629, <https://doi.org/10.4161/epi.6.5.15335>.
- [70] L.K. Park, S. Friso, S.W. Choi, Nutritional influences on epigenetics and age-related disease, in: *Proc. Nutr. Soc.* 71 (2012) 75–83, <https://doi.org/10.1017/S0029665111003302>.
- [71] F. He, A. Berg, Y. Imamura Kawasawa, E.O. Bixler, J. Fernandez-Mendoza, E.A. Whitsel, D. Liao, Association between DNA methylation in obesity-related genes and body mass index percentile in adolescents, *Sci. Rep.* 9 (2019) 2079, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38587-7>.
- [72] A.P. Remor, R.A. da Silva, F.J. de Matos, V. Glaser, R. de Paula Martins, K. Ghisoni, D. da Luz Scheffer, D.C. Andia, D. Portinho, A.P. de Souza, P.A. de Oliveira, R.D. Prediger, A.I. Torres, R.M.M. Linhares, R. Walz, M.F. Ronsoni, A. Hohl, A. Rafacho, A.S. Aguiar, A.L. de Paul, A. Latini, Chronic metabolic derangement-induced cognitive deficits and neurotoxicity are associated with rest inactivation, *Mol. Neurobiol.* 56 (2018) 1539–1557, <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1175-9>.
- [73] D. Fradin, P.-Y. Boëlle, M.-P. Belot, F. Lachaux, J. Tost, C. Besse, J.-F. Deleuze, G. De Filippo, P. Bougnères, Genome-wide methylation analysis identifies specific epigenetic marks in severely obese children, *Sci. Rep.* 7 (2017) 46311–46318,

- <https://doi.org/10.1038/srep46311>.
- [74] K.J. Dick, C.P. Nelson, L. Tsaprouni, J.K. Sandling, D. Aïssi, S. Wahl, E. Meduri, P.-E. Morange, F. Gagnon, H. Grallert, M. Waldenberger, A. Peters, J. Erdmann, C. Hengstenberg, F. Cambien, A.H. Goodall, W.H. Ouwehand, H. Schunkert, J.R. Thompson, T.D. Spector, C. Gieger, D.-A. Tréguët, P. Deloukas, N.J. Samani, DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis, *Lancet* (London, England) 383 (2014) 1990–1998.
- [75] P. Kuehnen, M. Mischke, S. Wiegand, C. Sers, B. Horsthemke, S. Lau, T. Keil, Y.-A. Lee, A. Grueter, H. Krude, An Alu element-associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity, *PLoS Genet.* 8 (2012) 1–12, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002543>.
- [76] R. Barros, H. Kirchner, M. Rasmussen, J. Yan, F.R. Kantor, A. Krook, E. Näslund, J.R. Zierath, Weight loss after gastric bypass surgery in human obesity remodels promoter methylation, *Cell Rep.* 3 (2013) 1020–1027, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.018>.
- [77] R. Clarke-Harris, T.J. Wilkin, J. Hosking, J. Pinkney, A.N. Jeffery, B.S. Metcalf, K.M. Godfrey, L.D. Voss, K.A. Lillycrop, G.C. Burdge, PGC1 $\alpha$  promoter methylation in blood at 5–7 years predicts adiposity from 9 to 14 years (EarlyBird 50), *Diabetes.* 63 (2014) 2528–2537, <https://doi.org/10.2337/db13-0671>.
- [78] T. Lu, L. Aron, J. Zullo, Y. Pan, H. Kim, Y. Chen, T.H. Yang, H.M. Kim, D. Drake, X.S. Liu, D. Bennett, M.P. Colaiacovo, B. Yanker, REST and stress resistance in ageing and Alzheimer disease, *Nature* 507 (2014) 448–454.
- [79] J. Zhao, J. Goldberg, V. Vaccarino, Promoter methylation of serotonin transporter gene is associated with obesity measures: A monozygotic twin study, *Int. J. Obes.* 37 (2013) 140–145, <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.8>.
- [80] A.J. Drake, R.C. McPherson, K.M. Godfrey, C. Cooper, K.A. Lillycrop, M.A. Hanson, R.R. Meehan, J.R. Seckl, R.M. Reynolds, An unbalanced maternal diet in pregnancy associates with offspring epigenetic changes in genes controlling glucocorticoid action and foetal growth, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 77 (2012) 808–815, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04453.x>.
- [81] R.-C. Huang, J.C. Galati, S. Burrows, L.J. Beilin, X. Li, C.E. Pennell, J. van Eekelen, T.A. Mori, L.A. Adams, J.M. Craig, DNA methylation of the IGF2/H19 imprinting control region and adiposity distribution in young adults, *Clin. Epigenetics.* 4 (2012) 1–11, <https://doi.org/10.1186/1868-7083-4-21>.
- [82] Y.-T. Huang, J.Z. Maccani, N.L. Hawley, R.R. Wing, K.T. Kelsey, J.M. McCaffery, Epigenetic patterns in successful weight loss maintainers: a pilot study, *Int. J. Obes.* 39 (2015) 865–868, <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.213>.
- [83] S. Bathina, U.N. Das, Brain-derived neurotrophic factor and its clinical Implications, *Arch. Med. Sci.* 11 (2015) 1164–1178, <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342>.
- [84] S.J. Mowla, H.F. Farhadi, S. Pareek, J.K. Atwal, S.J. Morris, N.G. Seidah, R.A. Murphy, Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 12660–12666, <https://doi.org/10.1074/jbc.M008104200>.
- [85] S.M. Abdel-Maksoud, S.I. Hassanein, N.A. Gohar, S.M.M. Attia, M.Z. Gad, Investigation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression in hypothalamus of obese rats: Modulation by omega-3 fatty acids, *Nutr. Neurosci.* 20 (2017) 443–448, <https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1180859>.
- [86] S. Sharma, R. Taliyan, S. Ramagiri, Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, improves learning and memory in high-fat diet-induced cognitive deficits in mice, *J. Mol. Neurosci.* 56 (2015) 1–11, <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0461-x>.
- [87] A.S. Buchman, P.A. Boyle, J.A. Schneider, P.L. De Jager, D.A. Bennett, Higher Brain BDNF Gene Expression is Associated with Slower Cognitive Decline in Older Adults, 86 (2016), pp. 735–781, <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002387>.
- [88] A. Eberhart, P.B. Becker, Histone acetylation: A switch between repressive and permissive chromatin. Second in review on chromatin dynamics, *EMBO Rep* 3 (2002) 224–229.
- [89] B.D. Strahl, P.C. Cogswell, V. Anest, K.A. Steinbrecher, A.S. Baldwin, J.L. Hanson, A nucleosomal function for I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  in NF- $\kappa$ B-dependent gene expression, *Nature.* 423 (2003) 659–663, <https://doi.org/10.1038/nature01648>.
- [90] M. Komaroff, For researchers on obesity: historical review of extra body weight definitions, *J. Obes.* 2016 (2016) 1–9, <https://doi.org/10.1155/2016/2460285>.
- [91] M.C. Haigis, D.A. Sinclair, Mammalian sirtuins: Biological insights and disease relevance, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5 (2010) 253–295, <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250>.
- [92] M.C. Haigis, L.P. Guarente, Mammalian sirtuins - Emerging roles in physiology, aging, and caloric restriction, *Genes Dev.* 20 (2006) 2913–2921, <https://doi.org/10.1101/gad.1467506>.
- [93] A.R. Moschen, V. Wieser, R.R. Gerner, A. Bichler, B. Enrich, P. Moser, C.F. Ebenbichler, S. Kaser, H. Tilg, Adipose tissue and liver expression of SIRT1, 3, and 6 increase after extensive weight loss in morbid obesity, *J. Hepatol.* 59 (2013) 1315–1322, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.027>.
- [94] A.B. Crujeiras, D. Parra, E. Goyenechea, J.A. Martínez, Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction, *Eur. J. Clin. Invest.* 38 (2008) 672–678, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.01998.x>.
- [95] S.B. Pedersen, J. Öhlsson, S.K. Paulsen, M.F. Bennetzen, B. Richelsen, Low Sirt1 expression, which is upregulated by fasting, in human adipose tissue from obese women, *Int. J. Obes.* 32 (2008) 1250–1255, <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.78>.
- [96] Y.S. Song, S.K. Lee, Y.J. Jang, H.S. Park, J.H. Kim, Y.J. Lee, Y.S. Heo, Association between low SIRT1 expression in visceral and subcutaneous adipose tissues and metabolic abnormalities in women with obesity and type 2 diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 101 (2013) 341–348, <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.07.002>.
- [97] L. Vilanova, E. Vernucci, B. Pucci, L. Pellegrini, M. Nebbioso, C. Mauri, G. Marfe, A. Spataro, M. Fini, G. Banfi, M. Russo, M. Tafani, Influence of age and physical exercise on Sirtuin activity in humans, *J Biol Regul Homeost Agents.* 27 (2013) 497–507.
- [98] A. Kurylowicz, M. Owczyarz, J. Polosak, M.I. Jonas, V. Lisik, M. Jonas, A. Chmura, M. Puzianowska-Kuznicka, SIRT1 and SIRT7 expression in adipose tissues of obese and normal-weight individuals is regulated by microRNAs but not by methylation status, *Int. J. Obes.* 40 (2016) 1635–1642, <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.131>.
- [99] S. Jukarainen, S. Heimonen, J.T. Rämö, R. Rinnankoski-Tuikka, E. Rappou, M. Tummers, M. Muniandy, A. Hakkarainen, J. Lundbom, N. Lundbom, J. Kaprio, A. Rissanen, E. Pirinen, K.H. Pietiläinen, Obesity is associated with low nad<sup>+</sup>/sirt pathway expression in adipose tissue of BMI-discordant monozygotic twins, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101 (2016) 275–283, <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3095>.
- [100] R.H. Houtkooper, E. Pirinen, J. Auwerx, Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 225–238, <https://doi.org/10.1038/nrm3293>.
- [101] Y. Du, H. Hu, C. Hua, K. Du, T. Wei, Tissue distribution, subcellular localization, and enzymatic activity analysis of human SIRT5 isoforms, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5 (2018) 763–769, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.073>.
- [102] S. Kumar, D.B. Lombard, Functions of the sirtuin deacetylase SIRT5 in normal physiology and pathobiology, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 53 (2018) 311–334, <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1458071>.
- [103] J. Bricambert, D. Favre, S. Brajkovic, A. Bonnefond, R. Boutry, R. Salvi, V. Plaisance, M. Chikri, G. Chinetti-Gbaguidi, B. Staels, V. Giusti, R. Caiazzo, F. Pattou, G. Waeber, P. Froguel, A. Abderrahmani, Impaired histone deacetylases 5 and 6 expression mimics the effects of obesity and hypoxia on adipocyte function, *Mol. Metab.* 5 (2016) 1200–1207, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.09.011>.
- [104] P. Li, H. Qian, Y. Chen, Z. Nian, L. Su, H. Yu, F.J. Chen, X. Zhang, W. Xu, L. Zhou, J. Liu, J. Yu, L. Yu, Y. Gao, H. Zhang, H. Zhang, S. Zhao, L. Yu, R.P. Xiao, Y. Bao, S. Hou, P. Li, J. Li, H. Deng, W. Jia, HDAC6-mediated acetylation of lipid droplet-binding protein CIDEA regulates fat-induced lipid storage, *J. Clin. Invest.* 127 (2017) 1353–1369, <https://doi.org/10.1172/JCI85963>.
- [105] J.S. Mattick, Non-coding RNAs: The architects of eukaryotic complexity, *EMBO Rep.* 2 (2001) 986–991, <https://doi.org/10.1093/embo-reports/rve230>.
- [106] S. Wei, M. Du, Z. Jiang, G.J. Hausman, L. Zhang, M.V. Dodson, Long noncoding RNAs in regulating adipogenesis: New RNAs shed lights on obesity, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2016) 2079–2087, <https://doi.org/10.1007/s00118-016-2169-2>.
- [107] Y.J. Kim, S.J. Hwang, Y.C. Bae, J.S. Jung, miR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF- $\beta$  signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue, *Stem Cells* 27 (2009) 3093–3102.
- [108] M. Karbiener, D.F. Pisani, A. Frontini, L.M. Oberreiter, E. Lang, A. Vegiopoulos, K. Mössenböck, G.A. Bernhardt, T. Mayr, F. Hildner, J. Grillari, G. Ailhaud, S. Herzig, S. Cinti, E.Z. Amri, M. Scheidele, MicroRNA-26 family is required for human adipogenesis and drives characteristics of brown adipocytes, *Stem Cells.* 32 (2014) 1578–1590, <https://doi.org/10.1002/stem.1603>.
- [109] O. Dumortier, C. Hinault, E. Van Obberghen, MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis, *Cell Metab.* 18 (2013) 312–324, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.004>.
- [110] P. Fischer-Posovszky, J. Roos, P. Kotnik, T. Battelino, E. Inzaghi, V. Nobili, S. Cianfarani, M. Wabitsch, Functional significance and predictive value of MicroRNAs in pediatric obesity: tiny molecules with huge impact? *Horm. Res. Paediatr.* 86 (2016) 3–10, <https://doi.org/10.1159/00044677>.
- [111] R. Wang, J. Hong, Y. Cao, J. Shi, W. Gu, G. Ning, Y. Zhang, W. Wang, Elevated circulating microRNA-122 is associated with obesity and insulin resistance in young adults, *Eur. J. Endocrinol.* 172 (2015) 291–300, <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0867>.
- [112] D.S. Karolina, S. Tavintharan, A. Armugam, S. Sepramaniam, S.L.T. Pek, M.T.K. Wong, S.C. Lim, C.F. Sum, K. Jayaseelan, Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (2012) 1–6, <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1996>.
- [113] Y.T. Wang, P.C. Tsai, Y.C. Liao, C.Y. Hsu, S.H.H. Juo, Circulating microRNAs have a sex-specific association with metabolic syndrome, *J. Biomed. Sci.* 20 (2013) 1–10, <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-72>.
- [114] G. Carreras-Badosa, A. Bonmatí, F.J. Ortega, J.M. Mercader, M. Guindo-Martínez, D. Torrents, A. Prats-Puig, J.M. Martínez-Calcerrada, E. Platero-Gutiérrez, F. De Zegher, L. Ibáñez, J.M. Fernández-Real, A. Lopez-Bermejo, J. Bassols, Altered circulating miRNA expression profile in pregestational and gestational obesity, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2015) 1–11, <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2872>.
- [115] F.J. Ortega, J.M. Mercader, V. Catalán, J.M. Moreno-Navarrete, N. Pueyo, M. Sabater, J. Gómez-Ambrosi, R. Argüelles, J.A. Fernández-Fernández, V. Ricart, G. Frühbeck, J.M. Fernández-Real, Targeting the circulating microRNA signature of obesity, *Clin. Chem.* 59 (2013) 781–792, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.195776>.
- [116] P. Willeit, P. Skrobilin, A.R. Moschen, X. Yin, D. Kaudewitz, A. Zampetaki, T. Barwari, M. Whitehead, C.M. Ramirez, L. Goedecke, N. Rotllan, E. Bonora, A.D. Hughes, P. Santer, C. Fernández-Hernando, H. Tilg, J. Willeit, S. Kiechl, M. Mayr, Circulating MicroRNA-122 is associated with the risk of new-onset metabolic syndrome and type 2 diabetes, *Diabetes.* 66 (2017) 347–357, <https://doi.org/10.2337/db16-0731>.
- [117] X. Cui, L. You, L. Zhu, X. Wang, Y. Zhou, Y. Li, J. Wen, Y. Xia, X. Wang, C. Ji, J. Guo, Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes, *Metabolism.* 78 (2018) 95–105, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.006>.
- [118] N. Klötting, S. Berthold, P. Kovacs, M.R. Schön, M. Fasshauer, K. Ruschke, M. Stumvoll, M. Bliher, MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue, *PLoS One.* 4 (2009) e4699, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004699>.

- [119] A. Zampetaki, S. Kiechl, I. Drozdov, P. Willeit, U. Mayr, M. Prokopi, A. Mayr, S. Weger, F. Oberholzer, E. Bonora, A. Shah, J. Willeit, M. Mayr, Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes, *Circ. Res.* 107 (2010) 810–817, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226357>.
- [120] H.M. Heneghan, N. Miller, O.J. McAnena, T. O'Brien, M.J. Kerin, Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) E846–E850, <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2701>.
- [121] C.M. Karch, C. Cruchaga, A.M. Goate, Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic, *Neuron.* 83 (2014) 11–26, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.041>.
- [122] J.S. Rao, V.L. Keleshian, S. Klein, S.I. Rapoport, Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients, *Transl. Psychiatry.* 2 (2012) 1–7, <https://doi.org/10.1038/tp.2012.55>.
- [123] B. Xie, Z. Liu, W. Liu, L. Jiang, R. Zhang, D. Cui, Q. Zhang, S. Xu, DNA methylation and tag SNPs of the BDNF gene in conversion of amnesic mild cognitive impairment into Alzheimer's disease: A cross-sectional cohort study, *J. Alzheimer's Dis.* 58 (2017) 263–274, <https://doi.org/10.3233/JAD-170007>.
- [124] D. Mastroeni, A. McKee, A. Grover, J. Rogers, P.D. Coleman, Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease, *PLoS One.* 4 (2009) e6617, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006617>.
- [125] L. Chouliaras, D. Mastroeni, E. Delvaux, A. Grover, G. Kenis, P.R. Hof, H.W.M. Steinbusch, P.D. Coleman, B.P.F. Rutten, D.L.A. van den Hove, Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients, *Neurobiol. Aging.* 34 (2013) 2091–2099, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.021>.
- [126] K.M. Bakulski, D.C. Dolinoy, M.A. Sartor, H.L. Paulson, J.R. Konen, A.P. Lieberman, R.L. Albin, H. Hu, L.S. Rozek, Genome-wide DNA methylation differences between late-onset Alzheimer's disease and cognitively normal controls in human frontal cortex, *J. Alzheimer's Dis.* 29 (2012) 571–588, <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111223>.
- [127] M. Colonna, Y. Wang, TREM2 variants: New keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis, *Nat. Rev. Neurosci.* 17 (2016) 201–207, <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.7>.
- [128] J.D. Ulrich, T.K. Ulland, M. Colonna, D.M. Holtzman, Elucidating the role of TREM2 in Alzheimer's disease, *Neuron.* 94 (2017) 237–248, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.042>.
- [129] K.D. Siegmund, C.M. Connor, M. Campan, T.L. Long, D.J. Weisenberger, D. Biniszkievicz, R. Jaenisch, P.W. Laird, S. Akbarian, DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons, *PLoS One.* 2 (2007) e895, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000895>.
- [130] R.L. West, J.M. Lee, L.E. Maroun, Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient, *J. Mol. Neurosci.* 6 (1995) 141–146, <https://doi.org/10.1007/BF02736773>.
- [131] G. Liu, H. Ji, J. Liu, C. Xu, L. Chang, W. Cui, C. Ye, H. Hu, Y. Chen, X. Zhou, S. Duan, Q. Wang, Association of OPRK1 and OPRM1 methylation with mild cognitive impairment in Xinjiang Han and Uygur populations, *Neurosci. Lett.* 636 (2017) 170–176, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.018>.
- [132] Y. Yu, W. Mingjiao, X. Yang, M. Sui, T. Zhang, J. Liang, X. Gu, X. Wang, Association between DNA methylation of SORL1 5'-flanking region and mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus, *Ann. Endocrinol. (Paris).* 77 (2016) 625–632, <https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.02.008>.
- [133] T.K. Furuya, P.N.O. Da Silva, S.L.M. Payão, L.T. Rasmussen, R.W. De Labio, P.H.F. Bertolucci, L.L.S. Braga, E.S. Chen, G. Turecki, N. Mechawar, J. Mill, M. De Arruda Cardoso Smith, SORL1 and SIRT1 mRNA expression and promoter methylation levels in aging and Alzheimer's Disease, *Neurochem. Int.* 61 (2012) 973–975.
- [134] K. Zhang, M. Schrag, A. Crofton, R. Trivedi, H. Vinters, W. Kirsch, Targeted proteomics for quantification of histone acetylation in Alzheimer's disease, *Proteomics.* 12 (2012) 1261–1268, <https://doi.org/10.1002/pmic.201200010>.
- [135] O. Ogawa, X. Zhu, H.-G. Lee, A. Raina, M.E. Obrenovich, R. Bowser, H.A. Ghanbari, R.J. Castellani, G. Perry, M.A. Smith, Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe? *Acta Neuropathol.* 105 (2003) 524–528, <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0684-3>.
- [136] J. Gräff, D. Rei, J.-S. Guan, W.-Y. Wang, J. Seo, K.M. Hennig, T.J.F. Nieland, D.M. Fass, P.F. Kao, M. Kahn, S.C. Su, A. Samiei, N. Joseph, S.J. Haggarty, I. Delalle, L.-H. Tsai, An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain, *Nature.* 483 (2012) 222–226, <https://doi.org/10.1038/nature10849>.
- [137] R. Kumar, P. Chatterjee, P.K. Sharma, A.K. Singh, A. Gupta, K. Gill, M. Tripathi, A.B. Dey, S. Dey, Sirtuin1: a promising serum protein marker for early detection of Alzheimer's disease, *PLoS One.* 8 (2013) e61560, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061560>.
- [138] S.M. Lehmann, C. Krüger, B. Park, K. Derkow, K. Rosenberger, J. Baumgart, T. Trimbuch, G. Eom, M. Hinz, D. Kaul, P. Habel, R. Kälin, E. Franzoni, A. Rybak, D. Nguyen, R. Veh, O. Ninnemann, O. Peters, R. Nitsch, F.L. Heppner, D. Golenbock, E. Schott, H.L. Ploegh, F.G. Wolczyn, S. Lehnardt, An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration, *Nat. Neurosci.* 15 (2012) 827–835, <https://doi.org/10.1038/nn.3113>.
- [139] P. Kumar, Z. Dezzo, C. MacKenzie, J. Oestreich, S. Agoulnik, M. Byrne, F. Bernier, M. Yanagimachi, K. Aoshima, Y. Oda, Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease, *PLoS One.* 29 (2013) e69807, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069807>.
- [140] J.P. Cogswell, J. Ward, I.A. Taylor, M. Waters, Y. Shi, B. Cannon, K. Kelnar, J. Kempainen, D. Brown, C. Chen, R.K. Prinjha, J.C. Richardson, A.M. Saunders, A.D. Roses, C.A. Richards, Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways, *J. Alzheimer's Dis.* 14 (2008) 27–41, <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-14103>.
- [141] S. Bhatnagar, H. Chertkow, H.M. Schipper, Z. Yuan, V. Shetty, S. Jenkins, T. Jones, E. Wang, Increased microRNA-34c abundance in Alzheimer's disease circulating blood plasma, *Front. Mol. Neurosci.* 7 (2014) 1–11, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00002>.
- [142] Y. Zhang, Y.-X. Liu, Q.-X. Xiao, Q. Liu, R. Deng, J. Bian, L.B. Deng, M. Al-Hawwas, F.-X. Yu, Microarray expression profiles of lncRNAs and mRNAs in postoperative cognitive dysfunction, *Front. Neurosci.* 12 (2018) 694, <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00694>.
- [143] T. Gronwald, A. de Bem Alves, E. Murillo-Rodríguez, A. Latini, J. Schuette, H. Budde, Standardization of exercise intensity and consideration of a dose-response is essential, *J. Sport Heal. Sci.* (March 2019) (in press).
- [144] L.M.J. Sanders, T. Hortobágyi, S. la Bastide-van Gemert, E.A. van der Zee, M.J.G. van Heuvelen, Dose-response relationship between exercise and cognitive function in older adults with and without cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis, *PLoS One.* 14 (2019) e0210036, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210036>.
- [145] H. Budde, R. Schwarz, B. Velasques, P. Ribeiro, M. Holzweg, S. Machado, M. Brazaitis, F. Staack, M. Wegner, The need for differentiating between exercise, physical activity, and training, *Autoimmun. Rev.* 15 (2016) 110–111, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.09.004>.
- [146] C.W. Cotman, N.C. Berchtold, L.A. Christie, Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation, *Trends Neurosci.* 30 (2007) 464–472, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.011>.
- [147] I.K. Erickson, et al., Exercise training increases size of hippocampus and improves memory, *ARPN J. Eng. Appl. Sci.* 9 (2014) 500–504.
- [148] C. Ridler, Exercise wards off Alzheimer disease by boosting neurogenesis and neuroprotective factors, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (2018) 632, <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0085-9>.
- [149] S.F. Sleiman, J. Henry, R. Al-Haddad, L. El Hayek, E.A. Haidar, T. Stringer, D. Ulja, S.S. Karuppagounder, E.B. Holson, R.R. Ratan, I. Ninan, M.V. Chao, Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate, *Elife.* 5 (2016) 1–21, <https://doi.org/10.7554/eLife.15092>.
- [150] S. Vaynman, Z. Ying, F. Gómez-Pinilla, Exercise Induces BDNF and Synapsin I to Specific Hippocampal Subfields, *J. Neurosci. Res.* 76 (2004) 356–362, <https://doi.org/10.1002/jnr.20077>.
- [151] S. Chieffì, G. Messina, I. Villano, A. Messina, A. Valenzano, F. Moscatelli, M. Salerno, A. Sullo, R. Avola, V. Monda, G. Cibelli, M. Monda, Neuroprotective effects of physical activity: evidence from human and animal studies, *Front. Neurol.* 8 (2017) 1–7, <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00188>.
- [152] A. Pietrelli, L. Matković, M. Vacotto, J.J. Lopez-Costa, N. Basso, A. Brusco, Aerobic exercise upregulates the BDNF-Serotonin systems and improves the cognitive function in rats, *Neurobiol. Learn. Mem.* 155 (2018) 528–542, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.05.007>.
- [153] R.Y. Tweedie-Cullen, A.M. Brunner, J. Grossmann, S. Mohanna, D. Sichau, P. Nanni, C. Pansa, I.M. Mansuy, Identification of combinatorial patterns of post-translational modifications on individual histones in the mouse brain, *PLoS One.* 7 (2012) e36980, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036980>.
- [154] C.A. Miller, S.L. Campbell, J.D. Sweatt, DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity, *Neurobiol. Learn. Mem.* 89 (2008) 599–603, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.07.016>.
- [155] K. Koshibu, J. Gräff, I.M. Mansuy, Nuclear protein phosphatase-1: An epigenetic regulator of fear memory and amygdala long-term potentiation, *Neuroscience.* 173 (2011) 30–36, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.023>.
- [156] J. Gräff, B.T. Woldehichael, D. Berchtold, G. Dewarrat, I.M. Mansuy, Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation, *Nat. Commun.* 3 (2012) 1–8, <https://doi.org/10.1038/ncomms1997>.
- [157] J. Chen, F.M. Ghazawi, Q. Li, Interplay of bromodomain and histone acetylation in the regulation of p300-dependent genes, *Epigenetics.* 5 (2010) 509–515, <https://doi.org/10.4161/epi.5.6.12224>.
- [158] J.S. Guan, S.J. Haggarty, E. Giacometti, J.H. Dannenberg, N. Joseph, J. Gao, T.J.F. Nieland, Y. Zhou, X. Wang, R. Mazitschek, J.E. Bradner, R.A. DePinho, R. Jaenisch, L.H. Tsai, HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity, *Nature.* 459 (2009) 55–60, <https://doi.org/10.1038/nature07925>.
- [159] J.H. Roelfsema, S.J. White, Y. Ariyürek, D. Bartholdi, D. Niedrist, F. Papadia, C.A. Bacinio, J.T. den Dunnen, G.-J.B. van Ommen, M.H. Breuning, R.C. Hennekam, D.J.M. Peters, Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 572–580, <https://doi.org/10.1086/429130>.
- [160] T.W. Bredy, H. Wu, C. Crego, J. Zellhoefer, Y.E. Sun, M. Barad, Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear, *Learn. Mem.* 14 (2007) 268–276, <https://doi.org/10.1101/lm.500907>.
- [161] C. Lang, A. Barco, L. Zablou, E.R. Kandel, S.A. Siegelbaum, S.S. Zakharenko, Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 16665–16670, <https://doi.org/10.1073/pnas.0407581101>.
- [162] S. Ying, M. Fütter, K. Rosenblum, M.J. Webber, S.P. Hunt, T.V.P. Bliss, C.R. Bramham, Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and

- upregulation of Arc synthesis, *J. Neurosci.* 22 (2002) 1532–1540.
- [163] B. Lu, BDNF and activity-dependent synaptic modulation, *Learn. Mem.* 10 (2003) 86–98, <https://doi.org/10.1101/lm.54603>.
- [164] R. Katoh-Semba, I.K. Takeuchi, R. Semba, K. Kato, Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain, *J. Neurochem.* 69 (2002) 34–42, <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69010034.x>.
- [165] A.B. Klein, R. Williamson, M.A. Santini, C. Clemmensen, A. Etrup, M. Rios, G.M. Knudsen, S. Aznar, Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14 (2011) 347–353, <https://doi.org/10.1017/S1461145710000738>.
- [166] T. Timmusk, K. Palm, M. Metsis, T. Reintam, V. Paalme, M. Saarma, H. Persson, Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene, *Neuron* 10 (1993) 475–489, [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90335-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90335-0).
- [167] F. Modarresi, M.A. Faghili, M.A. Lopez-Toledano, R.P. Fatemi, M. Magistri, S.P. Brothers, M.P. Van Der Brug, C. Wahlestedt, Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation, *Nat. Biotechnol.* 25 (2012) 453–459, <https://doi.org/10.1038/nbt.2158>.
- [168] P. Prunsi, A. Kazantseva, T. Aid, K. Palm, T. Timmusk, Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters, *Genomics* 90 (2007) 397–406, <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.05.004>.
- [169] J.P. Bohnsack, T. Teppen, E.J. Kyzar, S. Dzitoyeva, S.C. Pandey, The lncRNA BDNF-AS is an epigenetic regulator in the human amygdala in early onset alcohol use disorders, *Transl. Psychiatry* 9 (2019) 34–44, <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0367-z>.
- [170] V.L. Keleshian, H.R. Modi, S.I. Rapoport, J.S. Rao, Aging is associated with altered inflammatory, arachidonic acid cascade, and synaptic markers, influenced by epigenetic modifications, in the human frontal cortex, *J. Neurochem.* 125 (2013) 63–73, <https://doi.org/10.1111/jnc.12153>.
- [171] S. Keller, M. Sarchiapone, F. Zarrilli, A. Videtić, A. Ferraro, V. Carli, S. Sacchetti, F. Lembo, A. Angioliello, N. Jovanovic, F. Pisanti, R. Tomaiuolo, A. Monticelli, J. Balazic, A. Roy, A. Marusic, S. Cocozza, A. Fusco, C.B. Bruni, G. Castaldo, L. Chiarotti, Increased BDNF promoter methylation in the wernicke area of suicide subjects, *Arch. Gen. Psychiatry* 67 (2010) 258–267, <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.9>.
- [172] N.M. Tsankova, O. Bertou, W. Renthal, A. Kumar, R.L. Neve, E.J. Nestler, Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action, *Nat. Neurosci.* 9 (2006) 519–525, <https://doi.org/10.1038/nn1659>.
- [173] T.L. Roth, P.R. Zoladz, J.D. Sweatt, D.M. Diamond, Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder, *J. Psychiatr. Res.* 45 (2011) 919–926, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.01.013>.
- [174] C.J. Schoenher, D.J. Anderson, The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): A coordinate repressor of multiple neuron-specific genes, *Science* 267 (1995) 1360–1363.
- [175] I. Dunham, A. Kundaje, S.F. Aldred, P.J. Collins, C.A. Davis, F. Doyle, C.B. Epstein, S. Frieze, J. Harrow, R. Kaul, J. Khatun, B.R. Lajoie, S.G. Landt, B.K. Lee, F. Pauli, K.R. Rosenbloom, P. Sabo, A. Safi, A. Sanyal, N. Shores, J.M. Simon, L. Song, N.D. Trinklein, R.C. Altshuler, E. Birney, J.B. Brown, C. Cheng, S. Djebali, X. Dong, J. Ernst, T.S. Furey, M. Gerstein, B. Giardine, M. Greven, R.C. Hardison, R.S. Harris, J. Herrero, M.M. Hoffman, S. Iyer, M. Kellis, P. Kheradpour, T. Lassmann, Q. Li, X. Lin, G.K. Marinov, A. Merkel, A. Mortazavi, S.C.J. Parker, T.E. Reddy, J. Rozowsky, F. Schlesinger, R.E. Thurman, J. Wang, L.D. Ward, T.W. Whitfield, S.P. Wilder, W. Hu, H.S. Xi, K.Y. Yip, J. Zhuang, B.E. Bernstein, E.D. Green, C. Gunter, M. Snyder, M.J. Pazin, R.F. Lowdon, L.A.L. Dillon, L.B. Adams, C.J. Kelly, J. Zhang, J.R. Wexler, P.J. Good, E.A. Feingold, G.E. Crawford, J. Dekker, L. Elnitski, P.J. Farnham, M.C. Giddings, T.R. Gingeras, R. Guigó, T.J. Hubbard, W.J. Kent, J.D. Lieb, E.H. Margulies, R.M. Myers, J.A. Stamatoyannopoulos, S.A. Tenenbaum, Z. Weng, K.P. White, B. Wold, Y. Yu, J. Wrobel, B.A. Risk, H.P. Gunawardena, H.C. Kuiper, C.W. Maier, L. Xie, X. Chen, T.S. Mikkelsen, S. Gillespie, A. Goren, O. Ram, X. Zhang, L. Wang, R. Issner, M.J. Coyne, T. Durham, M. Ku, T. Truong, M.L. Eaton, A. Dobin, A. Tanzer, J. Lagarde, W. Lin, C. Xue, B.A. Williams, C. Zaleski, M. Röder, F. Kokocinski, R.F. Abdelhamid, T. Alioto, I. Antoshechkin, M.T. Baer, P. Batut, I. Bell, K. Bell, S. Chakraborty, J. Chrast, J. Curado, T. Derrien, J. Drenkow, E. Dumais, J. Dumais, R. Duttagupta, M. Fastuca, K. Fejes-Toth, P. Ferreira, S. Foissac, M.J. Fullwood, G. Gao, D. Gonzalez, A. Gordon, C. Howald, S. Jha, R. Johnson, P. Kapranov, B. King, C. Kingswood, G. Li, O.J. Luo, E. Park, J.B. Preall, K. Presaud, P. Ribeca, D. Robyr, X. Ruan, M. Sammeth, K.S. Sandhu, L. Schaeffer, L.H. See, A. Shahab, J. Skancke, A.M. Suzuki, H. Takahashi, H. Tilgner, D. Trout, N. Walters, H. Wang, Y. Hayashizaki, A. Reymond, S.E. Antonarakis, G.J. Hannon, Y. Ruan, P. Carninci, C.A. Sloan, K. Learned, V.S. Malladi, M.C. Wong, G.P. Barber, M.S. Cline, T.R. Dreszer, S.G. Heitner, D. Karolchik, V.M. Kirkup, L.R. Meyer, J.C. Long, M. Maddren, B.J. Raney, L.L. Grasfeder, P.G. Giresi, A. Battenhouse, N.C. Sheffield, K.A. Showers, D. London, A.A. Bhingre, C. Shestak, M.R. Schaner, S.K. Kim, Z.Z. Zhang, P.A. Mieczkowski, J.O. Mieczkowska, Z. Liu, R.M. McDaniell, Y. Ni, N.U. Rashid, M.J. Kim, S. Adar, Z. Zhang, T. Wang, D. Winter, D. Keefe, V.R. Iyer, M. Zheng, P. Wang, J. Gertz, J. Vielmetter, E.C. Partridge, K.E. Varley, C. Gasper, A. Bansal, S. Pepke, P. Jain, H. Amrhein, K.M. Bowling, M. Anaya, M.K. Cross, M.A. Muratet, K.M. Newberry, K. McCue, A.S. Nesmith, K.I. Fisher-Aylor, B. Pusey, G. DeSalvo, S.L. Parker, S. Balasubramanian, N.S. Davis, S.K. Meadows, T. Eggleston, J.S. Newberry, S.E. Levy, D.M. Absher, W.H. Wong, M.J. Blow, A. Visel, L.A. Pennachio, H.M. Petykowska, A. Abyzov, B. Aken, D. Barrell, G. Barson, A. Berry, A. Bignell, V. Boychenko, G. Bussotti, C. Davidson, G. Despacio-Reyes, M. Diekhans, I. Ezkurdia, A. Frankish, J. Gilbert, J.M. Gonzalez, E. Griffiths, R. Harte, D.A. Hendrix, T. Hunt, I. Jungreis, M. Kay, E. Khurana, J. Leng, M.F. Lin, J. Loveland, Z. Lu, D. Manthavadi, M. Mariotti, J. Mudge, G. Mukherjee, C. Notredame, B. Pei, J.M. Rodriguez, G. Saunders, A. Sboner, S. Searle, C. Sisu, C. Snow, C. Steward, E. Tapanari, M.L. Tress, M.J. Van Baren, S. Washiel, L. Wilming, A. Zadissa, Z. Zhang, M. Brent, D. Haussler, A. Valencia, N. Adleman, R.P. Alexander, R.K. Auerbach, S. Balasubramanian, K. Bettinger, N. Bhardwaj, A.P. Boyle, A.R. Cao, P. Cayting, A. Charos, Y. Cheng, C. Eastman, G. Euskirchen, J.D. Fleming, F. Grubert, L. Habegger, M. Harjharan, A. Harman, S. Iyengar, V.X. Jin, K.J. Karczewski, M. Kasowski, P. Lacroite, H. Lam, N. Lamarre-Vincent, J. Lian, M. Lindahl-Allen, R. Min, B. Miozzo, H. Monahan, Z. Moqtaderi, X.J. Mu, H. O'Geen, Z. Ouyang, D. Patacili, D. Raha, L. Ramirez, B. Reed, M. Shi, T. Slifer, H. Witt, L. Wu, X. Xu, K.K. Yan, X. Yang, K. Struhl, S.M. Weissman, L.O. Penalba, S. Karmakar, R.R. Bhanvadia, A. Choudhury, M. Domanus, L. Ma, J. Moran, A. Victorson, T. Auer, L. Centanni, M. Eichenlaub, F. Grühl, S. Heermann, B. Hoeckendorf, D. Inoue, T. Kellner, S. Kirchner, S. Kuehner, R. Reinhardt, L. Schertel, S. Schneider, R. Sinn, B. Wittbrodt, J. Wittbrodt, G. Jain, G. Balasubramanian, D.L. Bates, R. Byron, T.K. Canfield, M.J. Diegel, D. Dunn, A.K. Ebersol, T. Frum, K. Garg, E. Gist, R.S. Hansen, L. Boatman, E. Haugen, R. Humbert, A.K. Johnson, E.M. Johnson, T.V. Kutayavin, K. Lee, D. Lotakis, M.T. Maurano, S.J. Neph, F.V. Neri, E.D. Nguyen, H. Qu, A.P. Reynolds, V. Roach, E. Rynes, M.E. Sanchez, R.S. Sandstrom, A.O. Shafer, H.B. Stergachis, S. Thomas, B. Vernot, J. Vierstra, S. Vong, H. Wang, M.A. Weaver, Y. Yan, M. Zhang, J.M. Akey, M. Bender, M.O. Dorschner, M. Groudine, M.J. MacCoss, P. Navas, G. Stamatoyannopoulos, K. Beal, A. Brazma, P. Flicek, N. Johnson, M. Lusk, N.M. Luscombe, D. Sobral, J.M. Vaquerizas, S. Batzoglou, A. Sidow, N. Hussami, S. Kyriazopoulou-Panagiotopoulou, M.W. Libbrecht, M.A. Schaub, W. Miller, P.J. Bickel, B. Banfai, N.P. Boley, H. Huang, J.J. Li, W.S. Noble, J.A. Bilmes, O.J. Buske, A.D. Sahu, P.V. Kharchenko, P.J. Park, D. Baker, J. Taylor, L. Lozhovskiy, An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, *Nature* 489 (2012) 57–74.
- [176] E.M. Jobe, A.L. McQuate, X. Zhao, Crosstalk among epigenetic pathways regulates neurogenesis, *Front. Neurosci.* 6 (2012) 1–15, <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00059>.
- [177] K.M.C. Dallagnol, A.P. Remor, R.A. da Silva, R.D. Prediger, A. Latini, A.S. Aguiar, Running for REST: Physical activity attenuates neuroinflammation in the hippocampus of aged mice, *Brain. Behav. Immun.* 61 (2017) 31–35, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.07.159>.
- [178] Z. Song, S.Z.A. Shah, W. Yang, H. Dong, L. Yang, X. Zhou, D. Zhao, Downregulation of the repressor element 1-silencing transcription factor (REST) is associated with Akt-mTOR and Wnt-β-Catenin signaling in prion diseases models, *Front. Mol. Neurosci.* 10 (2017) 1–18, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00128>.
- [179] Z. Song, T. Zhu, X. Zhou, P. Barrow, W. Yang, Y. Cui, L. Yang, D. Zhao, REST alleviates neurotoxic prion peptide-induced synaptic abnormalities, neurofibrillary degeneration and neuronal death partially < i> i > via < /i> < i> i > LRP6-mediated Wnt-β-catenin signaling, *Oncotarget* 7 (2016) 12035–12052.
- [180] K. Nho, S. Kim, S.L. Risacher, L. Shen, J.J. Corneveaux, S. Swaminathan, H. Lin, V.K. Ramanan, Y. Liu, T.M. Foroud, M.H. Inlow, A.L. Siniard, R.A. Reiman, P.S. Aisen, R.C. Petersen, R.C. Green, C.R. Jack, M.W. Weiner, C.T. Baldwin, K.L. Lunetta, L.A. Farrer, S.J. Furey, S. Lovestone, A. Simmons, P. Mecocci, B. Vellas, M. Tsolaki, I. Kloszewska, H. Soininen, B.C. McDonald, M.R. Farlow, B. Ghetti, M.J. Huentelman, A.J. Saykin, Protective variant for hippocampal atrophy identified by whole exome sequencing, *Ann. Neurol.* 77 (2015) 547–552.
- [181] K. Palm, N. Belluardo, M. Metsis, T. Timmusk, Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene, *J. Neurosci.* 18 (1998) 1280–1296.
- [182] M. Yu, L. Cai, M. Liang, Y. Huang, H. Gao, S. Lu, J. Fei, F. Huang, Alteration of NRSF expression exacerbating 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion-induced cell death of SH-SY5Y cells, *Neurosci. Res.* 65 (2009) 236–244, <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.07.006>.
- [183] K. Sunahori, Y.-T. Juang, G.C. Tsokos, Methylation status of CpG islands flanking a cAMP response element motif on the protein phosphatase 2A alpha promoter determines CREB binding and activity, *J. Immunol.* 182 (2009) 1500–1508.
- [184] Y. Huang, S.J. Myers, R. Dingleline, Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes, *Nat. Neurosci.* 2 (1999) 867–872, <https://doi.org/10.1038/13165>.
- [185] H. van Praag, Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice, *J. Neurosci.* 25 (2005) 8680–8685, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005>.
- [186] D.J. Creer, C. Romberg, L.M. Saksida, H. van Praag, T.J. Bussey, Running enhances spatial pattern separation in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 2367–2372, <https://doi.org/10.1073/pnas.0911725107>.
- [187] F. Gomez-Pinilla, Y. Zhuang, J. Feng, Z. Ying, G. Fan, Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation, *Eur. J. Neurosci.* 33 (2011) 383–390, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07508.x>.
- [188] J.L. Abel, E.F. Rissman, Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain, *Int. J. Dev. Neurosci.* 31 (2013) 382–390, <https://doi.org/10.1016/j.jidvneu.2012.11.002>.
- [189] S.S. Vaynman, Z. Ying, D. Yin, F. Gomez-Pinilla, Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF, *Brain Res.* 1070 (2006) 124–130, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.062>.
- [190] T. Hao Bao, W. Miao, J. Hong Han, M. Yin, Y. Yan, W. Wei Wang, Y. Hong Zhu, Spontaneous running wheel improves cognitive functions of mouse associated with miRNA expression alteration in hippocampus following traumatic brain injury, *J. Mol. Neurosci* 54 (2014) 622–629.

- [191] A. Pan-Vazquez, N. Rye, M. Ameri, B. McSparron, G. Smallwood, J. Bickerdyke, A. Rathbone, F. Dajas-Bailador, M. Toledo-Rodriguez, Impact of voluntary exercise and housing conditions on hippocampal glucocorticoid receptor, miR-124 and anxiety, *Mol. Brain*. 8 (2015) 1–12, <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0128-8>.
- [192] H. Maejima, N. Kanemura, T. Kokubun, K. Murata, K. Takayanagi, Exercise enhances cognitive function and neurotrophin expression in the hippocampus accompanied by changes in epigenetic programming in senescence-accelerated mice, *Neurosci. Lett.* 665 (2018) 67–73, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.023>.
- [193] G.A. Lovatel, V.R. Elsner, K. Bertoldi, C. Vanzella, S. Moysés, A. Vizuete, C. Spindler, L.R. Cecchini, C.A. Netto, A.R. Muotri, I.R. Siqueira, Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, Neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus, *Neurobiol. Learn. Mem.* 101 (2013) 94–102.
- [194] T. Zhong, F. Ren, C.S. Huang, W.Y. Zou, Y. Yang, Y.D. Pan, B. Sun, E. Wang, Q.L. Guo, Swimming exercise ameliorates neurocognitive impairment induced by neonatal exposure to isoflurane and enhances hippocampal histone acetylation in mice, *Neuroscience*. 316 (2016) 378–388, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.049>.
- [195] R.C. Cassilhas, K.S. Lee, J. Fernandes, M.G.M. Oliveira, S. Tufik, R. Meeusen, M.T. De Mello, Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms, *Neuroscience*. 27 (2012) 202–309, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.029>.
- [196] C.C. Real, A.F.B. Ferreira, M.S. Hernandez, L.R.G. Britto, R.S. Pires, Exercise-induced plasticity of AMPA-type glutamate receptor subunits in the rat brain, *Brain Res.* 1363 (2010) 63–71, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.060>.
- [197] J. Xing, D.D. Ginty, M.E. Greenberg, Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase, *Science* 273 (1996) 959–963.
- [198] L.H. Bergersen, Lactate transport and signaling in the brain: potential therapeutic targets and roles in body – brain interaction, *J. Cereb. Blood Flow* 35 (2014) 176–185.
- [199] M.V. Lourenco, R.L. Frozza, G.B. de Freitas, H. Zhang, G.C. Kincheski, F.C. Ribeiro, R.A. Gonçalves, J.R. Clarke, D. Beckman, A. Staniszevski, H. Berman, L.A. Guerra, L. Forny-Germano, S. Meier, D.M. Wilcock, J.M. de Souza, S. Alves-Leon, V.F. Prado, M.A.M. Prado, J.F. Abisambra, F. Tovar-Moll, P. Mattos, O. Arancio, S.T. Ferreira, F.G. De Felice, Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models, *Nat. Med.* 25 (2019) 165–175.
- [200] C.D. Wrann, J.P. White, J. Salogiannis, D. Laznik-Bogoslavsk, J. Wu, D. Ma, J.D. Lin, M.E. Greenberg, B.M. Spiegelman, Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway, *PLoS One* 8 (2013), pp. 617–632.
- [201] O. Islam, X. Gong, S. Rose-john, K. Heese, Interleukin-6 and Neural Stem Cells: More Than Gliogenesis, 20 (2009), pp. 188–199.
- [202] L. Ellender, M.M. Linder, Sports pharmacology and ergogenic aids, *Prim. Care - Clin. Off. Pract.* 32 (2005) 277–292, <https://doi.org/10.1016/j.poc.2004.11.008>.
- [203] C.M.M.B. Sökmen, L.E. Armstrong, W.J. Kraemer, D.J. Casa, J.C. Dias, D.A. Judelson, Sustainable Development Indicators for L and U Se in S Antiago, Chile, *J. Strength Cond. Res. J. Strength Cond. Res.* 22 (2008) 978–986.
- [204] R. Meeusen, B. Roelands, L. Spriet, Caffeine, Exercise and the Brain, *Nestle Nutr Inst Work. Ser.* 76 (2013) 1–12, <https://doi.org/10.1159/000350223>.
- [205] D. Borota, E. Murray, G. Keceli, A. Chang, J.M. Watabe, M. Ly, J.P. Toscano, M.A. Yassa, Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans, *Nat. Neurosci.* 17 (2014) 201–203, <https://doi.org/10.1038/nn.3623>.
- [206] L.M. Castell, L.M. Burke, S.J. Stear, L.R. McNaughton, R.C. Harris, BJSM reviews: A – Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance Part 5, *Br J Sport. Med.* 44 (2010) 77–78, <https://doi.org/10.1136/bjism.2009.069989>.
- [207] A. Ascherio, M.G. Weisskopf, E.J.O. Reilly, M.L. McCullough, E.E. Calle, C. Rodriguez, M.J. Thun, Coffee Consumption, Gender, and Parkinson's Disease Mortality in the Cancer Prevention Study II Cohort: The Modifying Effects of Estrogen, *Am. J. Epidemiol.* 160 (2004) 977–984, <https://doi.org/10.1093/aje/kwh312>.
- [208] B.M. van Gelder, B. Buijsse, M. Tijhuis, S. Kalmijn, S. Giampaoli, A. Nissinen, D. Kromhout, Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study, *Eur. J. Clin. Nutr.* 61 (2007) 226–232, <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602495>.
- [209] G.W. Ross, Association of Coffee and Caffeine Intake With the Risk of Parkinson Disease, *JAMA*. 283 (2000) 2674–2679, <https://doi.org/10.1001/jama.283.20.2674>.
- [210] Y.F. Chu, W.H. Chang, R.M. Black, J.R. Liu, P. Sompol, Y. Chen, H. Wei, Q. Zhao, L.H. Cheng, Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid  $\beta$ 1–42 levels in an Alzheimer's mouse model, *Food Chem.* 135 (2012) 2095–2102, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.148>.
- [211] O.P. Dall'Igna, P. Fett, M.W. Gomes, D.O. Souza, R.A. Cunha, D.R. Lara, Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent  $\beta$ -amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice, *Exp. Neurol.* 203 (2007) 241–245, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.08.008>.
- [212] K. Xu, D.G. Di Luca, M. Orrù, Y. Xu, J.-F. Chen, M.A. Schwarzschild, Neuroprotection by caffeine in the MPTP model of parkinson's disease and its dependence on adenosine A2a receptors, *Neuroscience*. 322 (2016) 129–137, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.035>.
- [213] J.M.N. Duarte, R.A. Carvalho, R.A. Cunha, R. Gruetter, Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats, *J. Neurochem.* 111 (2009) 368–379, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06349.x>.
- [214] S. Cappelletti, P. Daria, G. Sani, M. Aromatario, Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Curr. Neuropharmacol.* 13 (2015) 71–88, <https://doi.org/10.2174/1570159X13666141210215655>.
- [215] C. Fabiani, A.P. Murray, J. Corradi, S.S. Antolini, A novel pharmacological activity of caffeine in the cholinergic system, *Neuropharmacology*. 135 (2018) 464–473, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.03.041>.
- [216] M. Pohanka, P. Dobes, Caffeine Inhibits Acetylcholinesterase, But Not Butyrylcholinesterase, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 9873–9882, <https://doi.org/10.3390/ijms14059873>.
- [217] J.A. Machado-Filho, A.O. Correia, A.B.A. Montenegro, M.E.P. Nobre, G.S. Cerqueira, K.R.T. Neves, G. Naffah-Mazzacoratti, E.A. Cavalheiro, G.A. de Castro Brito, G.S. De Barros Viana, Caffeine neuroprotective effects on 6-OHDA-lesioned rats are mediated by several factors, including pro-inflammatory cytokines and histone deacetylase inhibitors, *Behav. Brain Res.* 264 (2014) 116–125.
- [218] C. Lao-Peregrín, J.J. Ballesteros, M. Fernández, A. Zamora-Moratala, A. Saavedra, M. Gómez Lázaro, E. Pérez-Navarro, D. Burks, E.D. Martín, Caffeine-mediated BDNF release regulates long-term synaptic plasticity through activation of IRS2 signaling, *Addict. Biol.* 22 (2017) 1706–1718, <https://doi.org/10.1111/adb.12433>.
- [219] L.J. Spielman, D.L. Gibson, A. Klegeris, Incretin hormones regulate microglia oxidative stress, survival and expression of trophic factors, *Eur. J. Cell Biol.* 96 (2017) 240–253, <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.03.004>.

