

ESCOLA DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MAYARA FERRAZ DE MENEZES

**ACETILAÇÃO GLOBAL DA HISTONA H4 E RESPOSTA ASTROCÍSTICA PÓS-LESÃO
MEDULAR CONTUSA: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR ADULTOS**

Porto Alegre
Ano 2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Mayara Ferraz de Menezes

**Acetilação global da histona H4 e resposta astrocística pós-lesão medular contusa:
um estudo experimental em ratos Wistar adultos**

Porto Alegre, RS

2017

Mayara Ferraz de Menezes

**Acetilação global da histona H4 e resposta astrocística pós-lesão medular contusa:
um estudo experimental em ratos Wistar adultos**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador
Prof. Dr. Régis Gemerasca Mestriner

Porto Alegre, RS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

O48e Menezes, Mayara Ferraz de
Acetilação global da histona H4 e resposta astrocística pós-lesão medular contusa: um estudo experimental em ratos Wistar adultos / Mayara Ferraz de Menezes. – Porto Alegre, 2017.
67 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).
Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.
Linha de Pesquisa: Neuroplasticidade e Reabilitação.
Orientação: Prof. Dr. Regis Gemerasca Mestriner.

1. Epigenética. 2. Lesão Medular. 3. Astrócitos. I. Mestriner, Regis Gemerasca.

**Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária:
Cíntia Borges Greff– CRB 10/1437**

Dedico este trabalho
aos meus amigos e à minha família,
em especial à minha avó Irene Fortes Ferraz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Magda A. Fortes Ferraz, e à minha avó, Irene Fortes Ferraz, pelos princípios e valores fundamentais que me foram ensinados, por me apoiarem, incondicionalmente, e por tudo que sempre fizeram por mim. Agradeço ainda, por me ensinarem a sonhar e acreditar em mim mesmo. Não existem palavras suficientes para expressar o tamanho da minha gratidão e amor, vocês são as vozes da minha consciência.

À minha irmã, Bruna Ferraz de Menezes por todo o amor, apoio e compreensão nas horas mais difíceis, e pela persistência em jamais me deixar desistir, você é meu porto seguro.

Aos meus amigos que me apoiaram e entenderam meu mal humor, minhas correrias e minhas ausências durante estes 2 anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Régis Gemerasca Mestriner, pela confiança em mim depositada, pela paciência, crítica e empenho durante todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas do laboratório, pelos ensinamentos e pela colaboração fundamental para a realização desse estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de isenção de taxas que me foi concedida.

RESUMO

Na lesão medular, diversos mecanismos secundários ativam a resposta astrogliar visando isolar a lesão, preservar o tecido adjacente e desencadear mecanismos neuroplásticos de reparo tecidual. Contudo, a falha na reconexão axonal e a ocorrência de um *sprouting* neuronal deficitário pós-lesão medular são eventos atribuídos, ao menos em parte, à exacerbação da resposta astrocitária. Sabe-se que essa resposta é dependente da severidade, da localização e do tempo pós-lesão e pode acarretar na gênese de um ambiente hostil para o crescimento axonal e para a adequada função das células remanescentes. Neste contexto, acredita-se que modificações epigenéticas sejam capazes de modular determinadas propriedades dos astrócitos no tecido perilesional, impactando diretamente sobre o desenvolvimento da resposta astrocítica secundária à lesão. Corroborando esta linha de raciocínio, vários estudos previamente publicados associam os níveis de acetilação da histona H4 à sinaptogênese, à plasticidade sináptica, à memória e à aprendizagem. No entanto, ainda não temos informações conclusivas sobre como os níveis globais de acetilação da histona H4 se correlacionam frente à resposta astrogliar pós-lesão medular. Ante ao exposto, neste trabalho buscamos avaliar os níveis globais de acetilação da histona H4, da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e da proteína S100 de ligação ao cálcio B (S100B), utilizando o método ELISA, em tecido perilesional de medula espinhal de ratos Wistar adultos, bem como as suas possíveis associações em diferentes tempos pós-lesão (6h, 24h, 48h, 72h e 7 dias). Para tanto, inicialmente, realizou-se um ensaio morfológico para garantir que o modelo de lesão medular torácica empregado fosse exitoso, o que foi confirmado em nossos resultados. Após, na segunda parte do experimento, pudemos demonstrar que uma lesão medular contusa experimental é capaz de alterar o valor preditivo dos níveis de acetilação global da histona H4 para a detecção de níveis de GFAP, sendo este de 59,8% em situação de não-lesão e de 17,2% quando em tecido perilesional. Surpreendentemente, o estado de acetilação de histona H4 não foi capaz de prever os níveis de S100B, tanto em tecido não-lesado quanto em tecido perilesional. Conjuntamente, estes resultados sugerem que o estado de acetilação de histona H4 é profundamente modificado pela lesão da medula espinal, o que pode contribuir para modificações diferenciais na resposta astrocítica que se dá durante o processo de reparo, o que pode modificar a eficácia da recuperação tecidual. Sendo assim, o presente estudo encoraja o desenvolvimento de investigações que busquem interferir sobre os mecanismos epigenéticos que controlam a resposta astrogliar, alvo terapêutico este que ainda pode ser bastante interessante para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento pós-lesão medular.

Palavras chave: Epigenômica, Histonas, Lesões Medulares, Proteína Glial Fibrilar Ácida; Subunidade beta da Proteína Ligante de Cálcio S100; Astrócitos.

ABSTRACT

In the spinal cord injury (SCI), secondary mechanisms activate astroglial response to isolate the injured site, preserve the remaining tissue and trigger neuroplastic mechanisms. Failure of axonal rewiring and neuronal sprouting is attributed to a time-dependent astrocytic response that exceeds the capacity of the system to contain the injury and builds a hostile environment for the axon regrowth and a toxic milieu for the remained cells. It is believed that the epigenetic modifications can modulate these astrocytic properties and the astroglial reactivity development. Several studies have associated the global histone H4 levels to synaptogenesis, synaptic plasticity, memory and learning. Currently, we still do not have a conclusive information on the role of the global levels of H4 acetylation in the astrocytic response after a SCI. With that in mind, we assess the global histone H4 acetylation and both glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100 calcium-binding protein B (S100B) levels, using the ELISA method, with spinal cord perilesional tissue in Wistar rats. We also tested their possible association at different time-points (6h, 24h, 48h, 72h and 7days). Firstly, we performed a morphological assay to guarantee the thoracic SCI injury was morphologically detectable at the studied time-points. Our data show a spinal cord injury can change the predictive value of global histone H4 acetylation status in detecting GFAP levels from 59.8% in the undamaged to 17.2% in perilesional tissue. Surprisingly, the histone H4 acetylation status did not influence S100B levels in either undamaged or perilesional tissue. We highlight the time-dependency of global histone H4 acetylation modifications following spinal cord injury. Together, these results suggest the histone H4 acetylation status is changed by the spinal cord injury, which might influence neural repair and recovery efficacy. Therapeutic epigenetic mechanisms to regulate astroglial response and therefore promote tissue recovery after spinal cord injury might be a matter for further investigation.

Key words: Epigenomics, Histones, Spinal cord injuries, Glial fibrillary acidic protein; S100 Calcium Binding Protein beta Subunit; Astrocytes.

LISTA DE FIGURAS

Dissertação

Figura 1.	21
Figura 2.	22
Figura 3.	22

Artigo Científico

Figure 1.	49
Figure 2.	50

LISTA DE TABELAS

Artigo Científico

Table 1.51

Table 2.52

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3hidroxi-5metil-4isoxazol ácido propiônico
ATP	Adenosina Trifosfato
BDNF	Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo
bFGF	Fator neurotrófico derivado de Fibroblasto
CNTF	Fator Neurotrófico Ciliar
COX 2	Ciclogenase 2
CSPG	Proteoglicanos de Sulfato de Condroitina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
HAT	Histona Acetiltransferase
HDAC	Hiistona Desacetilase
ICAM-1	Moléculas de Adesão Intercelular 1
IGF-1	Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1
IL-1	Interleucina-1
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase Induzível
LTM	Memória de longa duração
MAG	Glicoproteína Associada à Mielina
MMP9	Metallopeptidase de Matrix 9
MOG	Glicoproteína de Mielina de Oligodendrócito
NGF	Fator Neurotrófico Derivado do Nervo Periférico
NH ₄	Amônio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOGO-A	Inibidores de Crescimento de Neurite A
PECAM	Moléculas de Adesão Plaqueta-célula Endotelial
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Lesão Medular: Aspectos Conceituais, Clínicos e Epidemiológicos.....	13
1.2 Resposta Inflamatória e Imunológica pós-Lesão Medular	15
1.3 Excitotoxicidade Glutamatérgica pós-lesão medular.....	17
1.4 Astrogliose Reativa	18
1.5 GFAP no processo de astrogliose reativa	20
1.6 S100B.....	20
1.7 Epigenética.....	21
1.8 Epigenética e histonas nas lesões do sistema nervoso central	23
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. MÉTODO, RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Artigo Científico	28
6. CONCLUSÕES	56
7. PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS: Aprovação CEUA UFRGS e CEUA PUCRS	67

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está formatada em tópicos: **Resumo; Abstract; Introdução Justificativa; Objetivos, Método, Resultados e Discussão; Considerações Finais; Conclusão; Perspectivas e Referências.**

As sessões **Resumo** e **Abstract** descrevem uma síntese do presente estudo. A **Introdução** apresenta o embasamento teórico, que fomentou a proposta de trabalho, seguida da **Justificativa** e dos **Objetivos**. A sessão **Método, Resultados e Discussão** é apresentada na forma de artigo científico, organizado como resposta aos objetivos propostos. As **Considerações Finais** integram uma discussão integrativa final, direcionando para o desfecho do estudo, que é apresentado na sessão de **Conclusões**. A sessão **Perspectivas** aborda possibilidades para futuros trabalhos, a partir dos resultados descritos. Finalmente, a sessão **Referências** lista os trabalhos citados ao longo desta dissertação, com exceção daqueles utilizados no artigo científico que são apresentados ao final deste.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lesão Medular: Aspectos Conceituais, Clínicos e Epidemiológicos

A medula espinhal é um órgão constituído de tecido nervoso, de formato cilíndrico, pertencente ao Sistema Nervoso Central (SNC). Tal órgão se encontra dentro do canal medular, abaixo do bulbo e se estende pelo canal medular até a altura aproximada da segunda vértebra lombar, onde forma, então, o cone medular ¹. Macroestruturalmente, duas regiões podem ser definidas na medula espinhal: a substância branca e a substância cinzenta. Localizada na periferia do tecido medular, a substância branca é composta basicamente por axônios, na sua maioria mielinizados, que podem ser divididos em axônios de projeção ascendente ou descendente, quando estes ultrapassam os limites do referido órgão, e por axônios de associação, os quais conectam diferentes células dentro dos limites anatômicos da medula espinhal ². Na região central da medula, formando o H medular, estão os interneurônios, as células da glia, os corpos celulares e os dendritos de neurônios eferentes, bem como as terminações de neurônios aferentes ¹. Os tratos espinhais, que são grupos de axônios, estão orientados longitudinalmente através da medula e são responsáveis pela comunicação bilateral entre o encéfalo e a medula espinhal, resultando no processamento neuromotor (eferente) ou sensorial (aferente). Os neurônios sensoriais ou tratos aferentes são responsáveis por conduzir informações acerca do meio externo e conduzi-las a estruturas do SNC, enquanto que os neurônios eferentes são especializados em conduzir o estímulo do SNC até o efetador. Já os filamentos dispostos abaixo de L2, raízes nervosas dos últimos nervos espinhais e meninges, constituem a cauda equina ¹. Funcionalmente, os estímulos recebidos pelos neurônios, através dos dendritos, são processados por meio de modificações no potencial de membrana celular e podem gerar um impulso nervoso. Este, por sua vez, é conduzido pelo axônio e pode impactar na sinapse que se dará com o neurônio seguinte ².

Na lesão medular ocorre a perda de tecido neural, o que inclui as células neurais, gliais e os tratos de fibras mielinizadas e não-mielinizadas, o que compromete a transmissão das informações motoras e sensoriais que transitam entre o encéfalo e a periferia e vice-versa ^{1;3}. Os prejuízos sensitivos e motores, assim como, as alterações viscerais e tróficas geradas podem se apresentar em diferentes graus de acordo com o nível, tipo e etiologia da lesão ². Pacientes acometidos com a lesão medular podem ser classificados quanto: 1) ao tipo, que pode ser completa, quando não há preservação sensitiva e motora abaixo do nível de lesão, ou incompleta, quando existe a preservação parcial da sensibilidade e/ou da função motora abaixo do nível neurológico acometido; 2) à presença de movimentação voluntária, sendo denominado, parético ou plégico quando a movimentação voluntária e a força muscular estão reduzidas ou ausentes, respectivamente; 3) ao número de membros com alterações motoras ou/e sensoriais utilizando,

por exemplo, os prefixos “tetra” e “para”; 4) à presença ou ausência de tônus muscular em níveis anormais, por exemplo, espástico ou flácido. Tais achados são compatíveis com a neuroanatomia funcional, pois sabemos que a perda permanente das funções motora e sensorial é associada à redução ou bloqueio da condução axonal ^{1; 3; 4}.

O impacto na saúde física e na qualidade de vida do sujeito lesado se reflete na saúde psicológica já nos primeiros meses ⁵. O choque neurogênico e consequente hipotensão postural, a bexiga e esfíncter hipotônicos, as úlceras de pressão, as alterações gastrointestinais, a osteoporose, as disfunções sexuais e as infecções urinárias estão fortemente associadas ao aumento da incidência/prevalência de ansiedade e depressão ^{5; 6}. Já as complicações cardiovasculares e respiratórias são responsáveis por boa parte da morbidade e mortalidade ⁶, aumentando a taxa de reinternação hospitalar e de desemprego dentre os sujeitos lesados medulares. A organização mundial da saúde (OMS) afirma que existe redução importante no número de lesados medulares empregados e/ou que estejam estudando nos anos seguintes à lesão ⁷ e estimam, ainda, uma despesa anual de aproximadamente R\$ 300 milhões com custas de tratamento, apenas no Brasil ⁸.

Quanto à etiologia, destacam-se as lesões congênitas, traumáticas, degenerativas, tumorais, infecciosas, neurológicas, sistêmicas ou vasculares, sendo a lesão traumática a mais incidente, cerca de 13 a 53 casos por milhão de habitantes no mundo. A lesão medular traumática é mais prevalente em homens, em proporção de 2 homens para cada mulher, na faixa de 20 e 29 anos, em idade economicamente produtiva ou, então, acima de 70 anos. Dentre as mulheres acometidas, destacam-se as adolescentes, na faixa etária de 15 a 19 anos, e as idosas acima de 60 anos ⁷.

Entre as três principais causas de lesão medular em homens, destacam-se os acidentes automobilísticos (27,9%), seguidos de quedas (25,6%) e lesões por armas de fogo (11,7%) ⁹. Em mulheres, os acidentes automobilísticos (44,4%) e quedas (24,2%) também lideram as duas primeiras posições no rank, enquanto o terceiro lugar é representado por complicações médicas/cirúrgicas (7,6%) ⁷. Tendo em vista o incremento da violência urbana no Brasil nos últimos anos, é possível que este quadro mude. No entanto, no momento, não disponibilizamos dados novos e consistentes que estejam publicados.

Sob o ponto de vista fisiológico, no modelo de lesão traumática, a resposta primária é caracterizada pelo trauma mecânico propriamente dito, que interrompe tanto a integridade tanto das estruturas neurais quanto das vasculares da medula ^{1; 5; 10; 11; 12; 13}; já nas primeiras horas, ocorre a formação das petéquias hemorrágicas, trombose intravascular, vasoespasmo e edema com consequente hipoperfusão e isquemia na substância cinzenta, que apresenta consistência menos densa e abundante vascularização ^{11; 13; 14}. Em seguida, mecanismos secundários são deflagrados para conter a lesão e preservar o tecido ^{1; 5; 10; 11; 13; 14; 15}. Contudo, a continuidade da resposta

inflamatória e astrogliosa culmina com a progressão da lesão e inibição da regeneração propriamente dita do tecido. Os danos à substância branca, que se iniciam no momento da contusão, se tornam evidentes com a ativação da necrose e da apoptose celular, resultantes de mecanismos celulares que geralmente são deflagrados pelo processo inflamatório ^{13; 14; 16}.

A consequente perda da bainha de mielina, que é responsável pela condução saltatória do impulso nervoso, os torna lentos ou ausentes, gerando axônios funcionalmente inativos, o que dificulta a recuperação da função motora pós-lesão medular ¹⁶. Além disso, há a formação da cavidade cística, da cicatriz astrogliosa e a produção de substâncias inibidoras e que acarretam na constituição de uma barreira física e molecular que impede a regeneração axonal ^{1; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23}.

1.2 Resposta Inflamatória e Imunológica pós-Lesão Medular

A inflamação é uma defesa universal dos tecidos, que se inicia com eventos bioquímicos e moleculares, visando gerar uma resposta de defesa e de contenção da lesão ^{5; 15; 24}. Na lesão medular traumática, após a disfunção da barreira sangue-medula e com a presença de hemorragia e isquemia, existe uma ativação da cascata de inflamação: invasão de neutrófilos, macrófagos periféricos, linfócitos; ativação de células endoteliais, e de células da glia, tais como os astrócitos, que liberam substâncias vasoativas e pró-inflamatórias, aumentando a perfusão e facilitando o deslocamento de células sanguíneas para a medula lesada ^{1; 5; 11; 13; 10; 12}.

No processo de indução de resposta inflamatória e imunológica, destacam-se a microglia, os neutrófilos, os macrófagos, os astrócitos e as substâncias por estes produzidas, pró e anti-inflamatórias ^{13; 18; 24; 25; 26}. A ativação da microglia, que é genericamente responsável pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a Interleucina 1 (IL-1), espécies reativas de oxigênio e o óxido nítrico (NO) ^{26; 27}, se torna evidente a partir do primeiro dia, sofrendo um aumento nos dias seguintes, até atingir um platô entre 2 e 4 semanas pós-lesão ²⁵. Outrossim, há o direcionamento de leucócitos para o sítio lesado. A presença de neutrófilos no sítio da lesão pode ser observada a partir da quarta hora ¹⁰ e permanece elevada até o terceiro dia pós-lesão, estando associada à presença de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e moléculas de adesão plaqueta-célula endotelial (PECAM) ²⁶. Além disso, os neutrófilos também são responsáveis pela secreção de enzimas líticas e citocinas que podem aumentar o dano tecidual e o recrutamento de outras células inflamatórias que contribuem para a ativação glial ^{24; 25}: há a liberação de espécies reativas de oxigênio, do fator de necrose tumoral (TNF) alfa e beta, das Interleucinas (IL) 1 e 8 e de enzimas líticas, tais como a elastase neutrofílica e a MMP9 ¹³. A elastase neutrofílica danifica as células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular causando hemorragia. Já a MMP9

aumenta o extravasamento de leucócitos e degrada os componentes da lamina basal da barreira sangue-medular espinhal e as proteínas da mielina ^{10; 26}.

Os macrófagos podem ser observados de minutos a horas após a lesão em roedores, quando derivados da ativação da microglia residente e, após o segundo dia ¹⁰, com um pico entre o quinto e o sétimo dia, quando derivados de monócitos. Além disso, células derivadas dos monócitos circulantes podem permanecer ativas por meses pós-lesão. A função dos macrófagos, em geral, está relacionada com um aumento na secreção de TNF- α , IL-1 ²⁶, IL-6, óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), glutamato e cicloxigenases (COX) e com a fagocitose do tecido lesionado ^{27; 28}.

Os astrócitos são inicialmente ativados para conter a lesão, além de apresentam papel importante no controle inflamatório - através da recaptura do glutamato e da proteção contra estresse oxidativo, bem como da liberação de adenosina e NH⁴⁺ e da degradação de peptídeos beta-amilóides. Tais células atuam, ainda, no reparo da barreira sangue-medula, na redução do edema, na estabilização do líquido extracelular e equilíbrio iônico, e no controle de mecanismos inflamatórios. Entretanto, a sua permanência causa a formação da cavidade cística e cicatriz astrogliosa com consequente aumento da lesão ^{13; 19; 20; 26; 29}. Durante o processo de astrogliose, os astrócitos são responsáveis pela formação e liberação de substâncias que contribuem para a formação da cicatriz glial: COX2; laminina; neutrofina C; Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) ²⁶ substâncias inflamatórias como fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator neurotrófico derivado do nervo periférico (NGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); moléculas de adesão celular e proteínas de matriz extracelular ¹³.

De modo paralelo, citocinas e mediadores químicos são encontrados no sítio da lesão e apresentam papel importante no período plástico que sucede a lesão medular. Presentes a partir da primeira meia hora, as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 são relacionadas com ambas as propriedades, neurotóxicas e de neuroproteção ^{26; 30; 31}.

IL-1 β e TNF- α são responsáveis, inicialmente, por ativarem células da glia, induzindo a liberação de outras citocinas e substâncias como NO (óxido nítrico) que, por sua vez, induzem o edema e aumentam a infiltração leucocitária para a região. Estas citocinas também estão associadas à morte celular, seja por necrose ou apoptose; e à função astrocitária, através da indução da proliferação dos astrócitos e da secreção de IL-6, NGF e do fator neurotrófico derivado do fibroblasto (bFGF) ³⁰. Juntamente com a IL-2 e outros mediadores nos sítios de inflamação, IL-1 β e TNF- α são responsáveis pela indução da expressão de cicloxigenases (COX), em especial a COX-2, que tem papel importante no processo inflamatório, contribuindo para a formação de prostaglandinas e prostaciclina que aumentam a vasodilatação e a permeabilidade vascular; e tromboxanos, que aumentam a resistência vascular, a agregação e adesão plaquetária ^{32; 33}. Cabe

salientar que, após a lesão medular por contusão, a expressão de ambas, COX 1 e 2, está aumentada ^{34; 35}.

Além disso, TNF- α exerce papel importante tanto na citotoxicidade observada nos oligodendrócitos quanto no aumento da expressão de ciclogenase-2 (COX-2). Assim, existe uma potencialização nos efeitos da deletérios correlatos à desmielinização e inflamação durante a tentativa de regeneração axonal ³⁰. Por exemplo, a inibição precoce do TNF- α pós-lesão promove a recuperação funcional, demonstrando o seu papel citotóxico ^{30; 36} enquanto que a inibição tardia deste mediador não produz o mesmo efeito ³⁶. No entanto, em ratos transgênicos, que não expressam receptores do TNF- α e, portanto, são menos sensíveis aos efeitos do TNF- α endógeno, se observa a perda de tecido e déficits funcionais maiores do que em animais controles ³⁷, o que ainda precisa ser melhor compreendido.

Por sua vez, a IL-6 é observada na fase aguda da resposta secundária e funciona como um fator importante para a diferenciação de células tronco neurais em astrócitos, na melhora da sobrevivência neuronal e desenvolvimento de neuritos devido à indução da síntese de fatores neurotróficos. Contrariamente, quando utilizados anticorpos contra a IL-6, os estudos demonstraram relação com a síntese de iNOS, com a diminuição da infiltração de células inflamatórias no sitio da lesão, a atenuação da resposta secundária e da formação da cicatriz glial, com conseqüente facilitação da recuperação funcional ³⁰.

Em contrapartida, a IL-10 possui caráter anti-inflamatório ^{26; 38}. A liberação desta estimula a ativação de genes anti-apoptóticos ³¹; inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias pelas células T/macrófagos e diminui a sua capacidade de reconhecer antígeno; além de diminuir a síntese de TNF- α pelos astrócitos ³⁷.

1.3 Excitotoxicidade Glutamatérgica pós-lesão medular

Em relação aos mecanismos neurotóxicos que danificam a célula e dificultam o reparo, destacam-se aqueles envolvidos na excitotoxicidade glutamatérgica, tais como a formação de espécies reativa de oxigênio e a disfunção energética ^{1; 13; 20}. Os primeiros, como anteriormente mencionado, são produzidos por meio da formação de prostaglandinas e leucotrienos e da liberação de íons metálicos após a degradação da hemoglobina. Estes, quando reagem com componentes celulares tais como proteínas, ácido nucleicos e lipídios, causam danos celulares. O óxido nítrico, embora não seja isoladamente tóxico, quando em contato com o radical livre superóxido, forma um potente oxidante de componentes celulares, ativando a peroxidação induzida por isquemia e a inflamação como resposta à morte celular. A reação com ácidos graxos poli-insaturados da membrana, peroxidação lipídica, resulta em disfunção da arquitetura da

membrana das organelas e das células, principalmente mitocôndria; do fluxo sanguíneo com consequente aumento da resposta inflamatória e edema; da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ com alteração da excitabilidade neuronal, com consequente comprometimento celular^{1; 26}.

Do mesmo modo, a interrupção sanguínea devido ao trauma inicialmente e, posteriormente, a ocorrência de eventos isquêmicos e a reperfusão sanguínea, também comprometem a funcionalidade da mitocôndria e de suas rotas de formação de adenosina trifosfato (ATP)^{1; 13}. A hipóxia celular causa o colapso do potencial da membrana transmitocôndrial, gerando aumento do influxo de cálcio na organela, a liberação de citocromo C e a ativação da caspase 9, com consequente morte celular e disfunção na síntese de ATP²⁶.

A alteração do equilíbrio iônico, especialmente o Na^+ , K^+ e Ca^{+2} , acarreta em edema e desregula a célula, diminuindo a síntese de ATP e a desregulando a despolarização da membrana celular, devido ao aumento de sódio e cálcio, o que também acarreta em disfunção celular funcional²⁶. Além disso, a excitotoxicidade glutamatérgica também pode estar associada ao aumento de cálcio^{1; 13} e sódio intracelular, uma vez que o aumento de íons de Ca^{+2} e Na^+ ocorre como resposta à ligação glutamato aos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e α -amino-3hidroxi-5metil-4isoxazol ácido propiônico (AMPA), respectivamente²⁶. A excitotoxicidade do glutamato acontece frente ao acúmulo de glutamato na fenda sináptica, por um tempo prolongado, o que ocasiona morte neuronal. Através de um mecanismo de retroalimentação positiva, que acontece pelo comprometimento da recaptção do glutamato, pela exocitose de vesículas de glutamato dependente de cálcio e pela liberação do cálcio intracelular, o glutamato aumenta a sua concentração atingindo concentrações neurotóxicas^{26; 39} e máximas após cerca de 15 minutos e 6 horas, respectivamente. O influxo de íons Ca^{2+} nos neurônios como resposta da ligação glutamato - receptor NMDA ativa uma resposta neurotóxica que induz a ativação da morte dependente de cálcio¹³. Esses processos incluem a ativação de enzimas líticas como as calpains, fosfolipase A2 e lipoxigenase³⁹. A ligação AMPA-glutamato, entretanto, ativa uma resposta de lise celular devido à osmose desenfreada. O glutamato desencadeia a despolarização da membrana, aumentando o sódio intracelular e, como consequência o influxo de cloro e água. A cronicidade dessa ligação glutamato-AMPA libera o receptor de NMDA para se ligar ao glutamato, favorecendo o aumento de cálcio²⁶. Entre as células do SNC, acredita-se que os oligodendrócitos constituem as células mais acometidas devido à sua vulnerabilidade – ambos canais AMPA e NMDA são mais permeáveis ao cálcio¹⁴.

1.4 Astrogliose Reativa

Denomina-se astrogliose reativa a resposta astrocitária decorrente de um dano ao sistema nervoso central^{19; 20; 21; 29; 40}. Embora bastante descrita como algo prejudicial à reconexão axonal

e ao sprouting neuronal, portanto, algo impeditivo à regeneração do tecido^{20; 22; 23; 29; 40; 41; 42}, estudos *in vivo* mostram seu papel benéfico na contenção da lesão: o tecido danificado pode ampliar-se caso não ocorra a formação da cavidade cística, o que incrementa a morte neuronal, a desmielinização e a gravidade dos danos sensório-motores funcionais pós-lesão medular¹⁶.

Morfofisiologicamente, os astrócitos são inicialmente ativados para conter a lesão, atuando em diversos mecanismos, tais como a receptação de glutamato; defesa antioxidante; a liberação de adenosina; a degradação de peptídeos beta-amilóides; o reparo da barreira sangue-medula; a redução do edema; a estabilização do líquido extracelular e equilíbrio iônico; o controle infamatório através da modulação da infiltração de leucócitos e a ativação da microglia residente^{19; 20; 22; 23; 26}. Contudo, a prolongada ação astrocitária na região perilesional deflagra diversos mecanismos que contribuem para a formação da cavidade cística^{1; 19; 20; 22; 23; 26; 29}. A cicatriz astrocitária que circunda a cavidade cística forma uma barreira química e mecânica que restringe a migração de células inflamatórias e separa as células danificadas das células neurais viáveis^{1; 18; 19; 26}. A presença de células como os astrócitos reativos, microglia e macrófagos quanto de substâncias como a glicoproteína associada à mielina (MAG), a glicoproteína de mielina de oligodendrócito (MOG), proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) e inibidores de crescimento de neurite (Nogo)-A inibem o crescimento de neuronal e induzem o colapso de crescimento dos neurônios¹⁴.

De acordo com a severidade, o tempo e a distância em que os astrócitos se encontram da zona de lesão, a astrogliose reativa pode se apresentar como isomórfica ou anisomórfica. A primeira é associada predominantemente às fases iniciais da lesão e ao processo inflamatório, quando algumas características reversíveis ainda podem ser observadas em sítios distais ao lócus de lesão primária: aumento de GFAP e consequente hipertrofia dos processos astrocitários sem intersecção com os astrócitos adjacentes^{19; 20; 41; 42}, aumento da atividade de S100B, que estimula a proliferação de astrócitos e se comporta como uma neurotrofina protegendo células neuronais contra estímulos neurotóxicos; produção de agentes antioxidantes e de fatores que estimulam a sobrevivência celular; crescimento de neuritos e uma reorganização sináptica benéfica ao remodelamento tecidual^{41; 42}.

A astrogliose anisomórfica é observada em zonas de cicatriz glial, adjacentes à lesão, na fase tardia da inflamação. Embora seja responsável pelo isolamento das áreas prejudicadas, também contribui para a inibição da reconexão axonal^{19; 20}. O aumento excessivo de cálcio intracelular aumenta a concentração de S100B, que promove a inflamação em astrócitos e pode acarretar em morte neuronal, produção de ROS e de efeitos neurotóxicos. O irreversível aumento na expressão de GFAP, de vimentina e de nestina acarreta em aumento excessivo da proliferação e hipertrofia astrocitária^{19; 20} com sobreposição dos domínios astrocíticos e altera irreversivelmente a configuração do tecido, o que dificulta os processos de reparo e reconexão medular^{41; 42}.

1.5 GFAP no processo de astrogliose reativa

Classificada como uma proteína de filamento intermediário, a GFAP é encontrada quase que exclusivamente nas células astrocitárias no SNC e por isso é comumente utilizada como marcador para astrócitos maduros ^{43; 44}. A GFAP também pode ser encontrada nas células gliais entéricas e nas células de Schwann não-mielinizantes no Sistema Nervoso Periférico (SNP). Enquanto a GFAP é expressa em praticamente todas as células de Bergmann no cerebelo, sabe-se que a referida proteínas está expressa em apenas cerca de 20 a 30% dos astrócitos do córtex cerebral. Na medula espinal, em condições de normalidade, sua intensidade de expressão também não costuma ser muito elevada ⁴⁵.

Nos astrócitos, essa proteína é responsável pela estrutura do citoesqueleto e consequente força mecânica, além de fornecer suporte aos neurônios vizinhos e à barreira hemato-encefálica. Durante a diferenciação dos astrócitos, assim como na formação da astrogliose reativa, os astrócitos ativados aumentam em comprimento e diâmetro os seus processos astrocitários através do aumento na expressão de GFAP, para permitir a proliferação e a hipertrofia celular ^{20; 43}.

1.6 S100B

As proteínas S100 constituem uma família de proteínas cálcio-ligantes que são expressas somente em vertebrados e apresentam padrão célula-específica. Dentro das células, as S100 estão associadas à regulação de proliferação, diferenciação, apoptose, homeostase de cálcio, metabolismo energético, inflamação e migração/invasão ^{46; 47}.

No sistema nervoso, a S100B é expressa em astrócitos, nas células Schwann e em algumas populações neuronais. A proteína em questão atua como um estimulador da proliferação celular e da migração, sendo também um inibidor de apoptose e da diferenciação e, portanto, pode ter papel importante no processo de desenvolvimento e regeneração/reparo do SNC ^{46; 47; 48}. Quando secretada por astrócitos, a S100B apresenta diferentes efeitos sobre os neurônios, nos próprios astrócitos e na micróglia, dependendo da concentração: em concentrações nanomolares, observa-se que a S100B se comporta como uma neurotrofina protegendo células neuronais contra estímulos neurotóxicos; em concentrações micromolares, pode acarretar em morte de neurônios por estimulação excessiva de ERK1/2, produção de ROS e de efeitos neurotóxicos de beta-amilóides; em doses elevadas, é considerada pró-sobrevivência ⁴⁶.

Na astrogliose reativa, o aumento de cálcio intracelular estimula o aumento da atividade de S100 ^{44; 48}. Em doses baixas, S100B estimula a proliferação de astrócitos, em doses elevadas, promove inflamação em astrócitos ⁴⁶.

1.7 Epigenética

O termo “epigenética” engloba as modificações na conformação da cromatina, que são herdáveis e exercem papel fundamental na determinação de padrões de transcrição e silenciamento gênicos, sem alterar a sequência primária do ácido desoxirribonucleico (DNA) ^{49; 50}. Além disso, a epigenética permite que alterações no meio externo influenciem de maneira reversível a expressão gênica da célula, possibilitando a diferenciação de milhares de células partindo de um mesmo código genético, o DNA ^{50; 51}.

O nucleossomo, que corresponde a unidade fundamental da cromatina, é constituído por uma unidade de DNA dividida em duas espirais que se enrolam em torno de um octâmero proteico. Embora o core do nucleossomo seja constituído por 4 pares de proteínas, denominadas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) ^{52; 53}, ainda podemos encontrar histonas avulsas H1 ou H5 ligadas ao DNA e entre os nucleossomos propriamente dito, estabilizando da estrutura como um todo (Figura 1).

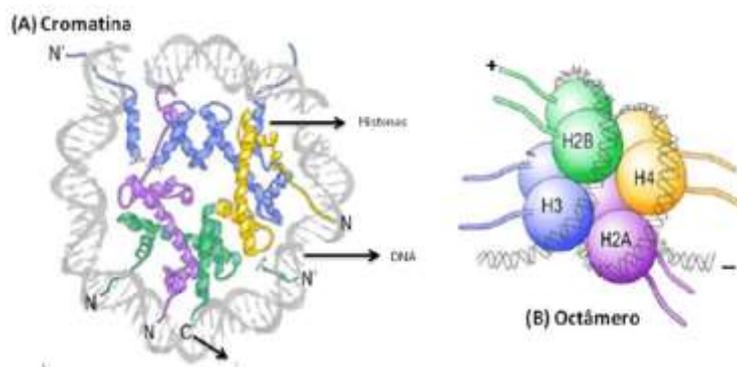


Figura 1 (A) Estrutura da cromatina, formada por histonas e dupla fita de DNA; (B) Representação do nucleossomo (octâmero proteico) (Adaptada de ⁵⁴)

Sabe-se que a alteração do posicionamento do nucleossomo altera a conformação da cromatina e conseqüentemente a expressão gênica. Quando compactada, a cromatina dificulta o processo de transcrição e, portanto, é associada com o silenciamento gênico e o mecanismo contrário, ao aumento da expressão gênica ^{11; 52; 53; 55; 56; 57}. Embora o mecanismo de mudança na organização da cromatina englobe modificações bioquímicas tanto nas histonas quanto no DNA sem alterar o genoma (Figura 2), as modificações nas histonas são mais descritas.

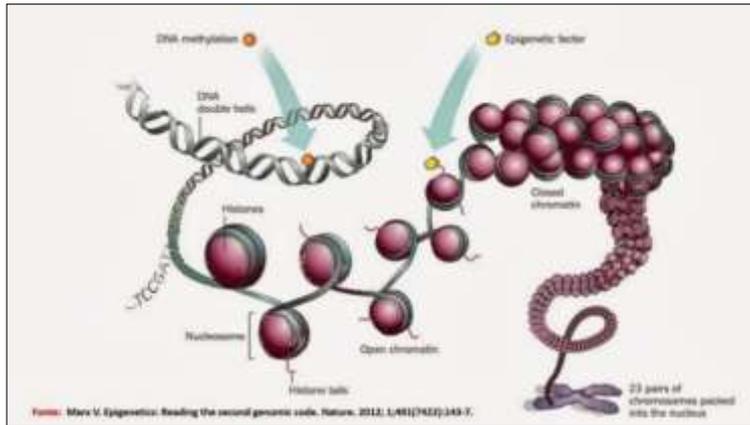


Figura 2 Conformação da cromatina: eucromatina e heterocromatina. (Adaptada de ⁵⁸)

Existem diversos mecanismos epigenéticos relacionados às histonas: acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação e ADP-poli-ribosilação ^{52; 53}. Atualmente, a reação mais elucidada é a acetilação/desacetilação de histonas, que adicionam ou removem o grupo acetil de sítios específicos das histonas denominados lisinas-K ^{52; 53; 54}, respectivamente.

A histona, que é constituída por resíduos dos aminoácidos lisina e arginina e apresenta carga positiva, quando acetilada pelas enzimas histona acetiltransferases (HATs), sofre neutralização de sua carga, diminuindo sua afinidade pelo DNA, que apresenta carga negativa ^{53; 54}. A diminuição da ligação histona-DNA promove o relaxamento da cromatina ^{55; 56}, permitindo o acesso de fatores transcricionais, e, portanto, o aumento na expressão gênica ^{11; 53; 55}. O mecanismo reverso, a desacetilação é catalisada pelas enzimas histona desacetilases (HDACs) e promove aumento da afinidade entre o DNA e a cromatina com conseqüente aumento na sua condensação. ^{53; 55; 56; 57} (Figura 3). A alteração da cromatina para o estado de heterocromatina, quando a mesma se encontra mais compacta, dificulta o acesso do complexo de transcrição gênica e está relacionado ao silenciamento gênico ^{11; 53; 55; 56; 57}.

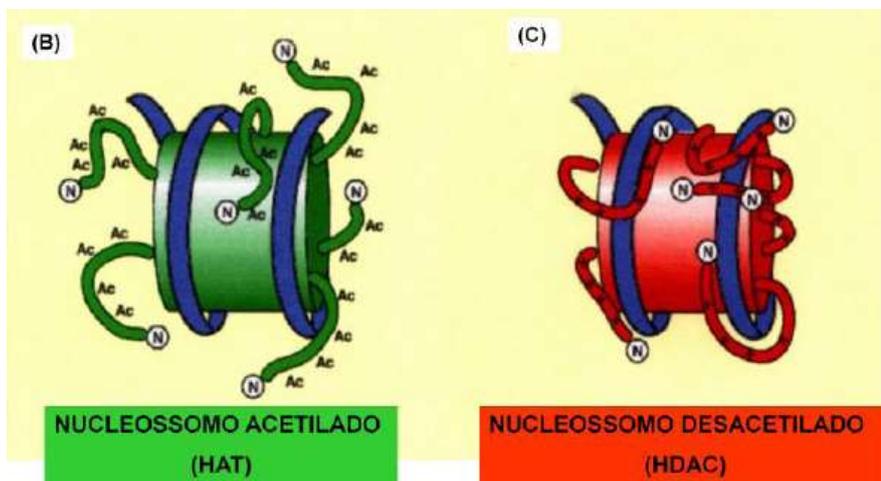


Figura 3 Atividade das enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC) (B) Eucromatina, cromatina “aberta” (C) Heterocromatina, cromatina condensada (Adaptado de <http://bricker.tcnj.edu/Amb/amble9.html>)

1.8 Epigenética e histonas nas lesões do sistema nervoso central

Atualmente, vários autores têm descrito que o meio ambiente é capaz de influenciar de maneira reversível a expressão gênica da célula ^{50; 51}. A maioria desses estudos descrevem modelos animais que relacionam a acetilação das histonas ao desenvolvimento normal e patológico do sistema nervoso central ^{59; 60; 61; 62}.

Pesquisas demonstram que a acetilação de histonas H4 tem potencial de regular as neurofinas, como o BDNF; e diversas disfunções neurológicas como a doença de Parkinson, Coreia de Huntington ^{59; 63; 64} e ataxia de Friedrich ⁵⁹. A hipoacetilação, no entanto, estaria relacionada com a sinaptogênese e plasticidade sináptica ^{65; 66}; a formação e aprimoramento da memória e aprendizado; os efeitos da degeneração e do envelhecimento; doença de Alzheimer ⁶⁷ e as disordens hipocâmpais ⁶⁸.

No estudo de Finelli e colaboradores ⁶⁹, foi observado um aumento na acetilação de H4 nos promotores de genes associados à regeneração (RAG) após a axotomia periférica, mas não após a lesão central ⁶⁶. Em contrapartida, a diminuição da acetilação de histona H4 está associada à redução da expressão de RAG e do potencial de crescimento axonal ⁶⁹. Um achado importante desse estudo é a capacidade regenerativa dos neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal pós-lesão e a sua relação com aumento tanto global quanto gene-específico da acetilação de histona H4.

Do mesmo modo, sabe-se que o desequilíbrio entre as enzimas HAT e HDAC com prevalência da atividade de HDAC desempenha um papel importante no desenvolvimento da disfunção e toxicidade neuronal encontradas nas disfunções neurodegenerativas ^{60; 70}.

Fischer e colaboradores ⁷¹ observaram associação entre a hipoacetilação de H4K12, o aumento de expressão de HDAC2 e o déficit na memória de longa duração (LTM). Em concordância, o estudo de Guan et al., 2009 ⁶⁵ demonstrou déficit de memória no labirinto aquático de Morris seguida do aumento da expressão de HDAC2 e associação negativa de HDAC2 à sinaptogênese e plasticidade sináptica. Do mesmo modo, Peleg et al., 2010 ⁷² e Graff et al., 2012 ⁷³ relacionam a acetilação de H4K12 com a redução do aprendizado e, de memória e de plasticidade, respectivamente.

2. JUSTIFICATIVA

A lesão medular é caracterizada por um dano neurológico permanente no sítio e abaixo da lesão^{1; 2; 3}, o que impacta na saúde física e psicológica bem como na qualidade de vida dos sujeitos acometidos, já nos primeiros meses⁵. A organização mundial da saúde estima que, a cada ano, cerca de 250.000 a 500.000 pessoas se tornem lesados medulares, sendo a maioria homens (2:1) na sua fase produtiva, o que ocasiona um alto custo ao governo e à sociedade⁷.

Os danos neurológicos gerados podem se apresentar em diferentes graus de acordo com o nível, tipo e modelo da lesão. No entanto, sabe-se que independentemente da lesão, os danos são causados inicialmente pela perda da integridade das estruturas vasculares e neurais da medula espinhal que interrompe parcial ou totalmente a condução do sinal elétrico³. Posteriormente, mecanismos secundários ativam a resposta inflamatória e astrogliosa para conter a lesão e preservar o tecido perilesional^{1; 5; 15}.

Contudo, a progressão desses eventos excede a capacidade dos sistemas em conter a lesão culminando com expansão do dano primário no plano axial e longitudinal, e inibição da regeneração espontânea natural do tecido. Nesta fase da astrogliose são observadas características importantes que acarretam na falha da regeneração axonal: o aumento da concentração de S100B promove a inflamação em astrócitos e pode acarretar em efeitos neurotóxicos; o aumento irreversível na expressão de GFAP acarreta em aumento excessivo da proliferação e hipertrofia astrocitária^{19; 20} com sobreposição dos astrócitos quanto aos seus domínios. A disposição dos astrócitos altera irreversivelmente a configuração do tecido, criando um ambiente hostil para processos de reparo e reconexão medular^{41; 42}, e um meio tóxico para as células remanescentes. Além disso, sabe-se que com a maturação do SNC, as células neuronais sofrem mudanças transcricionais a longo prazo e, portanto, há uma diminuição da plasticidade. A reversão desse declínio é associada com a modulação da resposta de expressão gênica após a interação gene-ambiente.

Neste contexto, sabe-se que as modificações epigenéticas são capazes de ativar e regular o comportamento celular através da modulação da transcrição e silenciamento gênico⁵¹. Estudos têm mostrado que a resposta secundária está relacionada com o remodelamento da estrutura da cromatina e da regulação das modificações gênicas induzidas pela lesão. Acredita-se que a hiperacetilação de histonas possa influenciar as células inflamatórias e imunológicas na redução da disfunção da barreira hematoencefálica, da desmielinização axonal e da apoptose neuronal induzida por stress oxidativo, modulando assim o processo inflamatório e o impacto da lesão⁷⁴.

Contudo, o perfil de acetilação geralmente não é homogêneo entre as diferentes histonas e especula-se que a histona H4 esteja intimamente relacionada ao desenvolvimento e reparo do

SNC ⁵⁹: ⁶⁰. Além disso, vários estudos descrevem que a histona H4 possui um importante envolvimento nos processos neroplásticos centrais: sinaptogênese, plasticidade sináptica, memória, aprendizagem, reversão da degeneração e do envelhecimento.

Atualmente, nós ainda não temos informação conclusiva sobre o papel da epigenética na instauração da astrogliose reativa pós-lesão medular, especialmente na primeira semana. Logo, verificar a possível relação entre a expressão de proteínas relacionadas com a astrogliose reativa pós-lesão medular experimental e os níveis globais de acetilação da histona H4 é deveras importante para o futuro desenvolvimento de terapêuticas que possam modular este processo, contribuindo, potencialmente, para o futuro desenvolvimento de drogas que facilitem a recuperação e a reabilitação sensório-motora funcional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar, no tecido medular espinal ratos Wistar adultos, a possível a relação entre os níveis de proteínas relacionadas com a astrogliose reativa pós-lesão medular experimental e os níveis globais de acetilação da Histona H4.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o perfil temporal dos níveis de GFAP (6h, 24h, 48h, 72h e 7 dias) no tecido perilesional pós-lesão medular contusa experimental;
- b) Avaliar o perfil temporal dos níveis de S100B (6h, 24h, 48h, 72h e 7 dias) no tecido perilesional pós-lesão medular contusa experimental;
- c) Avaliar o perfil temporal dos níveis globais de acetilação da histona H4 (6h, 24h, 48h, 72h e 7 dias) no tecido perilesional pós-lesão medular contusa experimental;
- d) Avaliar o valor preditivo da variável epigenética estudada sobre os níveis das proteínas S100 e GFAP (marcadores da progressão da astrogliose reativa) por meio de análises de correlação e regressão linear.

4. MÉTODO, RESULTADOS E DISCUSSÃO

A descrição dos métodos, os resultados alcançados e a discussão serão apresentados na forma de artigo científico (item 4.1), o qual foi submetido ao periódico científico internacional *Neurorehabilitation and Neural Repair*, fator de impacto 4,035.

O material utilizado no presente estudo faz parte de um projeto guarda-chuva maior, realizado em parceria entre a UFRGS e a PUCRS, intitulado “*Efeito do Transplante de Células-Tronco Mesenquimais de Dente Decíduo Humano Sobre a Neuroproteção, Inflamação e Recuperação Funcional de Ratos Wistar Submetidos à Lesão Medular*”.

4.1 Artigo Científico

Regis Gerasca Mestriner

De: onbehalfof+nnr+kumc.edu@manuscriptcentral.com em nome de Neurorehabilitation & Neural Repair
<onbehalfof+nnr+kumc.edu@manuscriptcentral.com>
Enviado em: quarta-feira, 25 de janeiro de 2017 15:59
Para: Regis Gerasca Mestriner; regis.mestriner@gmail.com
Cc: may.fmenezes@gmail.com; fabricionicola@hotmail.com; ivyreicher@gmail.com; elsner.viviane@gmail.com; Leder Leal Xavier; adriana.vizuite@gmail.com; casg@ufrgs.br; netto@gabinete.ufrgs.br; Regis Gerasca Mestriner; regis.mestriner@gmail.com
Assunto: Neurorehabilitation & Neural Repair - Manuscript ID NNR-17-0021

25-Jan-2017

Dear Dr. Mestriner:

Your manuscript entitled "Global acetylation levels of histone H4 are time-dependent and weakly related to the glial fibrillary protein levels in spinal cord injured rats." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Neurorehabilitation & Neural Repair.

Your manuscript ID is NNR-17-0021.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when contacting the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/nnr> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/nnr>.

Thank you for submitting your manuscript to the Neurorehabilitation & Neural Repair.

Sincerely,
Neurorehabilitation & Neural Repair Editorial Office

Neurorehabilitation & Neural Repair currently has an Impact Factor of 4.035 (Thomson Reuters, 2016 Journal Citation Reports), the highest of 65 rehabilitation journals and #37 of 192 clinical neurology journals.

Neurorehabilitation & Neural Repair is the official journal of the American Society of Neurorehabilitation (ASNR). Corresponding authors who are members ASNR will receive the first page of color printed in the journal at no charge. Please visit www.asnr.com for membership information.

Neurorehabilitation & Neural Repair

Global acetylation levels of histone H4 are time-dependent and weakly related to the glial fibrillary protein levels in spinal cord injured rats.

Journal:	<i>Neurorehabilitation & Neural Repair</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	de Menezes, Mayara; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul Nicola, Fabrício; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Biociências Reicherd, Ivy; Centro Universitario Metodista Elsner, Viviane; Centro Universitario Metodista Xavier, Léder; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ciências Morfofisiológicas Vizuete, Adriana; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Biociências Gonçalves, Carlos ; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Biociências Netto, Carlos; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Biociências Mestriner, Régis; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Physiotherapy
Keyword:	Epigenomics, Histones, Spinal cord injury, Glial fibrillary acidic protein, S100 calcium-binding protein B, Astrocytes
Abstract:	Epigenetic modulation can influence axonal growth as well as the astrocytic properties and glial scar development after spinal cord injury. Accumulating biological evidence indicates modulation of histone acetylation status could improve movement function following this neurological condition. Previous studies have also suggested that global histone H4 acetylation status plays a fundamental role in synaptogenesis, synaptic plasticity, memory performance and learning. Nonetheless, whether global levels of histone H4 acetylation influence the role of astrocytes after spinal cord injury is still unknown. Here, we address the predictive value of global histone H4 acetylation status to determine both glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100 calcium-binding protein B (S100B) levels in the perilesional spinal cord. Our data show the damage to the spinal cord dramatically changes the predictive value of global histone H4 acetylation status in detecting GFAP levels. Surprisingly, S100B protein levels were not predicted by global histone H4 acetylation status. Finally, we reinforce the time-dependency of global histone H4 acetylation changes following spinal cord injury. These findings may guide further research regarding therapeutic epigenetic modulation in this devastating

<http://mc.manuscriptcentral.com/nnr>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	and life-changing disease.

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

1
2
3 Article type: Original research article
4
5

6
7 **Global acetylation levels of histone H4 are time-dependent and weakly**
8 **related to the glial fibrillary protein levels in spinal cord injured rats.**
9

10
11 **Authors**

12 Mayara Ferraz de Menezes^{1,2}; Fabrício Nicola³; Ivy Reichert Vital da Silva⁴; Viviane
13 Rostirola Elsner⁴; Léder Leal Xavier^{1,2}; Adriana Vizuete³; Carlos Alberto Gonçalves³;
14 Carlos Alexandre Netto³; Régis Gemerasca Mestriner^{1,2}.
15
16
17
18
19

20
21 ¹ Neurorehabilitation and Neural Repair Research Group, Pontifícia Universidade
22 Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
23

24 ² Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Pontifícia Universidade
25 Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
26

27 ³ Department of Biochemistry, Basic Science Institute, Universidade Federal do Rio
28 Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
29

30 ⁴ Graduate Program in Biosciences and Rehabilitation. Centro Universitário IPA
31 Metodista, Porto Alegre, RS, Brazil.
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **Correspondence Author:**

41 Régis Gemerasca Mestriner, PhD

42 Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

43 Neurorehabilitation and Neural Repair Research Group

44 Phone/Fax: 55 51 33203646

45 e-mail: regis.mestriner@puers.br
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Epigenetic modulation can influence axonal growth as well as the astrocytic properties and glial scar development after spinal cord injury. Accumulating biological evidence indicates modulation of histone acetylation status could improve movement function following this neurological condition. Previous studies have also suggested that global histone H4 acetylation status plays a fundamental role in synaptogenesis, synaptic plasticity, memory performance and learning. Nonetheless, whether global levels of histone H4 acetylation influence the role of astrocytes after spinal cord injury is still unknown. Here, we address the predictive value of global histone H4 acetylation status to determine both glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100 calcium-binding protein B (S100B) levels in the perilesional spinal cord. Our data show the damage to the spinal cord dramatically changes the predictive value of global histone H4 acetylation status in detecting GFAP levels. Surprisingly, S100B protein levels were not predicted by global histone H4 acetylation status. Finally, we reinforce the time-dependency of global histone H4 acetylation changes following spinal cord injury. These findings may guide further research regarding therapeutic epigenetic modulation in this devastating and life-changing disease.

Keywords: Epigenomics, Histones, Spinal cord injury, Glial fibrillary acidic protein; S100 calcium-binding protein B; Astrocytes.

1. Introduction

Spinal cord injury (SCI) is an important cause of disability in adults, imposing a significant economic burden worldwide [1]. Traumatic events, such as car accidents, falls and urban violence are among the main causes of SCI [1-3].

For many years researchers have worked to develop neuroprotective strategies, mostly focused on neurons or the neurovascular unit [4, 5], however, the modulation of molecular cascades after central nervous system (CNS) injuries, such as SCI, is still a matter of debate since preclinical findings have not yet been successfully translated from the bench to the bedside [6-8]. This is critical because an understanding of injury-induced plasticity usually provides insights into new therapeutic targets [8].

It has been shown epigenetic modifications are influenced by gene-environment interactions, which change neural cell activity through gene transcription and silencing [9-11], affecting cellular mechanisms of neuroplasticity [1, 12, 13]. For instance, histone-modifying enzymes can remodel the chromatin structure indirectly by regulating the expression of injury-induced genes [14-16]. The histone acetylation status is regulated by histone acetyl transferases (HATs) and histone deacetylases (HDAC), which add and remove acetyl groups to N-terminal histone tails, respectively, thus inducing short or long-term chromatin architecture modulation [17-19]. Moreover, the imbalance of these enzyme activities are related to neurological disorders [15, 18, 20].

Previous reports have suggested epigenetic modulation can influence axon growth potential as well as the properties of reactive astrogliosis development after SCI [1, 10, 14, 15]. Additionally, several studies have associated global histone H4 acetylation levels with normal and pathological development of the central nervous system. For example, H4 histone may become hyperacetylated in Parkinson's disease [21], Huntington's chorea [20] and Friedreich's ataxia [22]. By contrast, changes in H4 acetylation play a fundamental role in synaptogenesis, synaptic plasticity, learning and memory [12, 13, 19]. Nevertheless, whether global levels of H4 acetylation influence the role of astrocytes after SCI is still unknown.

Astroglial response after injury - a graded and multi-stage process involving various molecular and morphological changes - has been described as an evolutionary conserved defensive key factor for neural repair and plasticity [23-25]. However, astrocytes have a dual role in neurotrauma [25]. On the one hand, they play an essential role in isolating injured spinal cord tissue (cystic cavity and surrounding cells) and triggering neuroprotective mechanisms [5, 23, 25]. On the other hand, an exaggerated

1
2
3 astrocytic response can inhibit plasticity and repair processes such as axonal rewiring
4 and neuronal sprouting [23, 25, 26]. While glial fibrillary acid protein (GFAP) and/or
5 vimentin depletion as well as metabolic astrocyte inhibitors have been used to modulate
6 reactive astrogliosis after central nervous system injury, their efficacy in promoting
7 functional recovery is still a matter of controversy [27, 28]. Moreover, while GFAP is
8 not homogeneously expressed in a normal post-matured CNS, it labels most astrocytes
9 responding to an injury [29, 30]. Likewise, a study from Brozzi and cols. [31] has
10 shown that S100 calcium-binding protein B (S100B) protein is critical for astrocyte
11 migration and shaping. Indeed, S100B is also a commonly used marker for reactive
12 astrocytes detection after SCI [30, 31].

13
14 It is then possible to hypothesize global levels of H4 acetylation and the level
15 pattern of GFAP and S100B proteins may be related, which constitutes an important
16 breakthrough in neural repair and recovery after SCI. The present study was designed to
17 determine relationship between global H4 acetylation and both GFAP and S100B
18 proteins levels (as astrocyte reactivity markers) at different time-points (6h, 24h, 48h,
19 72h and 7days) after a thoracic SCI model in rats.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2. Methods

2.1. Animals

A total of 61 male Wistar rats (3 months old, $\pm 300\text{g}$) were obtained from the Central Animal House of the Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul ($n=18$ animals were used in experiment 1 and $n=43$ in experiment 2). The animals were housed in standard laboratory conditions, with free access to food and water, under a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with room temperature maintained at 22–24 °C. All procedures were in accordance with the National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with the Brazilian Council for Animal Experiments Control (Concea). The Animal Bioethics Committee of both Universidade Federal do Rio Grande do Sul (process number 26116) and Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (process number 15/00492) approved the study protocol.

2.2. Spinal cord injury model

Firstly, all animals were deeply anesthetized with a mixture of xylazine (100–150 mg/kg) and ketamine (60–90 mg/kg). After that, the vertebral column was exposed between T9 and T10 and a total laminectomy was performed at T10 level without dura mater dissection. The New York University Impactor (NYU-Impactor[®]; W.M. Keck Center for Collaborative Neuroscience, USA) was used to induce a moderate SCI, as previously described [32, 33]. Briefly, the exposed vertebral column was stabilized and the dorsal surface of the spinal cord received a 10-g weight dropped from a height of 25 mm. After the SCI procedure, animals were sutured in layers and housed in individual cages. Bladder evacuation was performed daily until they recovered the function. Enrofloxacin (Bayer, Brazil; 6 mg/kg) was administered for 7 days after the procedure to prevent secondary infection. The sham group received all the described procedures, with the exception of SCI induction.

2.3. Experimental design

In the part 1 of the experiment, a morphological assay was performed. This was an important first step to guarantee that SCI injury was detectable at the studied time-points. Thus, the following groups were established: sham ($n=3$); 6h post-SCI ($n=3$); 24h post-SCI ($n=3$); 48h post-SCI ($n=3$); 72h post-SCI ($n=3$); 7 day post-SCI ($n=3$).

1
2
3 In the part 2, the global H4 acetylation, GFAP and S100B levels using the
4 ELISA method with spinal cord perilesional tissue was assessed. Moreover, we tested
5 their possible association at the same above-mentioned time-points. As above, the rats
6 were divided into the sham (n=8); 6h post-SCI (n=7); 24h post-SCI (n=7); 48h post-SCI
7 (n=7); 72h post-SCI (n=8) and 7 day post-SCI (n=6) groups.
8
9

10 11 12 13 **2.4. Morphological Assessment**

14
15
16 In the first part of the experiment, rats were anesthetized with pentobarbital (100
17 mg/kg *ip*; Cristália, Brazil) and underwent transcardiac perfusion with 0.9% saline
18 followed by 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in 0.1 M phosphate buffer (PBS,
19 pH 7.4) at each determined time-point after SCI. Following which, the spinal cord was
20 removed (from C5 to L5), post-fixed in the same fixative solution and cryoprotected
21 with 15 and 30% sucrose diluted in phosphate buffer saline (PBS). After that, the
22 samples were frozen in isopentane, cooled in liquid nitrogen until slicing. For
23 histological measurements, the thoracic region of the spinal cord was transversely cut
24 into 20µm sections using a cryostat (Leica, Germany) [32]. The sections were stained
25 with hematoxylin and eosin technique and the images captured using a Nikon Eclipse E-
26 600 microscope (Japan) coupled to a digital camera.
27

28 Thirty transversal 20µm sections from each animal were processed to analyze the
29 cavitation area. Sequential sections with an interval of 300µm were collected. The
30 cavitation area in each sequential slice was determined and the largest cavitation area
31 slice (called the epicenter) was identified. The epicenter was traced using Image J
32 software; any necrotic tissue within the cavities was considered part of the lesion and
33 the total sum of the areas was calculated [32, 33].
34
35

36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 **2.5. The ELISA method**

47 In the second part of the experiment, we performed the ELISA method to assess
48 the global H4 acetylation, GFAP and S100B levels [34, 35]. Rats were euthanized using
49 a guillotine method, followed by spinal cord dissection. Spinal cord sections 1
50 millimeter above and below from the T10 level (perilesional tissue) were processed, as
51 follow.
52
53

54 55 56 57 58 **2.5.1. Protein content**

1
2
3 Lowry's method, with bovine-serum albumin (BSA) as standard, was used to
4 determine the protein content [34].
5
6

7 8 2.5.2. Global H4 acetylation levels

9
10 Global H4 acetylation levels were measured using the Global Histone H4
11 Acetylation Assay Kit (Colorimetric Detection, catalog number P-4009, EpiQuik USA)
12 following the manufacturer's recommendation. Perilesional tissue was homogenized
13 with a specific lysis buffer kit (nuclear extraction phase), which facilitated histone
14 extraction. The samples were incubated in trichloroacetic acid (TCA), hydrochloric acid
15 (HCl) and acetone. Five centrifugations were performed during the entire protocol. The
16 pellet obtained in this process was used to establish the global H4 acetylation levels.
17 Then, the samples were incubated in the developing solution. Finally, the stopping
18 solution was added. All readings were made at 405 nm in a 96 well-plate reader
19 (ThermoPlate, São Paulo, Brazil). Results are expressed as ng/mg [35].
20
21
22
23
24
25
26

27 28 2.5.3. GFAP levels

29
30 Perilesional tissue was homogenized in PBS (50 mM NaCl, 18 mM Na₂HPO₄,
31 83 mM NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4), containing 1mM EGTA and 1mM phenylmethyl-
32 sulphonyl fluoride (PMSF). The GFAP content was measured using the ELISA method,
33 as described published (18). The GFAP assay consisted of coating the samples with
34 100µL containing 70µg of protein and leaving them overnight at 4°C. The next day, the
35 samples were incubated in a polyclonal anti-GFAP antibody from rabbit (Dako, USA)
36 for 2 hours and then in a peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako, USA) for 1
37 hour, at room temperature. The color reaction with o-phenylenediamine-dihydrochloride
38 (OPD) was measured at 492 nm. The standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10
39 ng/mL. Results are expressed as ng/mg [34].
40
41
42
43
44
45
46
47

48 2.5.4. S100B levels

49
50 To assess the S100B levels, the same homogenized tissue used for GFAP
51 detection was employed, as previously described [36]. Briefly, 50µl of sample plus 50µl
52 of Tris buffer were incubated for 2 hours on a microtiter plate previously coated with a
53 monoclonal anti-S100B antibody (Dako, USA) for 30 minutes. After which, a
54 peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Dako, USA) was added for a further 30
55
56
57
58
59
60

1
2
3 minutes. The color reaction with OPD was measured at 492nm. The standard S100B
4 curve ranged from 0.02 to 1 ng/ml. Results are expressed as ng/ μ g of protein [36].
5
6

7 8 **2.6. Statistical Analysis**

9
10 Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. One-way ANOVA
11 followed by the Bonferroni *post hoc* test was used to detect group differences, as
12 indicated. Pearson's correlation coefficient and simple linear regression tests were
13 conducted to assess the relationship between the global H4 acetylation levels and those
14 of both GFAP and S100B in perilesional tissue from spinal cord. All variables are
15 expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Results were considered
16 significant when $P \leq 0.05$. SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc.,
17 Chicago, USA) was used for data analysis.
18
19
20
21
22

23 24 25 **3. Results**

26 There were no death or surgical complications (i.e. wound infection) in this
27 study. All spinal cord injured rats exhibited visible hindlimb motor deficits from
28 immediate post-surgery to the end of the experiments. All evaluated outcomes exhibited
29 normal distribution and, thus, parametric analysis were performed.
30
31
32

33 34 35 **3.1. Experiment, part 1**

36 37 **3.1.1. Cavitation area**

38 The spinal cord injury model induced changes in the epicenter of the cystic
39 cavity at the evaluated time-points ($F_{5,17}=15.49 / P=0.0001$). Between-group (time-
40 points) analysis revealed no changes between the sham and 6h post-SCI groups
41 ($P=0.97$). However, these same groups were different from the others: 24h, 48h, 72h
42 and 7 day post-SCI groups ($P \leq 0.03$) (Figure 1). No additional differences were found.
43 Together, these data suggest: a) our injury model was able to induce an experimental
44 SCI in rats; and b) the cavity area at the lesion epicenter is comparable between the 24h,
45 48h, 72h and 7 day post-SCI groups. All these results are in agreement with the
46 literature [15, 32, 33, 37-40] and supported the second part of the study.
47
48
49
50
51
52

53 54 55 **3.2. Experiment, part 2**

56 57 **3.2.1. Global histone H4 acetylation levels**

58
59
60

1
2
3 One-way ANOVA revealed that global histone H4 acetylation levels changed at
4 the evaluated time-groups ($F_{5,42}=12.94 / P=0.0001$). *Post hoc* tests showed the 72h post-
5 SCI group was different from all the other groups ($P\leq 0.03$), revealing an important
6 increase in global histone H4 acetylation levels at this time-point. Moreover, there was
7 an additional difference between the 24h and 7 day post-SCI groups ($P=0.01$). No
8 further differences were found between the sham group versus 6h, 24h, 48h and 7 day
9 post-SCI groups ($P>0.05$) (Figure 2A). Overall, these data suggest global histone H4
10 acetylation levels in the perilesional tissue are time-dependent after SCI.
11
12
13
14
15
16

17 3.2.2. GFAP levels

18 GFAP levels changed at the evaluated time-points ($F_{5,42}=21.46 / P=0.0001$).
19 Between-group analysis revealed the 48h post-SCI group was different from the other
20 groups ($P\leq 0.04$). Moreover, the sham, 6h and 24h post-SCI groups were significantly
21 different from the 72h and 7 day post-SCI groups ($P<0.05$). No additional differences
22 were found (Figure 2B). These results are in agreement with the literature [27, 29, 30]
23 and reinforce GFAP, a widely used biomarker of astrocytic reactivity, is highly detected
24 post-SCI, starting from 48h (considering the assessed endpoints).
25
26
27
28
29
30
31

32 3.2.3. S100B levels

33 Data analysis showed changes in S100B levels at the studied time-points
34 ($F_{5,42}=6.76 / P=0.0001$). Interestingly, we observed the 48h post-SCI group had lower
35 levels of S100B protein compared to the other studied time-point groups ($P\leq 0.03$). In
36 addition, a significant increase in S100B levels was observed in the 7 day post-SCI
37 group compared to the sham ($P=0.02$), 6h ($P=0.01$), 24h ($P=0.006$) and 48h ($P=0.001$)
38 post-SCI groups (Figure 2C). This indicates S100B and GFAP levels display differing
39 behavioral patterns (see above data) after the SCI model.
40
41
42
43
44
45
46
47

48 3.3.3. Global histone H4 acetylation levels, GFAP and S100B relationship

49 The relationship between global histone H4 acetylation levels and GFAP or
50 S100B levels is shown in tables 1 and 2. Because the levels of these endpoints were
51 time-dependent, the *Pearson's* correlation coefficient was run in each studied time-
52 group. There was a strong positive correlation between global histone H4 acetylation
53 and GFAP levels only in the undamaged animals (sham group) ($r=0.77 / P=0.02$).
54 Pooled data analysis (from all groups) was performed and showed the same pattern
55
56
57
58
59
60

($r=0.44 / P=0.003$), but with a weak to moderate correlation index. Interestingly, the pooled data analysis of the SCI groups (excluding sham animals) showed a weak significant correlation coefficient between global histone H4 acetylation and GFAP levels ($r=0.41 / P=0.01$). Surprisingly, no correlation was found between the global histone H4 acetylation and S100B levels.

Furthermore, to test the predictive potential of global histone H4 acetylation to detect GFAP levels, simple linear regressions were performed when a statistically significant difference in the *Pearson's* correlation coefficient was detected. The global histone H4 acetylation levels significantly predicted the GFAP levels in undamaged animals ($R^2=0.598 / P=0.02$). Moreover, the global histone H4 acetylation levels also explained GFAP levels in the all-group-pooled data ($R^2=0.194 / P=0.003$) and SCI-group-pooled data ($R^2=0.172 / P=0.007$). In summary, we found the global histone H4 acetylation levels explained 59.8% of the GFAP levels in undamaged spinal cord. However, this predictive potential was weaker when all groups (19.4%) or SCI groups (17.2%) were analyzed.

4. Discussion

In the current study, as a first step, we have shown the SCI model was reproducible, as previously published [15, 32, 33, 37-40]. Moreover, the time curves of the assessed biochemical markers (global histone H4 acetylation, GFAP and S100B levels) were also in agreement with the literature [16, 22, 30, 34, 36, 41, 42], allowing us to move towards the main goal of this investigation: acute and subacute epigenetic modulation (global histone H4 acetylation status) and its impact on astrocyte-related protein levels following an experimental thoracic spinal cord injury.

There is a significant body of evidence suggesting histones and histone-modifying enzymes are able to reshape the chromatin structure and change the gene expression after a central nervous system injury [14, 16, 43, 44]. The main finding of this study was that a spinal cord injury at the thoracic level in adult Wistar rats can dramatically change the predictive value of global histone H4 acetylation status in detecting GFAP levels from 59.8% in the undamaged to 17.2% in perilesional tissue. These results suggest tissue microenvironment could determine global histone acetylation patterns and their influence on astrocyte-related protein levels. To the best of our knowledge, this is the first study to show the predictive value of the global histone H4 acetylation status is injury-dependent when explaining GFAP levels. A novel

1
2
3 finding that emerged from our study suggests a complex injury-dependent relationship
4 between global histone H4 acetylation levels and the expression of astrocyte-related
5 proteins.
6

7
8 Several studies have proposed histone deacetylases (HDACs) and histone
9 acetyltransferases (HATs) play a central role in regulating histone proteins that impact
10 on astrocyte gene expression [37, 45, 46]. Although global histone acetylation profiles
11 are less precise in determining gene expression than specific acetylation and
12 deacetylation sites of lysine residues (located in the N termini of histones), certain
13 acetylation patterns might be useful to monitor the regulation of wide and highly
14 complex biological processes [42], such as reactive astrogliosis after spinal cord injury.
15 For example, the *gfap* gene may be influenced by complexes containing HDAC or
16 HDAC inhibitors [47]. Our findings can be understood in the same way, while
17 expanding on previous knowledge. Therefore, further experiments intended to modulate
18 epigenetics after spinal cord injury may consider this dual predictive-value of the global
19 histone H4 acetylation status on astrocyte behavior and its potential to modulate neural
20 repair.
21

22
23 In addition, our data also revealed the global histone H4 acetylation status did
24 not influence S100B levels in either undamaged or perilesional tissue. S100B is a
25 protein involved in several mechanisms, such as extension control, shaping the astrocyte
26 processes and glial scar progression [30, 31]. This interesting finding suggests S100B
27 might be functionally independent from the GFAP after a spinal cord injury. Likewise,
28 other epigenetic influences might modulate S100B, which is a matter for further
29 investigation.
30

31
32 Although both treadmill exercise [48, 49] and pharmacological interventions
33 such as valproic acid administration [16, 40] can influence global histone H4 acetylation
34 levels, it is unknown whether these interventions strengthen the relationship between
35 histone H4 acetylation status and the expression of astrocyte proteins. Furthermore,
36 other epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, acetylation of other histones,
37 or lysine-specific acetylation in histone tails [10, 17, 20, 42, 44], might influence glial
38 protein level control. All these issues are a matter for further investigation.
39

40
41 In this study, we also tested the global histone H4 acetylation levels in different
42 time-points after spinal cord injury. We showed a tendency of hypoacetylation at 24
43 hours post-injury, but a hyperacetylated status was shown at the later time-points (72h
44 and 7 days post-injury). Lv and cols. [40] showed a decreased relative intensity of
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 histone H4 acetylation from 24h to 2 weeks after a spinal cord injury, which partially
4 contradicts the current results. Hypoacetylation levels after other types of spinal cord
5 injury have been reported [15]. There are various reasonable explanations for these
6 discrepant results. Lv and cols. (46), only used female Wistar rats in their experiments,
7 which may influence the histone-acetylation profile, as previously suggested [50].
8 Additionally, global histone H4 acetylation levels might differ depending on the
9 features of the analyzed tissue, such as injury severity, distance from the injury core and
10 proportion of damaged versus intact surrounding tissue in the collected samples, among
11 others. In our study, only perilesional tissue (1 millimeter above and below the T10
12 level of the spinal cord) was used in the analysis. By contrast, in their experiment, the
13 above-mentioned authors did not mention from which spinal cord levels the samples were
14 obtained. In addition, frequent points of divergence in epigenetic studies might be
15 related to the species used [51], animal age [52], and variations in the experimental
16 model of spinal cord injury [14, 15].

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Finelli and cols. [15] reported increased levels of global histone H4 acetylation
in dorsal root ganglion neurons after peripheral axotomy. Moreover, a histone H4
hyperacetylated status induced by a HDAC inhibitor was shown to contribute to spinal
cord plasticity and improve the potential for axonal growth and expression of
regeneration-associated genes (RAGs) [14, 15]. After a conditioning lesion, the authors
observed a 3-day peak of Smad1 expression, which has been described as an important
cellular signal to activate mechanisms of sensory axon outgrowth [15].
Notwithstanding, the same authors also showed differences in histone H4 acetylation
status were found mainly in neurons rather than glia, which is difficult to verify in our
study as we only used the ELISA method. Notably, the histone acetylation-
deacetylation balance modulates different cell types, such as inflammatory and
immunological cells, which influence the severity of blood-brain barrier dysfunction,
axonal demyelination, oxidative stress and injury impact [53-55]. Nonetheless, whether
specific histone acetylation patterns in different cell types maximize the beneficial
aspects of the reactive astrogliosis is unknown and therefore a matter for further
investigation. Consequently, defining the epigenetic mechanisms that adjust the
phenotypes of reactive astrocytes would help to design strategies to promote wound
healing and tissue integrity after spinal cord injury [14, 15, 45, 54, 55].

Using a different study design, Kim and cols. [38] assessed the expression of the
main regulators of neuronal survival and death related with astrocytes and neuronal cells

1
2
3 of the whole brain using a thoracic model of spinal cord injury in mice. They showed
4 HDAC subtype 1 expression was increased in the brain at one week after the spinal cord
5 injury, but not at three days or two weeks post-injury. Moreover, brain-derived
6 neurotrophic factor and glial-derived neurotrophic factor were also up-regulated in the
7 brain. These results, together with the findings of the present study, suggest that spinal
8 cord injury might modulate the epigenetic machinery, depending on the assessed
9 nervous system structure and the tissue context, influencing cellular behavior not just in
10 the perilesional tissue but beyond to the damaged spinal cord.

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The present study has same limitations. Despite having measured the predictive value of global histone H4 acetylation status on GFAP levels, our data cannot be used to infer changes in *gfap* gene expression. Another point is the ELISA analysis does not allow us to distinguish histone acetylation status between different cell types, such as neurons, astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and endothelial cells, among other.

In conclusion, our main results indicate that global histone H4 acetylation levels have a weak predictive value in explaining perilesional tissue levels of GFAP and cannot explain S100B levels in our experimental spinal cord injury. By contrast, the predictive value of global histone H4 acetylation levels in detecting GFAP in the healthy tissue is important to highlight. Together, these results suggest the histone H4 acetylation status is disrupted by the spinal cord injury, which might affect neural repair and recovery efficacy.

5. Acknowledgements

This research was supported by Brazilian funding agencies CNPq, CAPES and FAPERGS. Léder Leal Xavier, Carlos Alberto Gonçalves and Carlos Alexandre Netto are CNPq investigators.

6. Conflict of interest

The authors state they have no conflicts of interest to declare.

7. References

- [1] Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* Mar;114:25-57.
- [2] Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars).*71(2):281-99.

- 1
2
3 [3] Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, Wing PC. The global map for traumatic spinal cord injury
4 epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord*. Feb;52(2):110-6.
- 5 [4] Wu KW, Kou ZW, Mo JL, Deng XX, Sun FY. Neurovascular coupling protects neurons against
6 hypoxic injury via inhibition of potassium currents by generation of nitric oxide in direct
7 neuron and endothelium cocultures. *Neuroscience*. Oct 15;334:275-82.
- 8 [5] Abeysinghe HC, Phillips EL, Chin-Cheng H, Beart PM, Roulston CL. Modulating Astrocyte
9 Transition after Stroke to Promote Brain Rescue and Functional Recovery: Emerging Targets
10 Include Rho Kinase. *Int J Mol Sci*. Feb 26;17(3):288.
- 11 [6] Maki T, Hayakawa K, Pham LD, Xing C, Lo EH, Arai K. Biphasic mechanisms of neurovascular
12 unit injury and protection in CNS diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. May 01;12(3):302-
13 15.
- 14 [7] Posada-Duque RA, Barreto GE, Cardona-Gomez GP. Protection after stroke: cellular
15 effectors of neurovascular unit integrity. *Front Cell Neurosci*.8:231.
- 16 [8] Tasker RC, Duncan ED. Focal cerebral ischemia and neurovascular protection: a bench-to-
17 bedside update. *Curr Opin Pediatr*. Dec;27(6):694-9.
- 18 [9] Di Giammartino DC, Apostolou E. The Chromatin Signature of Pluripotency: Establishment
19 and Maintenance. *Curr Stem Cell Rep*.2:255-62.
- 20 [10] Maleszka R. Epigenetic code and insect behavioural plasticity. *Curr Opin Insect Sci*.
21 Jun;15:45-52.
- 22 [11] Matas E, Bock J, Braun K. The Impact of Parent-Infant Interaction on Epigenetic Plasticity
23 Mediating Synaptic Adaptations in the Infant Brain. *Psychopathology*.49(4):201-10.
- 24 [12] Vogel-Ciernia A, Matheos DP, Barrett RM, Kramar EA, Azzawi S, Chen Y, et al. The neuron-
25 specific chromatin regulatory subunit BAF53b is necessary for synaptic plasticity and memory.
26 *Nat Neurosci*. May;16(5):552-61.
- 27 [13] Kim MS, Akhtar MW, Adachi M, Mahgoub M, Bassel-Duby R, Kavalali ET, et al. An essential
28 role for histone deacetylase 4 in synaptic plasticity and memory formation. *J Neurosci*. Aug
29 08;32(32):10879-86.
- 30 [14] Wong JK, Zou H. Reshaping the chromatin landscape after spinal cord injury. *Front Biol*
31 (Beijing). Oct;9(5):356-66.
- 32 [15] Finelli MJ, Wong JK, Zou H. Epigenetic regulation of sensory axon regeneration after spinal
33 cord injury. *J Neurosci*. Dec 11;33(50):19664-76.
- 34 [16] Yu IT, Park JY, Kim SH, Lee JS, Kim YS, Son H. Valproic acid promotes neuronal
35 differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation.
36 *Neuropharmacology*. 2009 Feb;56(2):473-80.
- 37 [17] Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new
38 frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. Apr 13;11(5):384-400.
- 39 [18] Park M, Keung AJ, Khalil AS. The epigenome: the next substrate for engineering. *Genome*
40 *Biol*. Aug 31;17(1):183.
- 41 [19] Watson LA, Tsai LH. In the loop: how chromatin topology links genome structure to
42 function in mechanisms underlying learning and memory. *Curr Opin Neurobiol*. Dec 23;43:48-
43 55.
- 44 [20] Saha RN, Pahan K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted
45 acetylation homeostasis. *Cell Death Differ*. 2006 Apr;13(4):539-50.
- 46 [21] Jin H, Kanthasamy A, Harischandra DS, Kondru N, Ghosh A, Panicker N, et al. Histone
47 hyperacetylation up-regulates protein kinase Cdelta in dopaminergic neurons to induce cell
48 death: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration in Parkinson disease. *J Biol*
49 *Chem*. Dec 12;289(50):34743-67.
- 50 [22] Herman D, Janssen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL, Gottesfeld JM. Histone
51 deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol*. 2006
52 Oct;2(10):551-8.
- 53 [23] Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci*.
54 May;16(5):249-63.
- 55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [24] Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage
4 and disease. *Neuron*. Jan 22;81(2):229-48.
- 5 [25] Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive
6 gliosis. *Neurosci Lett*. Apr 17;565:30-8.
- 7 [26] Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits.
8 *Physiol Rev*. Oct;94(4):1077-98.
- 9 [27] Ribotta MG, Menet V, Privat A. Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from
10 GFAP and vimentin transgenic mice. *Acta Neurochir Suppl*. 2004;89:87-92.
- 11 [28] Hayakawa K, Nakano T, Irie K, Higuchi S, Fujioka M, Orito K, et al. Inhibition of reactive
12 astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal
13 cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. Apr;30(4):871-82.
- 14 [29] Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and
15 gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci*. Jun;38(6):364-74.
- 16 [30] Yasuda Y, Tateishi N, Shimoda T, Satoh S, Ogitani E, Fujita S. Relationship between
17 S100beta and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after
18 mild transient ischemia. *Brain Res*. 2004 Sep 17;1021(1):20-31.
- 19 [31] Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and
20 Migration via Interaction with Src Kinase: Implications for astrocyte development, activation,
21 and tumor growth. *J Biol Chem*. 2009 Mar 27;284(13):8797-811.
- 22 [32] Nicola FC, Rodrigues LP, Crestani T, Quintiliano K, Sanches EF, Willborn S, et al. Human
23 dental pulp stem cells transplantation combined with treadmill training in rats after traumatic
24 spinal cord injury. *Braz J Med Biol Res*. Aug 08;49(9):e5319.
- 25 [33] Rodrigues LP, Iglesias D, Nicola FC, Steffens D, Valentim L, Witczak A, et al. Transplantation
26 of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after
27 traumatic spinal cord injury in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res*. Jan;45(1):49-57.
- 28 [34] Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, et al.
29 Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its
30 phosphorylation state. *J Neurosci Methods*. 2007 May 15;162(1-2):282-6.
- 31 [35] de Mello AS, da Silva IR, Reinaldo GP, Dorneles GP, Ce J, Lago PD, et al. The modulation of
32 inflammatory parameters, Brain-derived neurotrophic factor levels and global histone H4
33 acetylation status in peripheral blood of patients with Gaucher disease type 1. *Clin Biochem*.
34 Nov 16.
- 35 [36] Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, et al. A simple,
36 sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement
37 of this glial protein. *J Neurosci Methods*. 2008 Mar 30;169(1):93-9.
- 38 [37] Chu W, Yuan J, Huang L, Xiang X, Zhu H, Chen F, et al. Valproic Acid Arrests Proliferation
39 but Promotes Neuronal Differentiation of Adult Spinal NSPCs from SCI Rats. *Neurochem Res*.
40 Jul;40(7):1472-86.
- 41 [38] Kim JH, Kim SH, Cho SR, Lee JY, Baek A, Jung HS. The Modulation of Neurotrophin and
42 Epigenetic Regulators: Implication for Astrocyte Proliferation and Neuronal Cell Apoptosis
43 After Spinal Cord Injury. *Ann Rehabil Med*. Aug;40(4):559-67.
- 44 [39] Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, et al. Neuronal and glial apoptosis
45 after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*. 1997 Jul 15;17(14):5395-406.
- 46 [40] Lv L, Sun Y, Han X, Xu CC, Tang YP, Dong Q. Valproic acid improves outcome after rodent
47 spinal cord injury: potential roles of histone deacetylase inhibition. *Brain Res*. Jun 17;1396:60-
48 8.
- 49 [41] Chadi G, Andrade MS, Leme RJ, Gomide VC. Experimental models of partial lesion of rat
50 spinal cord to investigate neurodegeneration, glial activation, and behavior impairments. *Int J*
51 *Neurosci*. 2001;111(3-4):137-65.
- 52 [42] Kurdistan SK, Tavazoie S, Grunstein M. Mapping global histone acetylation patterns to
53 gene expression. *Cell*. 2004 Jun 11;117(6):721-33.
- 54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [43] Gaub P, Joshi Y, Wuttke A, Naumann U, Schnichels S, Heiduschka P, et al. The histone
4 acetyltransferase p300 promotes intrinsic axonal regeneration. *Brain*. Jul;134(Pt 7):2134-48.
5 [44] Pelzel HR, Schlamp CL, Nickells RW. Histone H4 deacetylation plays a critical role in early
6 gene silencing during neuronal apoptosis. *BMC Neurosci*. May 26;11:62.
7 [45] Majumder A, Dhara SK, Swetenburg R, Mithani M, Cao K, Medrzycki M, et al. Inhibition of
8 DNA methyltransferases and histone deacetylases induces astrocytic differentiation of neural
9 progenitors. *Stem Cell Res*. Jul;11(1):574-86.
10 [46] Hamby ME, Sofroniew MV. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders.
11 *Neurotherapeutics*. Oct;7(4):494-506.
12 [47] Sardi SP, Murtie J, Koirala S, Patten BA, Corfas G. Presenilin-dependent ErbB4 nuclear
13 signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell*. 2006 Oct
14 06;127(1):185-97.
15 [48] Lovatel GA, Elsner VR, Bertoldi K, Vanzella C, Moyses Fdos S, Vizuete A, et al. Treadmill
16 exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic
17 processes in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*. Mar;101:94-102.
18 [49] Spindler C, Cechinel LR, Basso C, Moyses F, Bertoldi K, Roesler R, et al. Treadmill exercise
19 alters histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in frontal cortices from
20 wistar rats. *Cell Mol Neurobiol*. Nov;34(8):1097-101.
21 [50] Benoit JD, Rakic P, Frick KM. Prenatal stress induces spatial memory deficits and
22 epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced
23 gene expression. *Behav Brain Res*. Mar 15;281:1-8.
24 [51] Viola GG, Loss CM. Letter to Editor about: "Physical exercise increases GFAP expression
25 and induces morphological changes in hippocampal astrocytes". *Brain Struct Funct*.
26 Jul;219(4):1509-10.
27 [52] Dagnas M, Mons N. Region- and age-specific patterns of histone acetylation related to
28 spatial and cued learning in the water maze. *Hippocampus*. Jul;23(7):581-91.
29 [53] Chuang DM, Leng Y, Marinova Z, Kim HJ, Chiu CT. Multiple roles of HDAC inhibition in
30 neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci*. 2009 Nov;32(11):591-601.
31 [54] Faraco G, Pancani T, Formentini L, Mascagni P, Fossati G, Leoni F, et al. Pharmacological
32 inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene
33 expression and reduces ischemic injury in the mouse brain. *Mol Pharmacol*. 2006
34 Dec;70(6):1876-84.
35 [55] Faraco G, Pittelli M, Cavone L, Fossati S, Porcu M, Mascagni P, et al. Histone deacetylase
36 (HDAC) inhibitors reduce the glial inflammatory response in vitro and in vivo. *Neurobiol Dis*.
37 2009 Nov;36(2):269-79.
38
39
40
41
42
43

Figure legends:

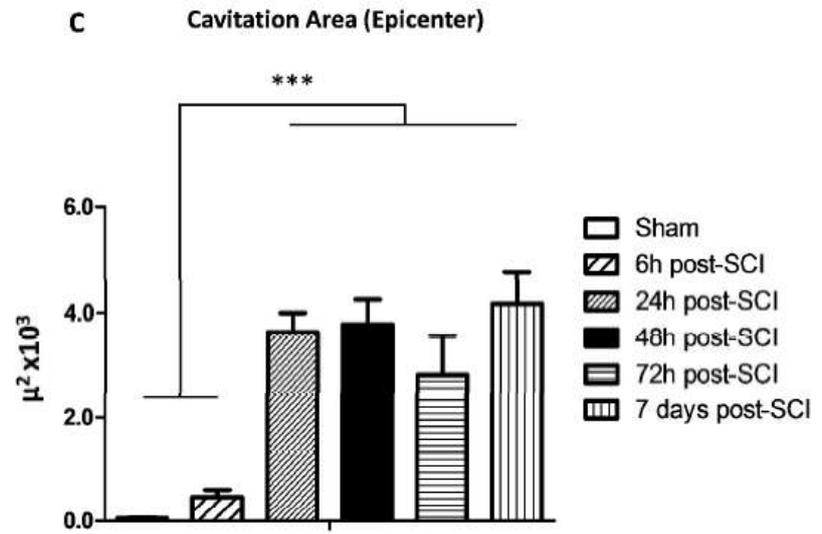
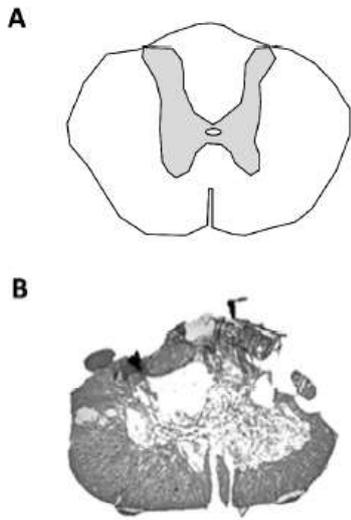
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Figure 1. A: Schematic illustration of a normal spinal cord transversal section in rats at
T10 level; B: Histological image showing a spinal cord injury at T10 level; C:
Cavitation area in the lesion epicenter. *** Significant difference at $P < 0.001$.

Figure 2. A: Global histone H4 acetylation; B: Glial fibrillary acid protein (GFAP); and
C: S100 calcium-binding protein B (S100B) levels at studied time-points. Significant
difference at $*P \leq 0.05$ and $***P \leq 0.001$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

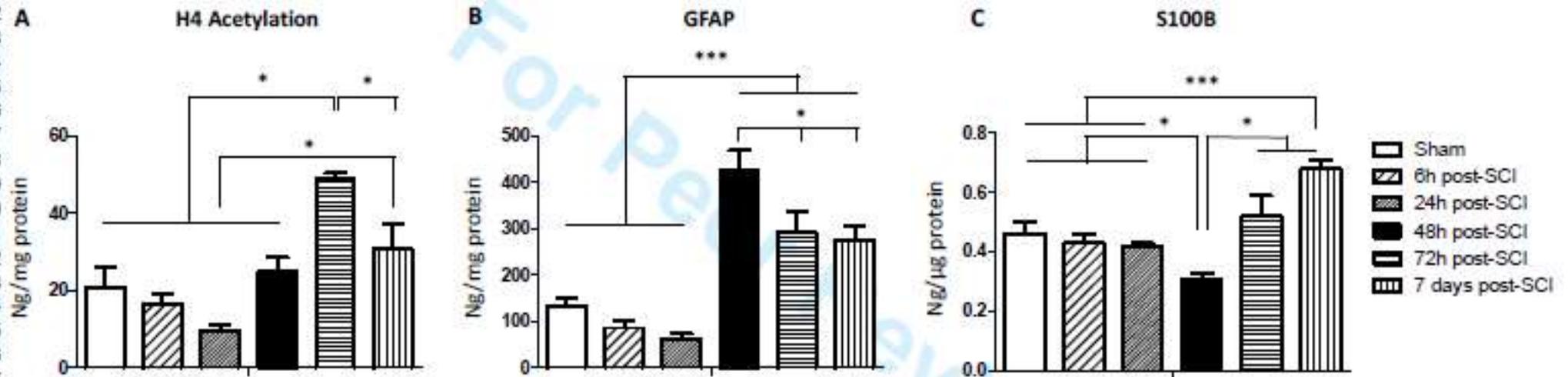


Table 1. Relationship between global H4 acetylation versus GFAP and S100B protein levels. H4: histone 4; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; S100B: S100 calcium-binding protein B; *r*: *Pearson's* coefficient value; *P*: calculated probability; *Statistically significant difference.

Global H4 acetylation levels / Group	GFAP levels	S100B levels
Sham	$r = 0.77$ ($P=0.02$)*	$r = -0.52$ ($P=0.18$)
6h post-SCI	$r = -0.15$ ($P=0.74$)	$r = -0.35$ ($P=0.44$)
24h post-SCI	$r = 0.10$ ($P=0.86$)	$r = 0.28$ ($P=0.95$)
48h post-SCI	$r = -0.39$ ($P=0.93$)	$r = -0.09$ ($P=0.93$)
72h post-SCI	$r = -0.54$ ($P=0.16$)	$r = -0.14$ ($P=0.72$)
7 days post-SCI	$r = 0.10$ ($P=0.84$)	$r = -0.27$ ($P=0.10$)
Pooled groups	$r = 0.44$ ($P=0.003$)*	$r = 0.20$ ($P=0.19$)
Pooled SCI groups	$r = 0.41$ ($P=0.01$)*	$r = 0.31$ ($P=0.07$)

Table 2. Linear regressions exhibiting prediction rates of global H4 acetylation on GFAP levels at T10 level of spinal cord. H4: histone protein 4; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; SCI: spinal cord injury; P: calculated probability; Undamaged group: data from sham group; Pooled groups: data from sham, 6h, 24h, 48h, 72h and 7 days post-SCI combined groups; Pooled SCI groups: data from 6h, 24h, 48h, 72h and 7 days post-SCI combined groups. *Statistically significant difference.

Global H4 acetylation levels	GFAP levels	P value
Undamaged group	$R^2 = 0.598$	$P = 0.02^*$
<i>Pooled groups (SCI and undamaged)</i>	$R^2 = 0.194$	$P = 0.003^*$
<i>Pooled SCI groups</i>	$R^2 = 0.172$	$P = 0.007^*$

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que, na lesão medular, a resposta inflamatória e astrogliosa é ativada para conter o dano e preservar o tecido. Entretanto, a progressão desses eventos excede a capacidade do sistema, culminando com a expansão da lesão e a inibição da regeneração espontânea do tecido. Desse modo, a falha da regeneração axonal e no *sprouting* neuronal é atribuída à formação da cicatriz glial e da cavidade cística, o que constitui uma barreira física e molecular para o crescimento axonal e um ambiente tóxico para as células remanescentes^{22; 23; 40}.

Na última década tem surgido um número significativo de evidências científicas que sugerem o papel da epigenética nas disfunções, lesões e doenças que acometem o SNC^{60; 65}, tais como a lesão medular^{1; 11; 66; 69}. Acredita-se que, embora as células neuronais e gliais sofram mudanças de transcrição após a maturação do SNC e por isso haja uma diminuição da plasticidade^{71; 75}, que modificações epigenéticas poderiam reverter esse declínio, por meio da regulação da expressão de genes disfuncionados pela lesão^{66; 69}. Estudos mostram que enzimas modificadoras de histonas influenciam na resposta pró-inflamatória e imunológica, contribuindo com a diminuição dos efeitos prolongados da astrogliose reativa^{1; 66; 69} e consequentemente, modulando a severidade da lesão e o crescimento axonal espontâneo.

Neste contexto, sabe-se que as enzimas modificadoras e as histonas, em especial a H4, apresentam um papel importante na sinaptogênese, plasticidade sináptica, formação de memória, aprendizado e reversão dos efeitos do envelhecimento^{65; 67; 71}. No entanto, o perfil de acetilação das histonas não é bem compreendido nas lesões medulares espinhais contusas, especialmente durante a primeira semana. Portanto, o nosso principal objetivo foi avaliar uma possível relação entre os níveis globais de acetilação de H4 e de proteínas marcadoras de astrogliose reativa, a GFAP e a S100B.

Nossos resultados demonstram que a lesão medular contusa pode alterar o valor preditivo da acetilação global da histona H4 para detectar os níveis de proteínas associadas à astrogliose relativa. Além disso, é importante ressaltar que o status de acetilação de histona H4 é modificado pela lesão da medula espinhal e que essa modificação é lesão-dependente, quando nos referimos à GFAP. Demonstramos que, em situações de normalidade (ausência de lesão) 59,8% dos níveis de GFAP no tecido nervoso da medula espinhal torácica podem ser matematicamente explicados pelos níveis

de acetilação da histona H4, ou seja, a segunda possui um bom valor preditivo sobre os níveis da primeira na regressão linear. No entanto e, de modo interessante, na presença de lesão medular, apenas 17,2% dos níveis de GFAP neste mesmo tecido podem ser explicados pela regressão linear. Logo, a situação de lesão medular passa a ser uma espécie de “divisor de águas” para tal relação. Sendo assim, é muito provável que outros fatores passem a preponderar sobre a determinação dos níveis de GFAP em situação de lesão medular, fato que contribui para a discussão da importância dos níveis globais de acetilação da histona H4 em situações de saúde e doença.

Resumidamente, os nossos achados sugerem que a acetilação global da histona H4 possui valor preditivo para os níveis da GFAP, porém, tal valor é reduzido sobremaneira após a lesão medular.

Contrariando nossas expectativas iniciais, a acetilação global da histona H4 não apresentou nenhuma correlação com os níveis da proteína S100B, o que sugere que ambas as proteínas, apesar de envolvidas no processo de astrogliose reativa, possuem mecanismos reguladores independentes, tanto em condições de normalidade quanto após a lesão medular. Por exemplo, observamos que os níveis da proteína S100B na medula espinhal torácica parece não sofrer ou produzir influências estatisticamente detectáveis sobre os níveis globais de acetilação da histona H4. Uma possível explicação parcial para esta independência pode ser extraída da literatura. Por exemplo, sabe-se que a proteína S100B está relacionada com a progressão e regulação dos mecanismos adjacentes à isquemia e a instalação da cicatriz glial. Já a GFAP, por sua vez, parece estar mais presente na formação da cicatriz glial propriamente dita, contribuindo estruturalmente para a modificação do citoesqueleto astrocitário.⁴⁴ A GFAP tem papel de suporte mecânico no astrócito e, portanto, é responsável pelo aumento em comprimento e diâmetro dos processos astrocitários que se fazem necessários à proliferação e hipertrofia celular que são observados na astrogliose reativa^{43; 44}.

Outro objetivo do nosso estudo foi descrever a dinâmica temporal da acetilação de H4 durante a primeira semana pós-lesão. Encontramos um pico de acetilação 72h pós-lesão. Em discordância com o nosso resultado, Finelli⁶⁹ não observou aumento nos níveis de acetilação da histona H4 após um modelo de lesão medular. Nós hipotetizamos que três principais diferenças no protocolo experimental podem contribuir para tal controvérsia: 1) espécie animal empregada; 2) idade do animal; 3) modelo de lesão medular.

Primeiro, Finelli e colegas avaliaram camundongos, o que não permite uma extrapolação direta de dados astrocitários para o nosso estudo, em que ratos foram avaliados. Segundo, as idades dos animais, camundongos e ratos, diferiram entre os estudos. Tal diferença foi de seis a oito meses e três meses de idade, respectivamente. Em concordância, alguns estudos sugerem que a idade pode ser um fator que influencia sobre a função da maquinaria epigenética ^{76; 77; 78; 79}.

Do mesmo modo, acredita-se que o avanço da idade possa influenciar o *sprouting* neuronal, a neurogênese e a angiogênese e que os animais idosos apresentem uma desregulação no controle da expressão gênica e, portanto, exibam padrões genéticos mais globais e menos específicos as variações de ambiente e resposta à lesão ⁷⁹. Estudos mostraram que a modulação epigenética está associada a desregulação idade-dependente da expressão gênica e que a hipoacetilação está correlacionada ao comprometimento da memória relacionado com a idade em roedores ^{80; 81}.

Em terceiro lugar, destacamos que o perfil histológico pode variar quando comparamos diferentes modelos de lesão medular e, como consequência, podemos ter alterações na expressão gênica tissular. Corroborando com a nossa hipótese, alguns estudos demonstram que o modelo de transecção está relacionado principalmente à disfunção glial e mínima formação de cavidade cística. Por outro lado, as lesões contusas estão mais associadas à presença de hemorragia, necrose e formação de cavidades císticas maiores ¹². Um aspecto importante é que o nosso protocolo se assemelha ao modelo de lesão medular mais comum em seres humanos, a lesão medular contusa.

Além disso, Finelli ⁶⁹ descreveu que a acetilação da histona H4 foi encontrada principalmente em neurônios ao invés de células da glia, o que revela um perfil célula-específico. No entanto, o nosso estudo avaliou o tecido perilesional como um todo, por meio da técnica de ELISA, o que pressupõe uma medida referente a resposta “média” dos diferentes subtipos celulares presentes no tecido.

Em seu estudo, Lv ⁸² descreveu uma diminuição de acetilação de H4 no terceiro dia pós-lesão medular contusa, em camundongos fêmeas. Nós hipotetizamos que a espécie do animal e a idade, como discutido previamente, podem ser razões para tal discordância.

De modo conjunto, estes achados sugerem que a modulação da acetilação de histonas, em especial a histona H4, pode ser um potencial biomarcador de plasticidade

após lesão da medula espinhal, independentemente do modelo experimental, da espécie, idade e gênero do animal empregado.

Algumas limitações importantes são evidentes no presente estudo. Por exemplo, nós não estudamos diversos outros marcadores epigenéticos que podem estar envolvidos na modulação dos níveis das proteínas GFAP e S100B, tais como a acetilação da histona H3, a metilação de DNA, a acetilação de sítios específicos, dentre outros. Outra limitação é que a influência dos níveis de acetilação da histona H4 sobre a expressão específica dos genes *gfap* e *s100b*, que codifica as respectivas proteínas, não pode ser avaliada, o que é tema para estudos futuros.

Em suma, acreditamos que o presente estudo contribui, em parte, para uma melhor compreensão dos mecanismos epigenéticos que modulam a reatividade astrogliar pós-lesão medular.

6. CONCLUSÕES

- O modelo de lesão empregado foi capaz de produzir, experimentalmente, uma lesão medular torácica contusa.

- O status de acetilação da histona H4 é modificado após uma lesão medular contusa experimental, em ratos Wistar machos, adultos.

- Os níveis globais de acetilação da histona H4 são tempo-dependentes, na primeira semana, após uma lesão torácica contusa da medula espinal em ratos Wistar machos, adultos.

- Embora os níveis globais de acetilação da histona H4 possuam bom valor preditivo para explicar os níveis de GFAP no tecido neural da medula espinal torácica, tal valor preditivo é deveras prejudicado quando da presença de lesão medular contusa.

- O status de acetilação de histona H4 global não possui influência sobre os níveis da proteína S100B no tecido medular espinal, em nível torácico, seja lesado ou não lesado.

7. PERSPECTIVAS

Conjuntamente, nossos achados permitem elencar uma série de perspectivas. Segue, assim, algumas ideias a seguir na continuidade deste estudo:

- Verificar se a acetilação global da histona H3 apresenta relação com os níveis e a expressão de proteínas relacionadas com o processo de astrogliose reativa, utilizando este mesmo modelo de neurotrauma;

- Verificar se os níveis de metilação de DNA possuem relação com a expressão de proteínas relacionadas com o processo de astrogliose reativa, utilizando este mesmo modelo de neurotrauma;

- Avaliar se modificações na acetilação de sítios-específicos de histonas poderiam acarretar em mudanças na expressão de proteínas relacionadas com o processo de astrogliose reativa, utilizando este mesmo modelo de neurotrauma;

- Avaliar se outros modelos de lesão medular, ou de neurotrauma, podem acarretar em mudanças no perfil temporal dos níveis de acetilação global de histona H4;

- Avaliar a expressão a acetilação dos genes específicos, relacionados à expressão das proteínas GFAP e S100B.

- Pesquisar os efeitos de intervenções farmacológicas e não farmacológicas sobre variáveis epigenéticas e a progressão da astrogliose reativa pós-lesão medular;

- Verificar se realmente existem diferenças epigenéticas relacionadas à espécie, sexo e idade de animais rotineiramente utilizados como modelo de lesão medular;

- Avaliar o status de acetilação de diferentes histonas, em diferentes tipos celulares, após um modelo de lesão medular contusa.

REFERÊNCIAS

- 1 SILVA, N. A. et al. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. **Prog Neurobiol**, v. 114, p. 25-57, Mar 2014. ISSN 0301-0082.
- 2 BURNS, S. et al. International standards for neurological classification of spinal cord injury, revised 2011. **Top Spinal Cord Inj Rehabil**, v. 18, n. 1, p. 85-99, 2012. ISSN 1082-0744. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460761> >.
- 3 GORGEY, A. S. et al. Effects of spinal cord injury on body composition and metabolic profile - part I. **J Spinal Cord Med**, v. 37, n. 6, p. 693-702, Nov 2014. ISSN 1079-0268 (Print) 1079-0268.
- 4 WRATHALL, J. R.; LI, W.; HUDSON, L. D. Myelin gene expression after experimental contusive spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 18, n. 21, p. 8780-93, Nov 1998. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786985> >.
- 5 OYINBO, C. A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 71, n. 2, p. 281-99, 2011. ISSN 0065-1400.
- 6 HAGEN, E. M. Acute complications of spinal cord injuries. **World J Orthop**, v. 6, n. 1, p. 17-23, Jan 18 2015. ISSN 2218-5836.
- 7 BICKENBACH, J. et al. **International Perspectives on Spinal Cord Injury**. ORGANIZATION., W. H.: WHO Library Cataloguing-in-publication Data 2013.
- 8 LEAL-FILHO, M. B. et al. Spinal cord injury: epidemiological study of 386 cases with emphasis on those patients admitted more than four hours after the trauma. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 66, n. 2b, p. 365-8, Jun 2008. ISSN 0004-282X (Print) 0004-282x.
- 9 SHIN, J. C. et al. Epidemiologic change of patients with spinal cord injury. **Ann Rehabil Med**, v. 37, n. 1, p. 50-6, Feb 2013. ISSN 2234-0645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525183> >.
- 10 FLEMING, J. C. et al. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. **Brain**, v. 129, n. Pt 12, p. 3249-69, Dec 2006. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071951> >.
- 11 YORK, E. M.; PETIT, A.; ROSKAMS, A. J. Epigenetics of neural repair following spinal cord injury. **Neurotherapeutics**, v. 10, n. 4, p. 757-70, Oct 2013. ISSN 1878-7479.

- 12 NOREMBERG, M. D.; SMITH, J.; MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **J Neurotrauma**, v. 21, n. 4, p. 429-40, Apr 2004. ISSN 0897-7151 (Print) 0897-7151.
- 13 PROFYRIS, C. et al. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiol Dis**, v. 15, n. 3, p. 415-36, Apr 2004. ISSN 0969-9961 (Print) 0969-9961.
- 14 OLIVERI, R. S.; BELLO, S.; BIERING-SØRENSEN, F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models. **Neurobiol Dis**, v. 62, p. 338-53, Feb 2014. ISSN 1095-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24148857> >.
- 15 BARATZ, R. et al. Tumor necrosis factor-alpha synthesis inhibitor, 3,6'-dithiothalidomide, reverses behavioral impairments induced by minimal traumatic brain injury in mice. **J Neurochem**, v. 118, n. 6, p. 1032-42, Sep 2011. ISSN 0022-3042.
- 16 MCDONALD, J. W.; HOWARD, M. J. Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. **Prog Brain Res**, v. 137, p. 299-309, 2002. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12449097> >.
- 17 BUSCH, S. A.; SILVER, J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. **Curr Opin Neurobiol**, v. 17, n. 1, p. 120-7, Feb 2007. ISSN 0959-4388. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223033> >.
- 18 OBERMAIR, F. J.; SCHRÖTER, A.; THALLMAIR, M. Endogenous neural progenitor cells as therapeutic target after spinal cord injury. **Physiology (Bethesda)**, v. 23, p. 296-304, Oct 2008. ISSN 1548-9213. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927205> >.
- 19 BURDA, J. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. **Neuron**, v. 81, n. 2, p. 229-48, Jan 22 2014. ISSN 0896-6273.
- 20 KARIMI-ABDOLREZAEI, S.; BILLAKANTI, R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury-beneficial and detrimental effects. **Mol Neurobiol**, v. 46, n. 2, p. 251-64, Oct 2012. ISSN 0893-7648.
- 21 ZAMANIAN, J. L. et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. **J Neurosci**, v. 32, n. 18, p. 6391-410, May 2012. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553043> >.
- 22 PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neurosci Lett**, v. 565, p. 30-8, Apr 2014. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406153> >.

- 23 PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. **Physiol Rev**, v. 94, n. 4, p. 1077-98, Oct 2014. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287860> >.
- 24 PINEAU, I. et al. Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 4, p. 540-53, May 2010. ISSN 1090-2139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932745> >.
- 25 TRIVEDI, A.; OLIVAS, A. D.; NOBLE-HAEUSSLEIN, L. J. Inflammation and Spinal Cord Injury: Infiltrating Leukocytes as Determinants of Injury and Repair Processes. **Clin Neurosci Res**, v. 6, n. 5, p. 283-292, Dec 2006. ISSN 1566-2772. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059979> >.
- 26 HAUSMANN, O. N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 41, n. 7, p. 369-78, Jul 2003. ISSN 1362-4393. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12815368> >.
- 27 LOANE, D. J.; BYRNES, K. R. Role of microglia in neurotrauma. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 366-77, Oct 2010. ISSN 1878-7479. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880501> >.
- 28 SMITH, J. A. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. **Brain Res Bull**, v. 87, n. 1, p. 10-20, Jan 2012. ISSN 1873-2747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024597> >.
- 29 HAMBY, M. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 494-506, Oct 2010. ISSN 1878-7479.
- 30 YANG, L. et al. Severity-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat. **J Clin Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 276-84, Apr 2005. ISSN 0967-5868 (Print) 0967-5868.
- 31 BETHEA, J. R. Spinal cord injury-induced inflammation: a dual-edged sword. **Prog Brain Res**, v. 128, p. 33-42, 2000. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105667> >.
- 32 VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. **Prog Neurobiol**, v. 64, n. 4, p. 327-63, Jul 2001. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11275357> >.

- 33 HURLEY, S. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Cyclooxygenase inhibition as a strategy to ameliorate brain injury. **J Neurotrauma**, v. 19, n. 1, p. 1-15, Jan 2002. ISSN 0897-7151. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11852973> >.
- 34 ADACHI, K. et al. Localization of cyclooxygenase-2 induced following traumatic spinal cord injury. **Neurosci Res**, v. 51, n. 1, p. 73-80, Jan 2005. ISSN 0168-0102. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596243> >.
- 35 SCHWAB, J. M. et al. Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. **J Neuroimmunol**, v. 111, n. 1-2, p. 122-30, Nov 2000. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063829> >.
- 36 VIDAL, P. M. et al. Late blocking of peripheral TNF- α is ineffective after spinal cord injury in mice. **Immunobiology**, v. 218, n. 2, p. 281-4, Feb 2013. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749984> >.
- 37 KIM, G. M. et al. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 21, n. 17, p. 6617-25, Sep 2001. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517251> >.
- 38 VIDAL, P. M. et al. The role of "anti-inflammatory" cytokines in axon regeneration. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 24, n. 1, p. 1-12, Feb 2013. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985997> >.
- 39 TSUTSUI, S.; STYS, P. K. Metabolic injury to axons and myelin. **Exp Neurol**, v. 246, p. 26-34, Aug 2013. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569104> >.
- 40 SOFRONIEW, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Nat Rev Neurosci**, v. 16, n. 5, p. 249-63, May 2015. ISSN 1471-003x.
- 41 LIBERTO, C. M. et al. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. **J Neurochem**, v. 89, n. 5, p. 1092-100, Jun 2004. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042.
- 42 VERKHRATSKY, A.; RODRIGUEZ, J. J.; PARPURA, V. Astroglia in neurological diseases. **Future Neurol**, v. 8, n. 2, p. 149-158, Mar 1 2013. ISSN 1479-6708 (Print) 1479-6708.
- 43 YANG, Z.; WANG, K. K. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. **Trends Neurosci**, v. 38, n. 6, p. 364-74, Jun 2015. ISSN 1878-108X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25975510> >.

- 44 YASUDA, Y. et al. Relationship between S100beta and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia. **Brain Res**, v. 1021, n. 1, p. 20-31, Sep 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328028> >.
- 45 TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **J Neurosci Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 282-6, May 15 2007. ISSN 0165-0270 (Print) 0165-0270.
- 46 DONATO, R. et al. Functions of S100 proteins. **Curr Mol Med**, v. 13, n. 1, p. 24-57, Jan 2013. ISSN 1875-5666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22834835> >.
- 47 HERMANN, A. et al. S100 calcium binding proteins and ion channels. **Front Pharmacol**, v. 3, p. 67, 2012. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22539925> >.
- 48 BROZZI, F. et al. S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. **J Biol Chem**, v. 284, n. 13, p. 8797-811, Mar 27 2009. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.
- 49 BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396-8, May 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522671> >.
- 50 BENDER, J. DNA methylation and epigenetics. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55, p. 41-68, 2004. ISSN 1543-5008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725056> >.
- 51 FENG, J.; NESTLER, E. J. Epigenetic mechanisms of drug addiction. **Curr Opin Neurobiol**, v. 23, n. 4, p. 521-8, Aug 2013. ISSN 1873-6882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23374537> >.
- 52 KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, Feb 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320507> >.
- 53 STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41-5, Jan 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638745> >.
- 54 GRÄFF, J.; MANSUY, I. M. Epigenetic codes in cognition and behaviour. **Behav Brain Res**, v. 192, n. 1, p. 70-87, Sep 2008. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353453> >.

- 55 ARROWSMITH, C. H. et al. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 5, p. 384-400, Apr 2012. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22498752> >.
- 56 YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 1, p. 37-50, Jan 2006. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16485345> >.
- 57 KIEFER, J. C. Epigenetics in development. **Dev Dyn**, v. 236, n. 4, p. 1144-56, Apr 2007. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304537> >.
- 58 MARX, V. Epigenetics: Reading the second genomic code. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 143-7, Nov 1 2012. ISSN 0028-0836.
- 59 HERMAN, D. et al. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. **Nat Chem Biol**, v. 2, n. 10, p. 551-8, Oct 2006. ISSN 1552-4450 (Print) 1552-4450.
- 60 SAHA, R. N.; PAHAN, K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 4, p. 539-50, Apr 2006. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16167067> >.
- 61 FISCHER, A. et al. Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 12, p. 605-17, Dec 2010. ISSN 1873-3735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980063> >.
- 62 STILLING, R. M.; FISCHER, A. The role of histone acetylation in age-associated memory impairment and Alzheimer's disease. **Neurobiol Learn Mem**, v. 96, n. 1, p. 19-26, Jul 2011. ISSN 1095-9564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21540120> >.
- 63 SADRI-VAKILI, G.; CHA, J. H. Mechanisms of disease: Histone modifications in Huntington's disease. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 2, n. 6, p. 330-8, Jun 2006. ISSN 1745-834X (Print) 1745-834x.
- 64 SADRI-VAKILI, G. et al. Histones associated with downregulated genes are hypoacetylated in Huntington's disease models. **Hum Mol Genet**, v. 16, n. 11, p. 1293-306, Jun 2007. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409194> >.
- 65 GUAN, J. S. et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. **Nature**, v. 459, n. 7243, p. 55-60, May 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19424149> >.

- 66 WONG, J. K.; ZOU, H. Reshaping the chromatin landscape after spinal cord injury. **Front Biol (Beijing)**, v. 9, n. 5, p. 356-366, Oct 2014. ISSN 1674-7984 (Print).
- 67 CHUANG, D. M. et al. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 11, p. 591-601, Nov 2009. ISSN 0166-2236.
- 68 ZHANG, B. et al. HDAC inhibitor increases histone H3 acetylation and reduces microglia inflammatory response following traumatic brain injury in rats. **Brain Res**, v. 1226, p. 181-91, Aug 21 2008. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993.
- 69 FINELLI, M. J.; WONG, J. K.; ZOU, H. Epigenetic regulation of sensory axon regeneration after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 33, n. 50, p. 19664-76, Dec 11 2013. ISSN 0270-6474.
- 70 TAYLOR, C. L.; LATIMER, M. P.; WINN, P. Impaired delayed spatial win-shift behaviour on the eight arm radial maze following excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex in the rat. **Behav Brain Res**, v. 147, n. 1-2, p. 107-14, Dec 17 2003. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328.
- 71 FISCHER, A. et al. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. **Nature**, v. 447, n. 7141, p. 178-82, May 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468743> >.
- 72 PELEG, S. et al. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 753-6, May 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448184> >.
- 73 GRÄFF, J. et al. Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation. **Nat Commun**, v. 3, p. 991, 2012. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22871810> >.
- 74 FARACO, G. et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors reduce the glial inflammatory response in vitro and in vivo. **Neurobiol Dis**, v. 36, n. 2, p. 269-79, Nov 2009. ISSN 0969-9961.
- 75 TANILA, H. et al. Brain aging: changes in the nature of information coding by the hippocampus. **J Neurosci**, v. 17, n. 13, p. 5155-66, Jul 1 1997. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474.
- 76 DE MEIRELES, L. C. et al. Treadmill exercise induces selective changes in hippocampal histone acetylation during the aging process in rats. **Neurosci Lett**, v. 634, p. 19-24, Nov 2016. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27717826> >.

- 77 DAGNAS, M.; MONS, N. Region- and age-specific patterns of histone acetylation related to spatial and cued learning in the water maze. **Hippocampus**, v. 23, n. 7, p. 581-91, Jul 2013. ISSN 1050-9631.
- 78 LOVATEL, G. A. et al. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. **Neurobiol Learn Mem**, v. 101, p. 94-102, Mar 2013. ISSN 1095-9564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357282> >.
- 79 BENAYOUN, B. A.; POLLINA, E. A.; BRUNET, A. Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 16, n. 10, p. 593-610, Oct 2015. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26373265> >.
- 80 LOVATEL, G. A. et al. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. **Neurobiol Learn Mem**, v. 101, p. 94-102, Mar 2013. ISSN 1074-7427.
- 81 STOUFFER, E. M.; HEISEY, J. L. Latent learning of spatial information is impaired in middle-aged rats. **Dev Psychobiol**, v. 55, n. 3, p. 309-15, Apr 2013. ISSN 0012-1630.
- 82 LV, L. et al. Valproic acid improves outcome after rodent spinal cord injury: potential roles of histone deacetylase inhibition. **Brain Res**, v. 1396, p. 60-8, Jun 17 2011. ISSN 0006-8993.

ANEXO – Aprovação CEUA UFRGS e CEUA PUCRS



U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 26116

Título:

Efeito do Transplante de Células-Tronco Mesenquimais Derivadas de Dente Deciduo Humano Sobre a Neuroproteção, Inflamação e Recuperação Funcional de Ratos Wistar Submetidos à Lesão Medular

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CARLOS ALEXANDRE NETTO - coordenador desde 01/03/2014
PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE - pesquisador desde 01/03/2014
EDUARDO FARIAS SANCHES - pesquisador desde 01/03/2014
Fabrício do Couto Nicola - pesquisador desde 01/03/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 14/07/2014 - Sala 308 - Prédio da Faculdade de Educação - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 184 ratos machos Wistar adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 31 de Julho de 2014

Cristiane Matte

CRISTIANE MATTE

Vice Coordenador da comissão de ética



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 110/2015 - CEUA

Porto Alegre, 18 de dezembro de 2015.

Senhor(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS informa que apreciou o projeto de pesquisa 15/00492, intitulado: **“Efeito do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de dente decíduo humano sobre a neuroproteção, inflamação e recuperação funcional de ratos wistar submetidos à lesão medular”**. Considerando que trata-se de um projeto interinstitucional entre a UFRGS (Departamento de Bioquímica) e a PUCRS (Laboratório Central de Microscopia e Microanálise), e que a parte experimental com o manejo dos animais será realizada integralmente na UFRGS, e também por já possuir aprovação pela CEUA/UFRGS a CEUA/PUCRS informa que não há necessidade de ser avaliado por esta comissão, mas está ciente que o projeto atende às normas de bem estar animal e está em conformidade com a legislação nacional.

Atenciosamente,

Prof. Dr. João-Batista Blessmann Weber

Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Régis Gemerasca Mestriner

FAENFI

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 1 – Térreo
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3513
E-mail: propesq@pucrs.br
Site: www.pucrs.br