

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARTINA BLANK

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA: MODULAÇÃO VIA
INIBIDORES DE HISTONA DESACETILASES**

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARTINA BLANK

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA: MODULAÇÃO VIA
INIBIDORES DE HISTONA DESACETILASES**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

PORTO ALEGRE

2015

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Laboratório de Câncer e Neurobiologia e Unidade de Experimentação Animal. Alguns experimentos foram executados em colaboração com o Laboratório de Neuroquímica III - Transdução de Sinal no SNC na Universidade Federal Santa Catarina sob a supervisão do Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal.

Apoios financeiros: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Projetos 303703/2009-1, 484185/2012-8 e 303276/2013-4), PNPd CAPES/HCPA (projeto 0130110), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Pesquisa Translacional em Medicina (INCT-TM), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA Projetos 120068, 120424 e 13081).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Markus e Veleida, por me darem a oportunidade de me dedicar quase exclusivamente aos estudos e me incentivarem a seguir na pós-graduação permitindo-me uma maior capacitação profissional. Adicionalmente, agradeço a toda minha família por estar sempre ao meu lado independente das minhas escolhas. Muito obrigada pelo carinho, amor e paciência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Roesler, agradeço por ter me aceito como aluna, por toda a sua compreensão e apoio durante os 4 anos do doutorado. Obrigada por acreditar em mim e me permitir realizar mais este objetivo em minha vida com a sua orientação.

Agradeço aos colegas, os que já saíram e os recém-chegados, do Laboratório de Câncer e Neurobiologia pela ajuda nas cirurgias, nos experimentos e pelos momentos de descontração. Um agradecimento especial à Dra. Arethusa da Silva Dornelles indispensável para que este trabalho se concretizasse, obrigada pelo apoio, compreensão e amizade.

Agradeço também ao Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal e seus alunos Mark William Lopes e Tanara Vieira Peres pelo acolhimento em seu laboratório e colaboração nos experimentos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela oportunidade e à secretaria do PPGBCM sempre solícita e amigável. Obrigada aos Professores Dr. Giancarlo Pasquali e Dr. Marino Muxfeldt Bianchin, membros da minha comissão de acompanhamento, por terem aceitado acompanhar as etapas deste trabalho e avaliar meu progresso ao longo dos 4 anos.

Agradeço às agências de fomento pelo auxílio financeiro na execução deste trabalho: CNPq, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Pesquisa Translacional em Medicina (INCT-TM) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de clínicas de Porto Alegre (FIPE).

E, por fim, agradeço ao Alessandro Gabriel Carneiro por estar sempre ao meu lado durante os momentos felizes, tristes e inquietantes desta trajetória. Obrigada por me amar mesmo nos períodos mais difíceis.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

RESUMO

O estado da cromatina influencia diretamente nos processos de expressão gênica desencadeada durante a formação de memórias. Nesse sentido sendo de grande interesse seu estudo na área biomédica. Modificações epigenéticas como a metilação do DNA e modificações pós-traducionais em histonas são reguladores cruciais do estado da cromatina e da transcrição gênica. Uma das modificações pós-traducionais mais bem estudada é a acetilação de histonas. Quando as histonas estão acetiladas a cromatina encontra-se num estado relaxado permitindo a expressão gênica. A reação é catalisada por acetiltransferases de histonas (HATs) e é um processo reversível catalisado por histona desacetilases (HDACs). A utilização de fármacos inibidores de histona desacetilases (HDACis) tem ajudado na elucidação dos mecanismos gênicos envolvidos na formação do aprendizado e da memória. Nosso trabalho se baseia na hipótese de que a atividade de HDACs é crucial para modulação das respostas de aprendizado na tarefa de esQUIVA inibitória e que a acetilação de histonas é um passo essencial neste processo. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a infusão intra-hipocampal de tricostatina A (TSA) ou butirato sódico (NaB) imediatamente após o treino resulta na melhora da memória de longa duração (LTM). TSA demonstrou ainda possuir duas ondas de efeitos melhoradores da LTM, uma imediatamente e outra 3h após o treino que coincidem com as ondas de ativação de vias de sinalização intracelular e de síntese de proteínas importantes para a formação da LTM. Adicionalmente, a inativação farmacológica da amígdala basolateral (BLA) antes do treino bloqueou os efeitos melhoradores do TSA administrado no hipocampo, evidenciando que a integridade da BLA é importante para este processo. Neste trabalho demonstramos também que a administração intraperitoneal de NaB imediatamente após o treino em animais velhos sem prejuízo cognitivo resulta em melhora significativa da memória. O tratamento com NaB não afetou a LTM de animais jovens saudáveis. Por fim, nossos dados demonstram que a administração de um fármaco antagonista de receptores TrkB, ANA-12, no hipocampo de animais jovens após o treino ou teste resulta no prejuízo da memória. No entanto a administração de NaB antes do treino preveniu os efeitos prejudiciais de ANA-12. Em conjunto estes resultados demonstram que a modulação epigenética através da atividade de HDACs é importante para a formação da LTM. Nossos dados fortalecem ainda a visão de que eventos epigenéticos possuem papel crítico no aprendizado e memória interagindo com vias de sinalização intracelulares desencadeadas por estes processos.

Palavras-chave: Epigenética. Acetilação. Desacetilação. Aprendizado. Memória.

ABSTRACT

The chromatin state directly impacts gene expression triggered by memory formation. Therefore, this process is of great interest to the biomedical area. Critical regulators of chromatin state and gene transcription are the epigenetic modifications such as DNA methylation and posttranslational modifications of histone proteins. One of the most studied posttranslational modification of histones is histone acetylation. When histones are acetylated, chromatin is in a relaxed conformation allowing gene expression. Lysine acetylation is catalyzed by histone acetyltransferases (HATs) and is reversed by the action of histone deacetylases (HDACs). The use of histone deacetylase inhibitors (HDACis) is helping to elucidate genetic mechanisms of learning and memory. Our work is based on the hypothesis that HDACs activity is crucial for inhibitory avoidance (IA) learning responses modulation and the idea that histone acetylation is an essential step. The data presented in this work demonstrate that infusion of Trichostatin A (TSA) or Sodium Butyrate (NaB) intrahippocampally produced memory enhancement. Moreover, TSA showed two waves of memory enhancing effects when given immediately or 3 h after training coinciding with the observed waves of protein synthesis and PKA activation for memory formation. Our study also demonstrates that the enhancement of IA memory consolidation depends on the integrity of basolateral amygdala (BLA) since its functional inactivation by muscimol (MUS) completely blocked the enhancing effect of TSA infused in the rat hippocampus. Here, we also demonstrate that intraperitoneal administration of NaB immediately after training led to memory enhancement in aged rats with no cognitive deficit. Surprisingly, NaB had no effect in younger rats with normal memory retention. Finally, data presented here also demonstrate that TrkB activity in the hippocampus is crucial for long-term memory (LTM) since administration of a TrkB receptor antagonist, ANA-12, in the dorsal hippocampus immediately after training or retrieval led to memory retention impairment. Moreover, infusion of NaB before training prevented this impairing effect of TrkB antagonism. Taken together, these results show that epigenetic modulation by HDACs activity is required for memory formation. Our data also supports the idea of HDACs playing critical roles in learning and memory interacting with intracellular signaling pathways triggered by these processes.

Keywords: Epigenetics. Acetylation. Deacetylation. Learning. Memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Características do epigenoma.....	19
Figura 2- Nucleossomo com o cerne de histonas e o DNA.....	20
Figura 3- Classes de reguladores epigenéticos.....	21
Figura 4- Representação esquemática das histonas, seus resíduos e suas modificações epigenéticas.....	22
Figura 5- A regulação dinâmica das modificações de histonas coordenam a atividade transcricional.....	23
Figura 6- Visão esquemática dos processos que são afetados pela acetilação e deacetilação de proteínas.....	26
Figura 7- Transição entre estados de cromatina com transcrição ativa e reprimida dependendo do equilíbrio entre HATs e HDACs.....	27
Figura 8- Localização das diferentes HDACs nas células.....	28
Figura 9- Fases da memória.....	31
Figura 10- Representação esquemática das vias de sinalização ativadas durante a formação da memória.....	33
Figura 11- Esquema mostrando as doenças psiquiátricas e as modificações epigenéticas dos genes chave e sua intervenção por HDACis.....	38
Figura 12- Vias de sinalização intracelulares mediadas por BDNF/TrkB.....	40
Figura 13- Sequência de aminoácidos da cauda N-terminal de H3 com representação dos sítios de clivagem.....	93
Figura 14 - Modelo esquemático dos dados apresentados neste trabalho.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Famílias de HATs, seus membros e as modificações relacionada.....	25
Quadro 2- HDACis e os genes por eles regulados.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC γ	adenilato ciclase
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
C/EBP	proteína ligante ao amplificador CCAAT (<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>)
CaMKII	proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina (<i>calcium-calmodulin-dependent protein kinase II</i>)
CBP	proteína ligante de CREB (<i>CREB binding protein</i>)
cAMP	monofosfato de adenosina cíclica (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CFC	condicionamento aversivo ao contexto (<i>contextual fear conditioning</i>)
CFM	memória de medo contextual (<i>contextual fear memory</i>)
CRE	elemento de resposta a cAMP
CREB	proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP (<i>cAMP response element-binding protein</i>)
DMT	desmetilase de histona (<i>histone demethylase</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNMT	DNA metiltransferase (<i>DNA methyltransferase</i>)
ERK	proteína cinase regulada por sinal extracelular (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
H	histona (<i>histone</i>)
HAT	acetiltransferase de histona (<i>histone acetyltransferase</i>)
HDAC	histona desacetilase (<i>histone deacetylase</i>)
HDACi	inibidor de histona desacetilase (<i>histone deacetylase inhibitor</i>)
HDMT	demetilase de histonas (<i>histone demethylase</i>)

HMT	metiltransferase de histona (<i>histone methyltransferase</i>)
ip, i.p.	intraperitoneal
K	lisina
kDa	quilodalton
LTM	memória de longa duração (<i>long-term memory</i>)
LTP	potenciação de longa duração (<i>long-term potentiation</i>)
MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
Me	metilação (<i>methylation</i>)
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NaB	butirato sódico (<i>sodium butyrate</i>)
NaCl	cloreto de sódio
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada
NMDAr	receptor N-metil-D-aspartato (<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>)
NOR	reconhecimento de objeto novo (<i>novel object recognition</i>)
OLT	tarefa de localização do objeto (<i>object location task</i>)
PI3K	fosfatidilinositol 3-cinase
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
PKG	proteína cinase G
PLC γ	fosfolipase C gamma
PTM	modificação pós-traducional (<i>post translational modification</i>)
R	arginina
RNA	ácido ribonucleico
S	serina
SAHA	ácido suberoilânido hidroxâmico (<i>suberoylanilide hydroxamic acid</i>)
STM	memória de curta duração (<i>short-term memory</i>)

T	treonina
TSA	tricostatina A
Trk	receptores cinase relacionados a tropomiosina (<i>tropomyosin-related kinase receptor</i>)
VPA	ácido valpróico
Y	tirosina
Zn	zinco

LISTA DE SIMBOLOS E UNIDADES

cm	centímetro
g	grama
h	“hours” (horas)
kg	quilograma
μl	microlitro
min	minuto; “minute”
ml	“milliliter” (mililitro)
μm	micromolar
mm	milimolar
nm	nanomolar
s	segundos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Epigenética e epigenoma.....	17
1.2 Cromatina.....	18
1.3 Regulação epigenética.....	21
1.3.1 Metilação do DNA.....	21
1.3.2 Modificações em histonas.....	22
1.4 Metilação de histonas.....	23
1.5 Fosforilação de histonas.....	24
1.6 Acetilação de histonas.....	24
1.7 Histona desacetilases e inibidores de histona desacetilases.....	27
1.8 Aprendizado e memória.....	31
1.9 Formação da LTM via controle da expressão gênica.....	32
1.10 Mecanismos epigenéticos na memória.....	34
1.11 Acetilação de histonas e formação da memória.....	35
1.12 HDACis na plasticidade sináptica e formação da memória.....	36
1.13 HDACis no envelhecimento e neurodegeneração.....	38
1.14 HDACis e a via de neurotrofinas/TrkB.....	39
2 OBJETIVOS.....	42
3 ARTIGOS.....	43
3.1 Artigo de dados - <i>Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus</i>	43
3.2 Artigo de dados - <i>Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats</i>	52
3.3 Artigo de dados - <i>TrkB blockade in the hippocampus after training or retrieval impairs memory: protection from consolidation impairment by histone deacetylase inhibition</i>	59
4 DISCUSSÃO.....	88
5 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS.....	99

ANEXO A – Carta aprovação CEUA Projeto 120068.....	119
ANEXO B - Carta aprovação CEUA Projeto 120424.....	120
ANEXO C - Carta aprovação CEUA Projeto 130381.....	121
APÊNDICE A - <i>Curriculum vitae</i> resumido.....	122

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, pesquisadores têm demonstrado como a cromatina, anteriormente vista na forma de uma estrutura estática cuja função restringia-se à compactação física do material genético, consiste numa estrutura dinâmica influenciando praticamente todos os processos metabólicos relacionados ao DNA como o controle da expressão gênica e sua reparação (HENIKOFF et al., 2008). Hoje sabemos que o padrão de expressão gênica de uma célula é o que a define funcionalmente. E, após o sequenciamento do genoma humano, ficou evidente a existência e a importância dos diferentes níveis de controle da expressão dos genes para se explicar a ampla diversidade de células e proteínas que possuímos apesar de todas conterem o mesmo material genético. A transcrição gênica é regulada por complexos de fatores de transcrição e proteínas que se ligam ao DNA nas regiões promotoras dos genes e são determinantes para o seu controle, ativando ou reprimindo a transcrição. A estes mecanismos atribuiu-se o nome de modificações epigenéticas. As modificações epigenéticas são alterações transientes afetando o estado da cromatina e os processos a ela associados sem alterar a sequência do DNA como, por exemplo, as já bem conhecidas metilação do DNA e as modificações pos-traducionais em histonas (LIYANAGE, 2014; COSMA; TANAKA; NASMYTH, 1999).

Inúmeros estudos, principalmente na última década, têm relacionado os mecanismos moleculares epigenéticos com os processos de formação e manutenção de memórias (LEVENSON; SWEATT, 2006). A regulação da transcrição em resposta ao estímulo é um processo crítico para a estabilização das memórias de longa duração (*Long-term memory*, LTM) sendo este um processo complexo que envolve muitas vias de sinalização e a modulação de inúmeros genes (DUNNING; DURING, 2003; IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Uma das primeiras demonstrações do envolvimento epigenético na formação de memórias ocorreu em 2004 onde a acetilação da histona H3, mas não da histona H4, apresentou-se significativamente aumentada após o aprendizado na tarefa de medo condicionado (LEVENSON et al., 2004). A partir de então, este e outros dados indicam que há marcação epigenética do genoma durante a formação e consolidação da memória sugerindo a ocorrência de um código de modificações de histonas, onde tipos específicos de memórias estão associados com padrões específicos de modificações nas histonas (LEVENSON; SWEATT, 2005).

Hoje já se sabe que mecanismos como acetilação, metilação e fosforilação de histonas participam ativamente na formação e consolidação da LTM (GUPTA et al., 2010; VECSEY et al., 2007; PELEG et al., 2010; CHWANG et al., 2006; TIAN; MARINI; LIPSKY, 2010) e o desenvolvimento de fármacos que atuem sobre estes mecanismos, especialmente facilitando o relaxamento da cromatina

pela inibição de histona desacetilases (HDACs), têm recebido grande atenção devido ao seu potencial terapêutico para o tratamento de disfunções cognitivas associadas a doenças neurológicas e psiquiátricas, bem como câncer, doenças cardíacas, entre outras (MIKAELSSON; MILLER, 2011; FALKENBERG; JOHNSTONE, 2014). Desta forma é grande o interesse em se compreender quais são os efeitos destes fármacos nos processos cognitivos, de aprendizado e consolidação da memória, e na elucidação dos mecanismos que governam as alterações nas vias de sinalização e expressão de proteínas essencialmente envolvidas nestes processos.

1.1 Epigenética e epigenoma

As informações advindas do sequenciamento completo do genoma humano levantaram inúmeras questões sobre como a informação genômica direcionaria e controlaria a expressão de seus genes e resultaria na diversidade celular. O conhecimento da sequência primária do genoma foi apenas o início da busca pelo entendimento de como os genes são expressos, uma vez que todos os tipos de células em um organismo possuem uma cópia idêntica do DNA, porém apresentam padrões de expressão gênica distintos, conferindo às células suas diferentes funcionalidades (RIVERA; REN, 2013; BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007). A compreensão destes mecanismos reguladores da expressão gênica é de extrema importância para se esclarecer as variações fenotípicas de cada indivíduo e do surgimento e evolução de várias doenças. Atualmente, mecanismos epigenéticos estão sendo associados aos eventos que definem o padrão de expressão genica de uma célula conferindo sua especificidade e influenciando a saúde do indivíduo.

A epigenética teve seu nome criado da junção das palavras “epigênese” e “genética” em 1942 por Conrad Waddington, que a definiu como: “interações casuais entre genes e seus produtos os quais resultam no fenótipo” (LIYANAGE et al., 2014). E o epigenoma seria o conjunto único de genes expressos em uma determinada célula e descreve os processos independentes da sequência do DNA que alteram os padrões de expressão gênica (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007). Esta capacidade dos mecanismos epigenéticos de regular a expressão de um gene ou o padrão de expressão de diversos genes sem causar alterações na sequência de DNA e com isso modificar fenotipicamente o indivíduo tem sido considerada o mecanismo central de regulação transcricional. Atualmente o termo “epigenética” recebe uma definição atualizada na qual consiste no estudo das

mudanças fenotípicas, herdáveis ou não, que não envolvem alterações na sequência de DNA (KOUZARIDES, 2007).

1.2 Cromatina

Anteriormente vista como uma estrutura estática cuja função restringia-se à compactação física do material genético, a cromatina se apresenta hoje como uma estrutura dinâmica influenciando praticamente todos os processos metabólicos relacionados ao DNA, como o controle da expressão gênica, reparo do DNA e replicação (HENIKOFF et al., 2008; LI; CAREY; WORKMAN, 2007). O desenvolvimento, destino e função celular dependem do correto equilíbrio entre ativação e repressão gênica na cromatina que são influenciados pelas modificações epigenéticas que ali atuam. Estas modificações são processos dinâmicos compreendendo uma combinação de fatores que induzem a transcrição ou o silenciamento gênico, conforme a Figura 1 (NDLOVU; DENIS; FUKS, 2011).

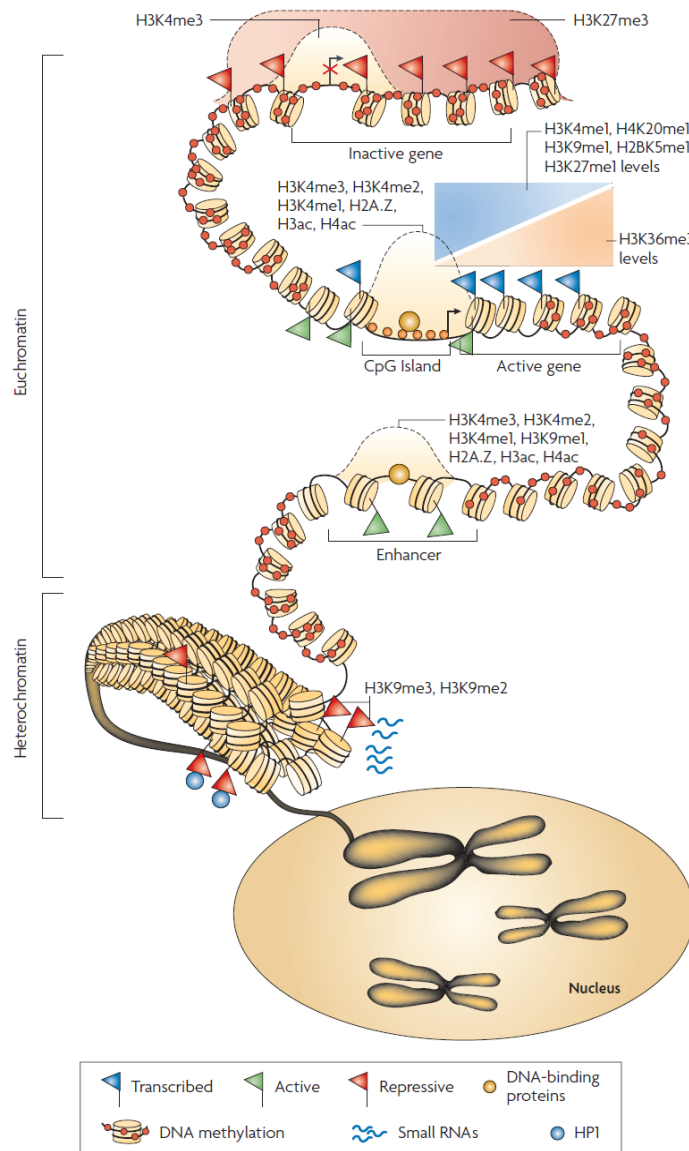


Figura 1 - Características do epigenoma. Interações entre a metilação do DNA, as modificações em histonas e o posicionamento do nucleossomo que contribuem para a dinamicidade da cromatina e a modulação da expressão gênica.

Fonte: SCHONES; ZHAO, 2008, p. 188.

A cromatina é a forma como o DNA se apresenta compactado, sendo sua unidade fundamental o nucleossomo. O nucleossomo é composto por um octâmero de proteínas histonas de subunidades H2A, H2B, H3 e H4 (Figura 2). O cerne de histonas envolve 147 pares de bases em 1,65 voltas e tem sua estrutura regulada de acordo com o estado epigenético da célula. Uma histona adicional, H1, se liga ao complexo estabilizando o nucleossomo (HE; LEHMING, 2003).

As histonas são uma família de proteínas de estrutura globular que se associam ao DNA no núcleo auxiliando na condensação do material genético (KOUZARIDES, 2007). Existem 14 pontos de contato entre o DNA e as histonas (LUGER et al., 1997) ocasionando, dessa forma, com que o

nucleossomo seja um dos complexos DNA-proteína mais estáveis em condições fisiológicas apesar de ser dinamicamente regulado por vários complexos proteicos incluindo o cerne de histonas (LI; CAREY ; WORKMAN, 2007).

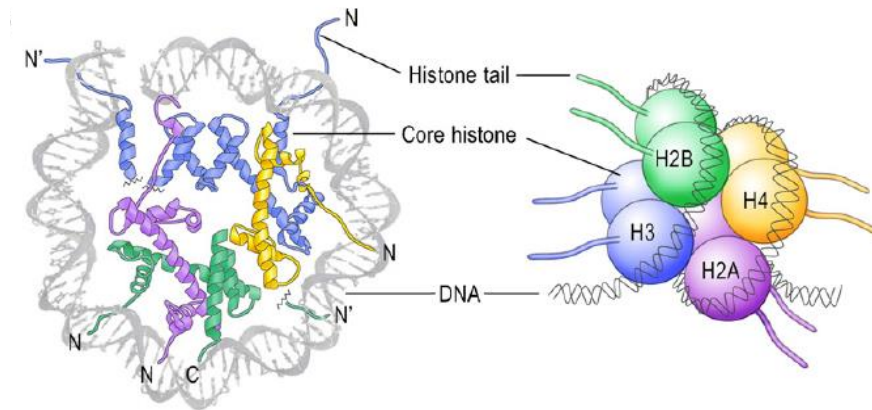


Figura 2 - Nucleossomo com o cerne de histonas e o DNA.

Fonte: Adaptado de GRÄFF; MANSUY, 2008, p. 72.

Dentre os processos epigenéticos que modificam dinamicamente a cromatina podemos citar a metilação de DNA e as modificações covalentes das proteínas histonas como sendo os principais (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007). As modificações epigenéticas dependem de reguladores epigenéticos que se classificam em 3 grupos dependendo da sua função: *writers*, aqueles que adicionam a marca epigenética; *erasers*, aqueles que retiram a marcação epigenética; e *readers*, aqueles que reconhecem as marcações (Figura 3, FALKENBERG ; JOHNSTONE, 2014; BORRELLI et al., 2008).

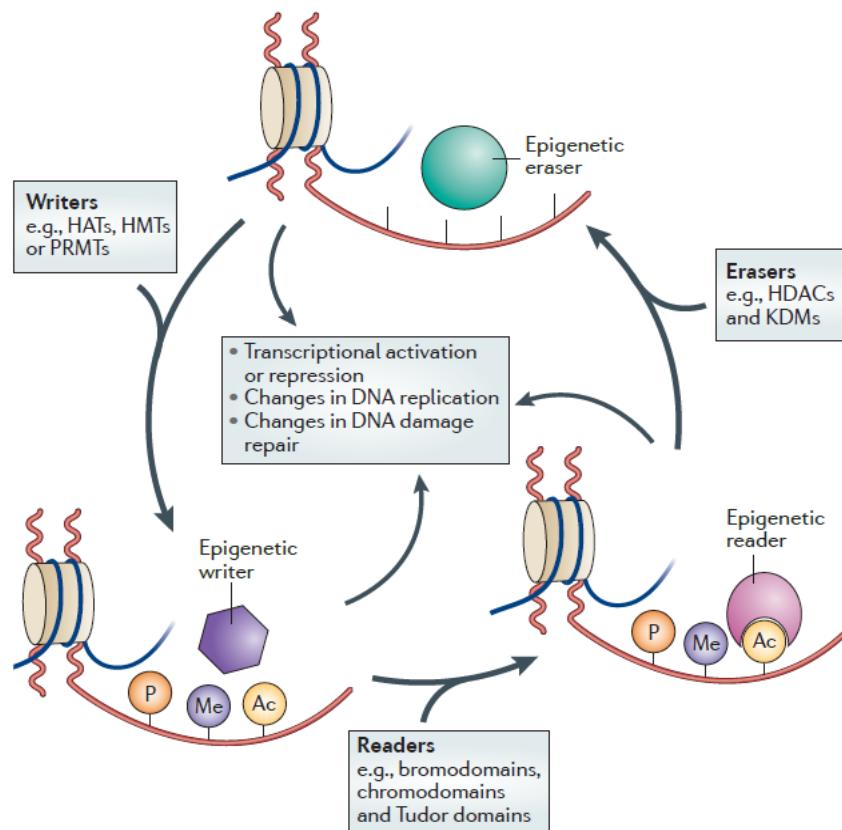


Figura 3 - Classes de reguladores epigenéticos. (1) *Writers*: HATs - Histona acetiltransferases, HMTs - Histona metilases e quinases, atuam modificando seu substrato pela adição de grupos acetila, metila ou fosfato; (2) *Readers*: reconhecem os grupos acetila e metila e recrutam complexos proteicos; (3) *Erasers*: HDACs – Histona desacetilases, DMTs – demetilases, fosfatases, atuam retirando os grupos acetila, metila e fosfato dos substratos.

Fonte: FALKENBERG; JOHNSTONE, 2014, p. 674.

1.3 Regulação epigenética

1.3.1 Metilação do DNA

O primeiro evento epigenético descrito na literatura foi a identificação de metilação no DNA. Ocorrendo em sua grande maioria em dinucleotídeos citosina e guanina (CpG), a metilação do DNA tem recebido destaque por estar envolvida em diversas funções celulares e no desenvolvimento de inúmeras patologias (BIRD, 2002). DNA metiltransferases (DNMTs) catalisam a adição de um grupo metil ao carbono 5 dos resíduos de citosina, impactando a expressão gênica das regiões metiladas (GOLL; BESTOR, 2005). Em vertebrados estima-se que 70 a 80% dos dinucleotídeos CpG no genoma estão metilados, com exceção de regiões chamadas “ilhas CpGs” que possuem em torno de 200pb e

são ricas em guanina e citosina, as quais não apresentam metilação e estão presentes próximas a regiões da cromatina com transcrição gênica ativa (NDLOVU; DENIS; FUKS, 2011). A citosina, quando metilada, promove o recrutamento de proteínas regulatórias da transcrição que inibem a ligação de fatores de transcrição. E, já foi demonstrado que é através da interação da citosina metilada, HMTs e de HDACs que ocorreria a repressão transcricional (BIRD, 2002; FUKS, 2005; BRENNER; FUKS, 2007).

1.3.2 Modificações em histonas

A arquitetura da cromatina e os processos a ela associados sofrem alterações em decorrência das modificações em histonas que estão ocorrendo. As proteínas histonas possuem um grande número de resíduos em sua cauda N-terminal que podem sofrer modificações pos-traducionais (*posttranslational modifications*; PTMS). Mais de 130 PTMs e 700 isoformas de histonas já foram identificadas (TAN et al., 2011; TIAN et al., 2012). Estas modificações compreendem, dentre outras, a metilação em resíduos de arginina (R) e lisina (K), fosforilação em resíduos de serina (S) e treonina (T) e acetilação em resíduos de lisina (K) (Figura 4, LI; CAREY; WORKMAN, 2007).

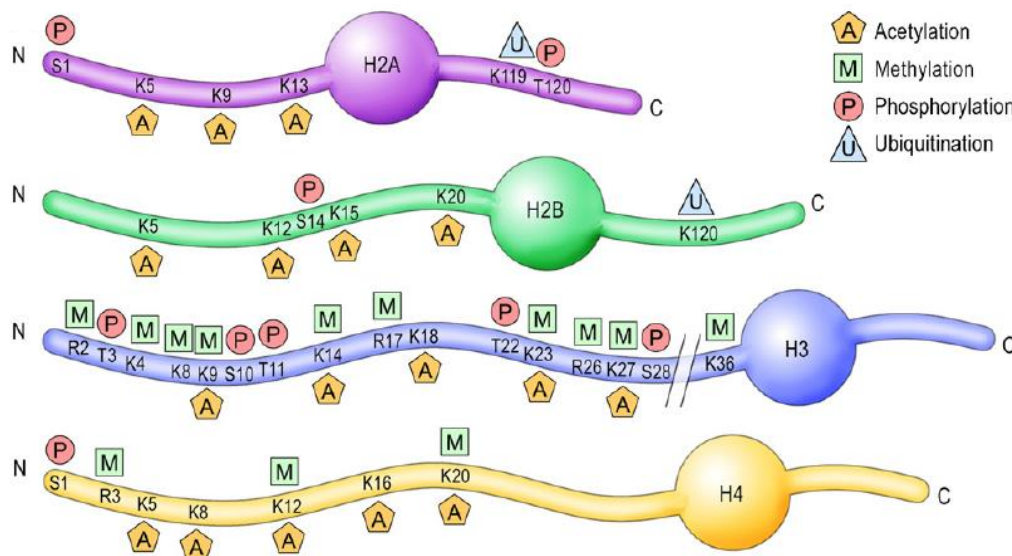


Figura 4 - Representação esquemática das histonas, seus resíduos e suas modificações epigenéticas.

Fonte: Adaptado de GRÄFF; MANSUY, 2008, p. 72.

As modificações em histonas controlam o acesso da maquinaria de transcrição gênica ao DNA, permitindo ou não o relaxamento da cromatina de acordo com os tipos de modificações que estão ocorrendo sozinhas ou em combinação (KOUZARIDES, 2007). Por exemplo, acetilação e fosforilação de histonas modificam a carga das proteínas alterando sua interação eletroestática com o DNA, causando um relaxamento de sua estrutura e facilitando o acesso de fatores de transcrição e da RNA polimerase enquanto que a metilação de histonas atua de forma oposta na maioria das vezes (Figura 5). Desta forma, as modificações de histonas possuem um papel essencial no controle da ativação e repressão gênica sendo de grande importância o conhecimento do padrão e da distribuição destas modificações ao longo do genoma para o entendimento dos processos fisiológicos e patológicos.

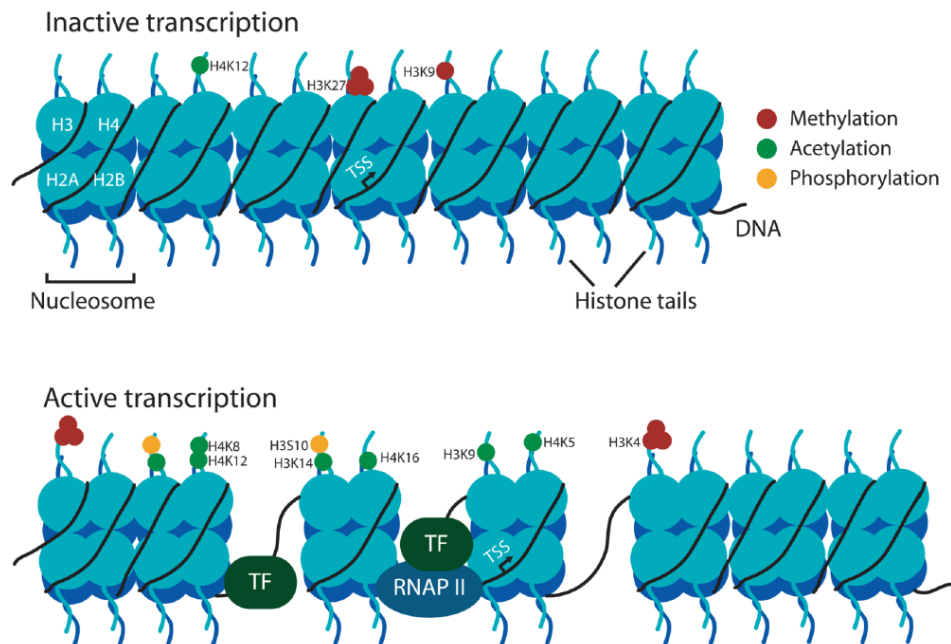


Figura 5 - A regulação dinâmica das modificações de histonas coordena a atividade transcripcional.

Fonte: DAY; SWEATT, 2011, p. 27.

1.4 Metilação de histonas

Resíduos de R e K na cauda amino-terminal das histonas podem sofrer metilação. A metilação não altera a carga da proteína e ainda pode ocorrer em K na forma mono-, di- ou tri-metiladas (LACHNER; JENUWEIN, 2002) e em R na forma mono- e di-metilada (BANNISTER; KOUZARIDES,

2011). As enzimas que catalisam os processos de metilação e desmetilação são denominadas de histonas metiltransferases (HMT) e histonas desmetilases (HDMT), respectivamente. O processo de metilação é dinâmico, podendo resultar na ativação ou repressão da transcrição de acordo com o padrão de modificações contidas nos resíduos. Por exemplo, na histona H3, metilação nos resíduos K9 e K27 está associada com inibição da transcrição, pela maior compactação da cromatina, e a metilação no resíduo K4 está associada com ativação da transcrição, portanto uma cromatina menos compactada (LACHNER; JENUWEIN, 2002).

1.5 Fosforilação de histonas

Atuando sobre a facilitação da expressão gênica está a fosforilação que ocorre em resíduos de S, T ou tirosina (Y) na cauda N-terminal das histonas. Os níveis de fosforilação são controlados por cinases, que adicionam o grupo fosfato a partir do ATP ao grupo hidroxila da cadeia de aminoácidos, e fosfatases que o removem. A adição de grupos fosfato aumenta a carga negativa da histona e influencia diretamente a estrutura da cromatina tornando sua interação com o DNA mais fraca resultando no seu relaxamento com consequente aumento nos níveis de transcrição gênica (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

1.6 Acetilação de histonas

A primeira modificação de histonas descrita e descoberta em 1961 (PHILLIPS, 1963) foi a acetilação de histonas. O processo de acetilação ocorre pela ação de duas famílias de enzimas, histona acetiltransferases (*histone acetyltransferase*; HATs) e histona desacetilases (*histone deacetylases*; HDACs). As HATs catalisam a transferência de um grupo acetil, originado do cofator acetil-CoA, ao grupo ϵ -amino da cadeia lateral da lisina. Esta adição neutraliza a carga positiva da lisina enfraquecendo a ligação das histonas com o DNA, relaxando a cromatina, expondo regiões do DNA e permitindo a transcrição gênica (revisado em YANG; SETO, 2007). Há dois tipos de HATs: tipo A e tipo B. HATs do tipo A são encontradas no núcleo associadas a complexos multiproteicos, podendo ser classificadas de acordo com a sua homologia de sequência de aminoácidos e estrutura conformacional em GNAT, MYST, p300/CBP; HATs relacionadas a fatores de transcrição e HATs associadas ao

receptor nuclear (HODAWADEKAR; MARMORSTEIN, 2007; SELVI et al., 2010). No quadro 1 podemos observar os membros das famílias de HATs e as modificações já descritas executadas por cada um. As proteínas do complexo possuem importantes funções no controle do recrutamento, atividade e especificidade enzimático. Já as HATs do tipo B localizam-se predominantemente no citoplasma, acetilando histonas livres recentemente sintetizadas, sendo a acetilação uma marcação importante para o seu direcionamento ao núcleo (PARTHUN, 2007).

Quadro 1

Famílias de HATs, seus membros e as modificações relacionadas.

HAT/KAT family	Representative members	Histone modification
Type A HAT (nuclear HAT)		
1) GNAT family	GCN5/KAT2A, PCAF/KAT2B ELP3/KAT9	H3K9, K14, K18, H2B H3, H4 acetylation
2) p300/CBP family	CBP/KAT3A, p300/KAT3B	H3K9, K14, K18, H2B H2AK5, H2BK12, K15
3) MYST family	TIP60/KAT5, MOZ/KAT6A, MORF/KAT6B, HBO1/KAT7, HMOF/KAT8	H4K5, K8, K12, K16 H3K14 H4K5, K8, K12 H4K16
4) Transcription factor related	TFIIIC90/KAT12, TAF1/KAT4	H3K9, K14, K18 H3, H4 acetylation
5) Nuclear receptor associated	SCR1/KAT13A, ACTR/KAT13B	H3/H4 acetylation
Type B HAT (cytoplasmic HAT)		
	HAT1/KAT1	H4K5, K12

Fonte: SELVI et al., 2010, p. 841.

As HATs fazem parte de um complexo de modificadores pos-traducionais que trabalham cooperativamente regulando a função das proteínas modificadas por elas. Devido a sua dispersa localização na célula, as HATs atuam tanto em proteínas nucleares como citoplasmáticas, o que pode resultar em muitos efeitos (figura 6). Há uma lista crescente de proteínas que não são histonas, as quais as HATs também atuam regulando a sua função (MINUCCI; PELICCI, 2006). As HATs exercem ação na estabilização de proteínas, pois competem pelo mesmo resíduo da ubiquitinação (CARON; BOYAULT; KHOCHBIN, 2005); nas interações proteína-proteína conferindo potenciação de atividade pela interação ou sua supressão pela dissociação das proteínas (MUNSHI et al., 2001); na localização de proteínas onde a acetilação da lisina pode favorecer a translocação do núcleo para o citoplasma ou

reter a proteína no núcleo (BANNISTER et al., 2000); na ligação com o DNA interferindo na atividade de inúmeros fatores de transcrição correlacionado com a acetilação das proteínas histonas (CAILLAUD et al., 2002); e entre outros efeitos importantes para a fisiologia celular (revisado em MINUCCI; PELICCI, 2006). A acetilação de histonas pode ocorrer em inúmeros resíduos na cauda N-terminal das histonas, incluindo os mais conhecidos na lisina 9 e 14 da histona 3 e nas lisinas 5 e 12 da histona 4 (KOUZARIDES, 2007). A ocorrência de um grande número de resíduos que podem sofrer acetilação indica que, em regiões hiperacetiladas, a carga das caudas das histonas sofre neutralização, fragilizando sua interação com o DNA.

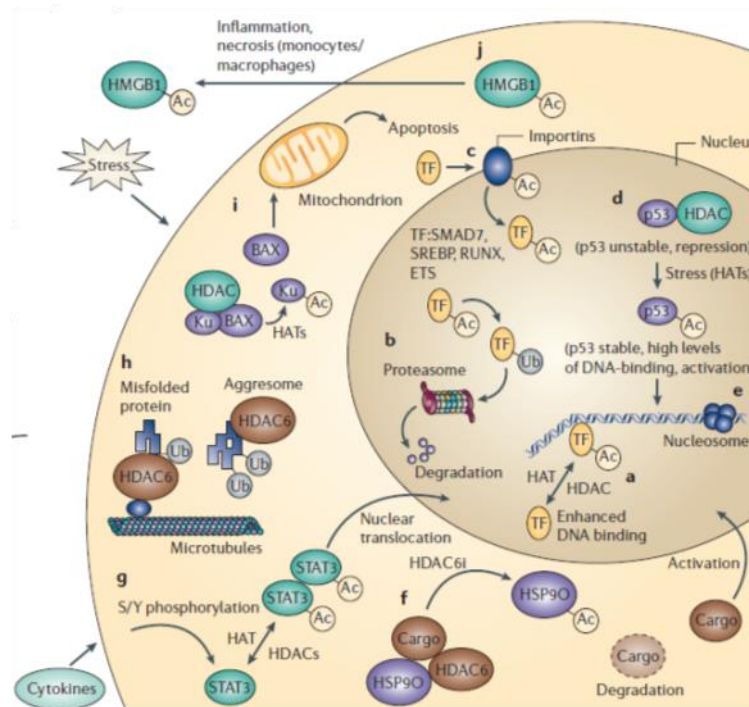


Figura 6 - Visão esquemática dos processos que são afetados pela acetilação e desacetilação de proteínas. a. associação de fatores de transcrição ao DNA; b. estabilidade proteica; c. importação e exportação de proteínas entre núcleo e citoplasma; d. funcionamento da p53; e. acessibilidade ao nucleossomo; f. funcionamento das chaperonas; g. funcionamento da proteína STAT3; h. funcionamento da maquinaria ubiquitina-proteossomo; i. translocação de BAX; j. exportação nuclear e acumulação citosólica de HMGB1 para posterior secreção.

Fonte: MINUCCI; PELICCI, 2006, p. 40.

Agindo de forma oposta, as HDACs revertem a acetilação nas lisinas, restaurando sua carga positiva e estabilizando a arquitetura da cromatina, reprimindo a transcrição gênica ou regularizando as atividades das proteínas (Figura 7). As HDACs são divididas em 4 classes e subdivididas em 2 famílias: as Clássicas e as Sirtuínas. As HDACs Clássicas HDAC1, -2, -3 e -8 (classe I), HDAC4, -5, -6, -7, -9 e -

10 (classe II) e HDAC11 (classe IV) compartilham similaridade na sua sequência e requerem Zn^{2+} para sua atividade de desacetilase (DE RUIJTER et al., 2003). As Sirtuínas requerem NAD^+ como cofator e possuem 7 membros, Sirt1-7, correspondendo à classe III de HDACs.

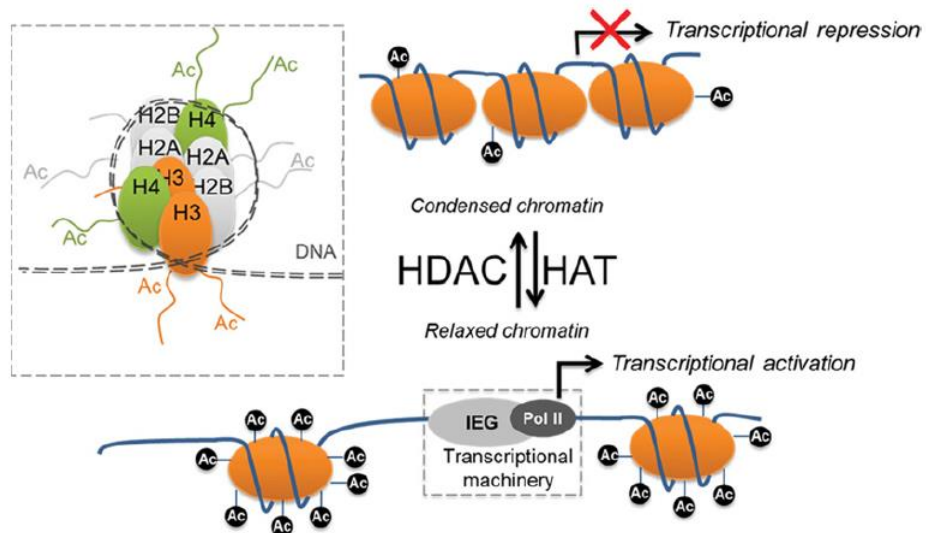


Figura 7 - Transição entre estados de cromatina com transcrição ativa e reprimida dependendo do equilíbrio entre HATs e HDACs.

Fonte: WHITTLE; SINGEWALD, 2014, p.571.

1.7 Histona desacetilases e inibidores de histona desacetilases

As classes de HDACs localizam-se e exercem suas funções diferentemente (Figura 8, JOSHI et al., 2013). As HDACs da Classe I são encontradas no núcleo celular sendo expressas de forma ubíqua. Sua atividade influencia, em sua maioria, modificações na arquitetura da cromatina, na expressão gênica, no transporte proteico e no ciclo celular. As HDACs da classe II exercem suas funções de forma mais específica nos tecidos e se divide em classe IIa (HDAC4, -5, -7 e -9) e IIb (HDAC6 e -10). As HDACs da classe IIa se transportam do núcleo para o citoplasma em resposta ao estímulo, enquanto HDAC6 e HDAC10 localizam-se prioritariamente no citoplasma. As funções celulares modificadas pelas HDACs da classe II incluem, além do remodelamento da cromatina e expressão gênica, transdução de sinal e processamento de RNA, ubiquitinação e ciclo celular (YANG; GRÉGOIRE, 2005). A classe IV possui apenas um membro conhecido, HDAC11, que se localiza tanto

agindo no núcleo como no citoplasma e interage, em sua maioria, com proteínas importantes para o remodelamento da cromatina e expressão gênica, processamento de RNA, ciclo celular, enovelamento de proteínas e transdução de sinal (JOSHI et al., 2013). As HDACs da classe III Sirt-1, -6 e -7 são encontradas no núcleo, enquanto Sirt-2 é citosólica e Sirt-3, -4 e -5 são encontradas nas mitocôndrias. A atividade das sirtuínas influencia inúmeros processos fisiológicos, afetando a sobrevivência celular, o metabolismo e o ciclo celular (HAIGIS; GUARENTE, 2006; DE RUIJTER et al., 2003; ZHANG; ZHONG, 2014).

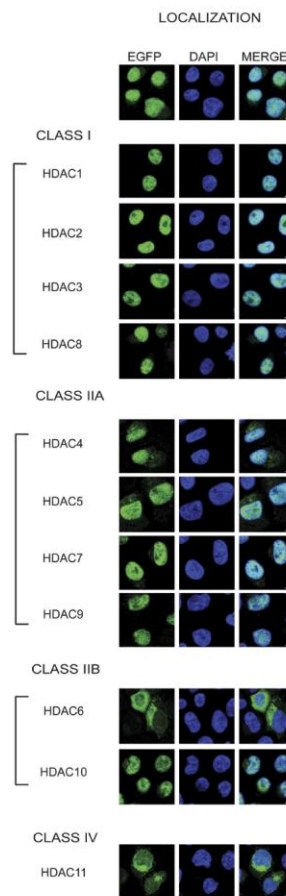


Figura 8 - Localização das diferentes HDACs nas células, classe III não está representada.

Fonte: Adaptado de JOSHI et al., 2013, p.3.

O equilíbrio das atividades de HATs e HDACs coordena a fisiologia de processos neurobiológicos, de sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, entre outros. E seu desequilíbrio foi observado em inúmeras patologias, já que o balanço entre suas ações governa inúmeros processos do desenvolvimento e da fisiologia animal (URDINGUIO; SANCHEZ-MUT; ESTELLER, 2009; MARKS; XU, 2009; WOOD et al., 2005; KOUZARIDES, 1999; FENRICK; HIEBERT, 1998; FALKENBERG;

JOHNSTONE, 2014; CAO; SUDHOF, 2001; KIM; SHUKLA 2006). Desta maneira, as HDACs se tornaram alvos terapêuticos promissores no controle dos estados de acetilação aberrantes e na recuperação do seu equilíbrio.

Nos últimos anos, enorme atenção tem sido dada ao descobrimento e desenvolvimento de inibidores de HDACs (*HDACs inhibitors*; HDACis) (MARKS; XU, 2009; ; ZHANG; FANG; XU, 2010). Inúmeros HDACis já foram sintetizados ou isolados de produtos naturais e variam na sua estrutura, especificidade, propriedades farmacocinéticas e atividade. A maioria dos HDACis possuem ação inespecífica, tendo como alvo múltiplas HDACs, o que torna difícil a compreensão dos seus efeitos (BANTSCHEFF et al., 2011). Dentre as HDACis mais conhecidas, temos as de ação global Tricostatina A (TSA) e o Ácido Suberoilânido Hidroxâmico (SAHA), que são compostos da classe dos ácidos hidroxâmicos que interagem com o sítio catalítico das HDACs, inibindo sua atividade (FINNIN et al., 1999 ; MONNERET, 2005). Adicionalmente, outros compostos como os ácidos alifáticos, Ácido Valpróico (VPA) e o Butirato Sódico (NaB), também estão recebendo atenção por possuírem atividade inibitória de HDACs, afetando a expressão de inúmeros genes (PHIEL et al., 2001; DAVIE, 2003). Já se demonstrou que TSA inibe todas as classes menos a classe III de HDACs e NaB inibe a maioria das HDACs, com exceção das HDAC6 e 10 da classe IIb, da classe III e classe IV (BOLDEN; PEART; JOHNSTONE, 2006; DAVIE, 2003; KRUH, 1982; COUSENS; GALLWITZ; ALBERTS, 1979).

Durante a inibição da atividade de HDACs, a atividade de HATs permanece, o que resulta num estado de hiper-acetilação das histonas. No entanto, as histonas não são o único substrato destas enzimas. Inúmeras outras proteínas podem ser acetiladas pelas HATs e desacetiladas pelas HDACs como, por exemplo, os fatores de transcrição, mediadores de transdução de sinal, proteínas do citoesqueleto, chaperonas e até proteínas virais (GLOZAK et al., 2005). Todas estas evidências demonstram que as modificações, de acetilação e desacetilação, possuem efeitos de amplo espectro no remodelamento da estrutura da cromatina, na regulação da expressão gênica e na atividade de diversas proteínas (DAVIE, 2003). Em 2000, os autores MARIADASON; CORNER; AUGENLICHT demonstraram ainda que HDACis regulam um conjunto comum de genes que correspondem a apenas 10% de todos os genes (Quadro 2), indicando também uma maior suscetibilidade de genes ligados ao controle de crescimento e sobrevivência celular aos efeitos de HDACis, o que está de acordo com as propriedades anticâncer já observadas para estes fármacos (MARIADASON; CORNER; AUGENLICHT, 2000).

Quadro 2

HDACis de ação global e os genes por eles regulados.

HDACi	HDAC alvo	Genes regulados		Efeito <i>in vitro</i>
		ativo	reprimido	
NaB	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9	CDKN1A, GATA2, PKCD, MHC1, MHC2, BAK, IL8, RAR β , TG1, cyclin E, CPA3, CD86, ICAM1	Cyclin D1, cyclin A, BCL2, IL2, BCLXL	Apoptose, Diferenciação, controle do ciclo celular
VPA	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9	β -catenin		Apoptose, Diferenciação
TSA	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9, HDAC6, HDAC10, HDAC11	CDKN1A, GATA2, HSP86, CDKN1B, PKCD, HDAC1, IGFBP3, DHFR, TGFB1, ER, CD86, cyclin E, IFNG, IFNB, TP53, VHL, MHC1, MHC2, CPA3, P107, BAX, BAK, TG1, CDNK2A, MLH1, TIMP3	Cyclin A, CDKN1C, BCLXL, PU.1, HIF1A, VEGF, IL2, IL10	Apoptose, Diferenciação, controle do ciclo celular
SAHA	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9, HDAC6, HDAC10, HDAC11	CDKN1A	CMYC, CMYB, BMYB	Apoptose, Diferenciação, controle do ciclo celular

Fonte: Adaptado de CHWANG et al, 2006; BOLDEN; PEART; JOHNSTONE, 2006.

1.8 Aprendizado e memória

A capacidade de adquirir novas informações é uma das atividades mais importantes do sistema nervoso e a expressão de memórias previamente adquiridas é crucial para a sobrevivência e evolução das espécies. Falhas nos mecanismos de formação, armazenamento e utilização das memórias são o cerne de uma grande variedade de transtornos em humanos como, por exemplo, os cognitivos, de humor e o vício.

As memórias são adquiridas através do processo de aprendizado, passando por 3 fases distintas a partir da sua aquisição: consolidação, evocação e reconsolidação (Figura 9; NADER, 2003; ALBERINI, 2005; BEKINSCHTEIN et al., 2007). Após a aquisição, as memórias são processadas em um período chamado de consolidação, em que uma memória lábil passível de interrupção gradualmente se transforma em uma memória estável. Posteriormente, as memórias podem ser novamente ativadas durante a evocação e sofrerem um processo de atualização durante a fase de reconsolidação (ROBERTSON; COHEN, 2006; DUDAI, 2012; DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2013).

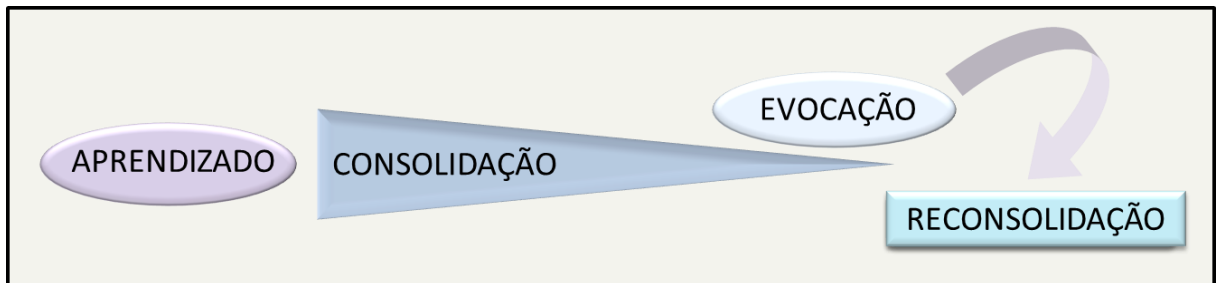


Figura 9 - Fases da memória.

Fonte: Acervo da autora.

As memórias são dinâmicas e podem variar conforme seu conteúdo (MARKOWITSCH, 1997); e conforme sua duração (THOMPSON; KIM, 1996; MARKOWITSCH, 1997; FUSTER, 1998; IZQUIERDO et al., 1999, 2000). Com relação ao seu conteúdo, as memórias podem ser denominadas de procedurais (implícitas, quando tratando de seu equivalente em animais experimentais), aquelas que são gradativamente adquiridas e uma vez estabelecidas são evocadas de maneira inconsciente constituindo traços extremamente duradouros; ou declarativas (explícitas), sobre fatos, eventos ou conhecimentos, conscientemente adquiridas e evocadas, podendo variar amplamente em sua duração.

Os diferentes tipos de memória utilizam ainda diferentes substratos neuroanatomicos. Enquanto as memórias procedurais são processadas por sistemas sensoriais e motores relacionados com a execução das habilidades aprendidas, as memórias declarativas dependem da integridade funcional das estruturas do lobo temporal e diencefálico, especialmente do hipocampo e da amígdala (EICHENBAUM, 1996; EICHENBAUM, 1999; RIEDEL; MICHEAU, 1999). O hipocampo é um dos principais maestros no processo de formação e consolidação das memórias. Esta região inicialmente recebe as informações advindas do estímulo e, com o passar do tempo, às integra, através de sinalização celular e sináptica, estabiliza-as e reorganiza-as em regiões corticais do cérebro para formar um traço de memória duradouro (DUDAI, 2012). Desta forma, as memórias declarativas podem ser divididas em dois tipos principais de acordo com o tempo durante o qual são retidas: memórias de curta duração (*short-term memory* ou STM), retidas por minutos ou horas após o aprendizado, ou LTM, que persistem dias, anos ou mesmo uma vida inteira (FUSTER, 1998). As memórias de curta e de longa duração utilizam as mesmas estruturas nervosas para seu processamento, porém, a formação da LTM requer mecanismos moleculares adicionais que culminam na modulação da expressão gênica e síntese de novas proteínas o que favorece a estabilização e formação de novas sinapses (KANDEL, 2001; ALBERINI; MILEKIC; TRONEL, 2006).

1.9 Formação da LTM via controle da expressão gênica

O processo de aprendizado e formação da LTM desencadeia a ativação de vias de sinalização intracelulares durante a sua consolidação, com consequente ativação da transcrição gênica em ondas de cascatas bioquímicas, que podem ocorrer por 12 horas ou mais dependendo do estímulo e da sua intensidade (LEVENSON et al., 2004; CARONI; CHOWDHURY; LAHR, 2014). Estudos em modelos animais têm mostrado que eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória incluem, inicialmente, o aumento da concentração de cálcio intracelular pela ativação de receptores glutamatérgicos dos tipos AMPA, *N*-metil-D-aspartato (NMDAr) e metabotrópico. Em seguida, observa-se aumento na atividade de proteínas cinases como as proteino-cinase G, C e A (PKG, PKC e PKA), proteínas cinases dependente de cálcio-calmodulina (CaMK II e CaMK IV) e proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK), com consequente fosforilação do fator de transcrição de ligação ao elemento de resposta a adenosina monofosfato cíclico (CREB; DUNNING; DURING, 2003; IZQUIERDO; MEDINA, 1997; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000; MCGAUGH, 2000; CAMMAROTA et al., 2000; IZQUIERDO et al., 2006; MEDINA et al., 2008). Os eventos bioquímicos iniciais resultam na tradução de mRNAs pré-

existentes (de 0 min até 90 min após o estímulo), no surgimento de novas sinapses (por volta de 1 h) e na transcrição de genes de plasticidade sináptica como *Zif268*, *c-fos*, *c-jun*, *bdnf* e *arc* (entre 1 h e 3 h) (LESLIE; NEDIVI, 2011; RESSLER et al., 2002; KATCHE; CAMMAROTA; MEDINA, 2013). Uma segunda onda de eventos bioquímicos é observada a partir de 3 horas e inclui a ocorrência de um novo aumento da atividade de PKA, ativação de genes de elementos regulatórios de fatores de transcrição, de modificações pos-traducionais em fatores de transcrição como a fosforilação de CREB e C/EBP e a maturação das novas sinapses, com sua consequente estabilização (LEVENSON, 2004; ALBERINI, 2009; BERNABEU et al., 1997a–c; BEVILAQUA et al., 1997; CARONI; CHOWDHURY; LAHR, 2014). A ativação de CREB neste momento modula a ativação de genes e a síntese de proteínas críticas para as modificações estruturais nas sinapses necessárias para o armazenamento e persistência das memórias (Figura 10; POO, 2001; BEKINSCHTEIN et al., 2008, RESSLER et al. 2002; MCGAUGH, 2000).

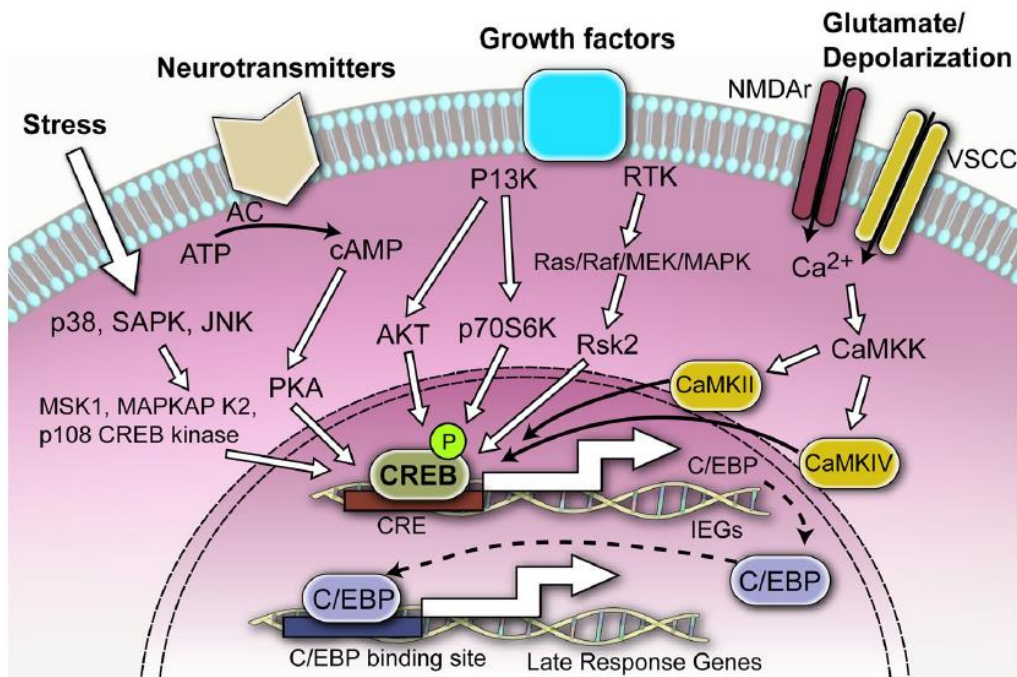


Figura 10 - Representação esquemática das vias de sinalização ativadas durante a formação da memória.

Fonte: ALBERINI, 2009, p.131.

1.10 Mecanismos epigenéticos na memória

A transcrição gênica e a tradução de novas proteínas são eventos fundamentais para a consolidação e persistência das LTM, ratificando o papel crucial que mecanismos regulatórios da cromatina, com conseqüente modulação da expressão gênica, possuem nestes processos (ALBERINI; KANDEL, 2014; RESSLER et al., 2002). As mudanças morfológicas nas sinapses ocorrem de maneira orquestrada com as alterações na cromatina e na expressão gênica e o entendimento do padrão de modificações epigenéticas decorrentes do aprendizado é hoje um dos principais focos das pesquisas em memória (ALBERINI; KANDEL, 2014; GUAN; XIE; DING, 2014; LEVENSON; SWEATT, 2006).

Swank e Sweatt, em 2001, demonstraram pela primeira vez que mecanismos epigenéticos poderiam ter um importante envolvimento durante o aprendizado (SWANK; SWEATT, 2001). Utilizando a tarefa de aprendizado de um novo sabor (*novel taste learning*), os pesquisadores demonstraram a ativação de HATs após o treino, coincidindo com a ativação da cascata de ERK/MAPK no córtex insular, regulando a expressão gênica. Nos anos que se seguiram, evidências de estudos farmacológicos e genéticos têm revelado os reguladores epigenéticos que podem estar envolvidos na consolidação da memória. A administração de TSA e NaB, inibidores globais de HDACs, resultou na melhora da LTM (VECSEY et al., 2007; YEH; LIN; GEAN, 2004). Já a interrupção genética da HAT CBP afetou a LTM de forma negativa, prejudicando a sua formação (ALARCON et al., 2004; BARRETT et al., 2011). HDAC2 parece ser um dos reguladores principais envolvidos na regulação da LTM, pois camundongos super expressando HDAC2 tiveram prejuízo na memória, enquanto animais *knockout* para a mesma HDAC mostraram plasticidade sináptica aumentada (GUAN et al., 2009). Adicionalmente, a inibição específica de HDAC3 melhorou o desempenho na formação da memória de medo e a extinção do comportamento de busca por drogas (MALVAEZ et al., 2013; MCQUOWN et al., 2011; ROGGE et al., 2013). Por outro lado, camundongos *knockout* para HDAC4 especificamente no cérebro mostraram prejuízos significativos de memória (KIM et al., 2012). É importante ainda ressaltar que a perturbação dos reguladores epigenéticos que controlam o equilíbrio de acetilação, CBP e p300/CREB, vem sendo associada com a patogênese da doença de Alzheimer (CACCAMO et al., 2010; DUCLOT et al., 2010).

Muitos outros trabalhos mostram que a metilação de histonas estaria igualmente envolvida com a formação de memórias (revisado em JAROME; LUBIN, 2013). O treino na tarefa de medo condicionado mostrou que este induziu o aumento da dimetilação na lisina 9 da histona 3 (H3K9me2), um marcador de repressão gênica, e da trimetilação na lisina 4 da histona 3 (H3K4me3), um marcador

de ativação gênica, no hipocampo e córtex entorhinal de ratos. Observou-se também mudanças significativas nos promotores dos genes *Zif268*, *DNMT3a*, *BDNF exon IV* e *c-fos* que ocorreram em combinação com a expressão do mRNA destes genes (GUPTA et al., 2010; GUPTA-AGARWAL et al., 2012). Adicionalmente, a manipulação farmacológica ou genética de enzimas metiltransferases mostrou ser prejudicial para a formação da LTM em roedores (KERIMOGLU et al., 2013; GUPTA et al., 2010; GUPTA-AGARWAL et al., 2012) e a inibição ou o aumento dos níveis de H3K9me2 na BLA alterou a LTM, uma modificação que permaneceu até 25h após o treino (GUPTA-AGARWAL et al., 2014).

Outras modificações que estariam atuando nos processos de memória e aprendizado também foram identificadas, como a fosforilação de H3S10 com níveis aumentados 1 hora após o treino na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto (CFC) (CHWANG et al., 2006) e a metilação do DNA que se demonstrou fundamental na formação de LTM, pois a inibição de DNA metiltransferases resultou na supressão da memória e prejudicou a consolidação do aprendizado (MILLER; CAMPBELL; SWEATT, 2008; MILLER; SWEATT, 2007). Outro trabalho em 2010, por Feng e colaboradores, demonstrou que camundongos *knockout* para DNA metiltransferases 1 e 3 tiveram prejuízo na plasticidade sináptica, no aprendizado e na memória (FENG et al., 2010). E também, em 2013, demonstrou-se que a super expressão do regulador TET1 de metilação de DNA no hipocampo foi prejudicial para a formação da memória de camundongo na tarefa de medo contextual (CFM) (KAAS et al., 2013).

1.11 Acetilação de histonas e formação da memória

Na literatura de epigenética e memória, a acetilação de histonas é tida hoje como um dos eventos principais e crucial na regulação da expressão genica em decorrência do aprendizado para a modulação de mecanismos de plasticidade sináptica e posterior consolidação da LTM. Podemos destacar, inicialmente, o trabalho de Guan e colaboradores (2002), que foram pioneiros no estudo das interações DNA e proteínas demonstrando em culturas neurais de *Aplysia* que, durante um evento de plasticidade sináptica semelhante ao que ocorre na LTM, a expressão da HAT C/EBP era rapidamente induzida e a sua inibição bloqueava os eventos de plasticidade (GUAN et al., 2002). Posteriormente, o trabalho analisou a participação da acetilação na indução ou não da expressão de C/EBP e observou níveis de acetilação aumentados nas histonas 3 e 4 localizadas próximas ao promotor de C/EBP. Nos anos que se seguiram, muitos pesquisadores realizaram estudos nesta área procurando pelo envolvimento da acetilação de histonas nos processos de formação e consolidação da memória, bem

como nos processos de extinção, reconsolidação e persistência, visando decifrar os mecanismos que conduzem, nas células, aos padrões de expressão gênica específicos a cada tipo de memória e região do cérebro (revisado em PEIXOTO; ABEL, 2013). Como estes processos são dinâmicos e envolvem mudanças ao longo do tempo, tornou-se importante estudar o progresso temporal das alterações moleculares que subjazem a LTM para compreender como eles influenciam a consolidação da memória, sua persistência e armazenamento. Para isso, o desenvolvimento e a utilização de HDACis se tornou um método essencial nos estudos dos efeitos do balanço da acetilação e desacetilação no processo de formação da memória, na possível reversão do declínio cognitivo associado ao envelhecimento e na participação da acetilação em inúmeras vias de sinalização intracelular cruciais para formação da LTM, como a via das neurotrofinas.

1.12 HDACis na plasticidade sináptica e formação da memória

O uso e o desenvolvimento de novos HDACis nos últimos anos têm ajudado na elucidação dos eventos temporais de expressão genica durante a consolidação da LTM. Nesse contexto, inúmeros trabalhos visam a compreensão do papel da acetilação nas memórias. Levenson e colaboradores (2004), administrando TSA ou NaB, demonstraram que o tratamento causou melhoras na indução da potenciação de longa duração (LTP), um modelo sináptico *in vitro* dependente de transcrição gênica que se acredita mimetizar o processo de LTM, e ainda a administração intraperitoneal (I.P.) de NaB pré-treino melhorou a memória de ratos (LEVENSON et al., 2004). Com resultados semelhantes, Yeh e colaboradores administraram TSA ou NaB por via intra-amigdalár e observaram melhora da LTM na tarefa de CFC (YEH; LIN; GEAN, 2004). E, em 2004, camundongos transgênicos, expressando CBP sem atividade de HAT, demonstraram prejuízo na aquisição de novas informações sendo recuperado após o tratamento com TSA (KORZUS; ROSENFELD; MAYFORD, 2004).

Em 2007, o estudo de Lattal e colaboradores demonstrou que tanto a administração sistêmica de NaB ou intra-hipocampal de TSA exerciam efeitos sobre o processo de extinção do CFC, facilitando-o (LATTAL; BARRETT; WOOD, 2007). No mesmo ano, demonstrou-se que a administração intra-hipocampal de TSA logo após a aquisição do aprendizado resultava na melhora da LTM sem afetar a STM (VECSEY et al., 2007). Aumento significativo nos níveis de acetilação de H4 foi observado durante a extinção da memória de CFC e o tratamento com o HDACi VPA facilitou a extinção nesta tarefa (BREDY et al., 2007). Bredy e Barad, em 2008, também utilizando VPA administrado

sistemicamente, demonstraram melhora na aquisição e extinção da LTM na tarefa de condicionamento aversivo (BREDY; BARAD, 2008). Além disso, observou-se que a administração de NaB I.P. em camundongos após um treino com estímulo fraco, que normalmente não resultaria em LTM, facilitou a formação da LTM e aumentou sua persistência usando a tarefa de reconhecimento de objeto novo (*Novel Recognition Object*; NOR; STEFANKO et al., 2009). A infusão intra-hipocampal de NaB melhorou a memória na tarefa de localização de objeto (*object location training*, OLT) quando administrado imediatamente após o treino (ROOZENDAAL et al., 2010) e, da mesma forma, a infusão de TSA após o treino também melhorou a LTM da OLT (HAWK; FLORIAN; ABEL, 2011).

Usando as tarefas de NOR e OLT, Haettig e colaboradores, demonstraram que a HAT CBP é essencial para a modulação de LTM via HDACs e a administração de NaB melhorou o desempenho dos animais na OLT (HAETTIG et al., 2011). Níveis aumentados de acetilação de H3 e a melhora da LTM sem afetar a STM também foram observados com infusão intra-amigdalár de TSA (MONSEY et al., 2011). Mahan e colaboradores, em 2012, observaram aumentos nos níveis de acetilação de H3 após administração I.P. de NaB em camundongos, o que induziu ainda a melhora na memória do CFC (MAHAN et al., 2012). Melhora na LTM também foi observada com a administração de NaB na região do córtex pré-frontal (SUI et al., 2012). E, VPA e NaB administrados por via I.P. 2h antes do treino, melhoraram o aprendizado na tarefa do estímulo condicionado ao apetite em ratos (PLOENSE et al., 2013).

A inibição inespecífica de HDACs, isto é utilizando os inibidores de HDACs globais, também demonstrou ser efetiva na facilitação da extinção de comportamento de dependência à droga em diversos estudos (ITZHAK; LIDDIE; ANDERSON, 2013; RAYBUCK et al., 2013; MALVAEZ et al., 2013). E ainda, a melhora da memória através do tratamento com HDACs foi observada em doenças como Síndrome de Rubinstein Taybi, Doença de Alzheimer e traumatismo craniano (ALARCON et al., 2004; FISCHER et al., 2007; DASH; ORSI; MOORE, 2009; KILGORE et al., 2010). Desta forma, HDACs demonstram possuir um elevado potencial terapêutico, tendo ainda sido demonstrado seus efeitos benéficos em inúmeras doenças neuropsiquiátricas (Figura 11; KONTOPOULOS; PARVIN; FEANY, 2006; FISCHER et al., 2010; TSANKOVA et al., 2006), reafirmando a importância da compreensão de suas ações nos eventos de aprendizado e memória.

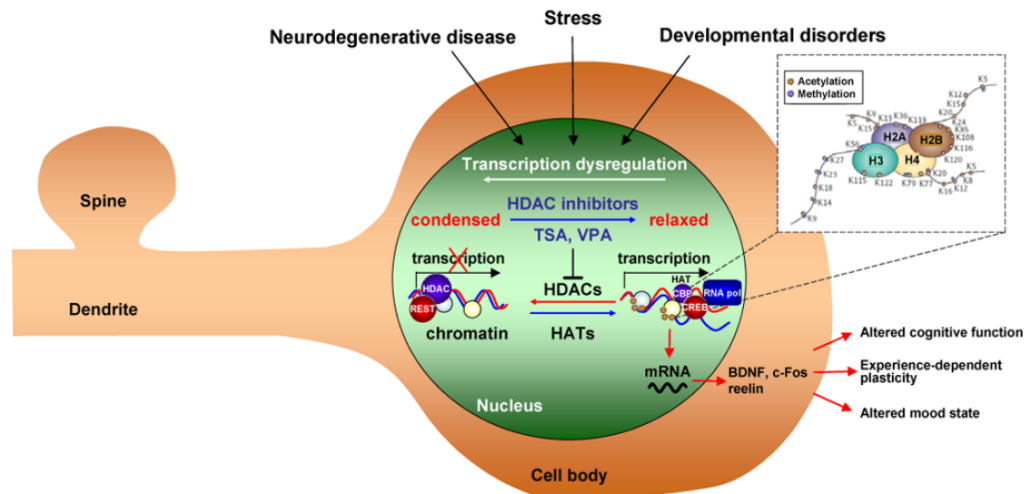


Figura 11 - Esquema mostrando as doenças psiquiátricas e as modificações epigenéticas dos genes chave e sua intervenção por HDACis.

Fonte: ABEL; ZUKIN, 2008, p.62.

1.13 HDACis no envelhecimento e neurodegeneração

Alterações na expressão gênica são um dos fatores mais importantes relacionados com o prejuízo da memória decorrente do processo de envelhecimento, já que o declínio da atividade cognitiva é uma consequência normal do envelhecimento saudável (BISHOP; LU; YANKNER, 2010). Estudos na área demonstram evidências de que há diminuição dos níveis de acetilação de H4 no hipocampo associados com o declínio cognitivo em camundongos velhos (PELEG et al., 2010) e em modelos animais da Doença de Alzheimer (FRANCIS et al., 2009). E ainda, o tratamento com HDACis não seletivos, como o NaB e o TSA, resultou na prevenção e recuperação do declínio cognitivo associado ao envelhecimento (STILLING; FISCHER, 2011).

Análises comportamentais e imunohistoquímicas em animais velhos mostraram que o tratamento com TSA intra-hipocampal imediatamente após o treino reestabeleceu os níveis de acetilação de H4 (DAGNAS et al., 2013). Adicionalmente, HDACis administrados sistemicamente melhoraram a memória de animais velhos submetidos à tarefa de NOR (REOLON et al., 2011), reverteram os prejuízos na memória de animais modelo de neurodegeneração (FONTÁN-LOZANO et al., 2008) e daqueles que apresentaram prejuízo na memória induzidos pela sobrecarga de ferro no

período neonatal (SILVA et al., 2012). Recentemente, Dagnas e colaboradores, falharam ao tentar melhorar a memória de ratos velhos com infusão intra-hipocampal de TSA imediatamente após o treino na tarefa de memória espacial, no entanto o tratamento recuperou os níveis de acetilação de H4 que se apresentavam alterados no hipocampo (DAGNAS et al., 2014). Todos estes dados apontam para o potencial de HDACis em melhorar o declínio cognitivo associado com o envelhecimento e com as doenças relacionadas à ele, demonstrando que há um desequilíbrio nos níveis de acetilação no cérebro em função do envelhecimento.

1.14 HDACis e a via de neurotrofinas/TrkB

Uma das vias mais importantes na aquisição do aprendizado e no processamento de novas memórias é a via do fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor* ou BDNF) e de seu receptor (Figura 12). O BDNF é uma pequena proteína pertencente à família de fatores de crescimento neurotrofinas (MURER; YAN; RAISMAN-VOZARI, 2001). A sinalização pelo BDNF é mediada através de duas classes de receptores de membrana celular que se diferem pela via intracelular as quais ativam: receptores cinase B relacionados à tropomiosina (*tropomyosin-related kinase receptor B*, TrkB) e o receptor comum a todas a neurotrofinas p75^{NTR}. A ligação de BDNF ao receptor TrkB induz a sua dimerização e autofosforilação nos resíduos de tirosina na sua porção intracelular, com subsequente ativação intracelular de uma ou mais cascatas de sinalização que compreendem a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), fosfolipase C gamma (PLC γ) e a cinase regulada por sinal intracelular 1/2 (ERK1/2; CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010; BEKINSCHTEIN et al., 2008). Todas estas vias de sinalização intracelular, após a sua ativação, convergem no núcleo fosforilando o fator de transcrição CREB e propiciando a modulação da síntese de proteínas via mecanismos transcricionais (ALONSO et al., 2002). Evidências sugerem que o BDNF regula a função sináptica dependente de atividade, sendo importante na transmissão e plasticidade sináptica (POO, 2001; BEKINSCHTEIN et al., 2008). Consistente com a visão de que mudanças nas sinapses dependentes de atividade subjazem o processamento e armazenamento de memórias (CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010; KANDEL, 2001; IZQUIERDO; MEDINA, 1997), inúmeros trabalhos sugerem um papel crucial da via TrkB/BDNF no aprendizado e na memória (BEKINSCHTEIN et al., 2007; PANG; LU, 2004; ALONSO et al., 2002; TYLER et al., 2002).

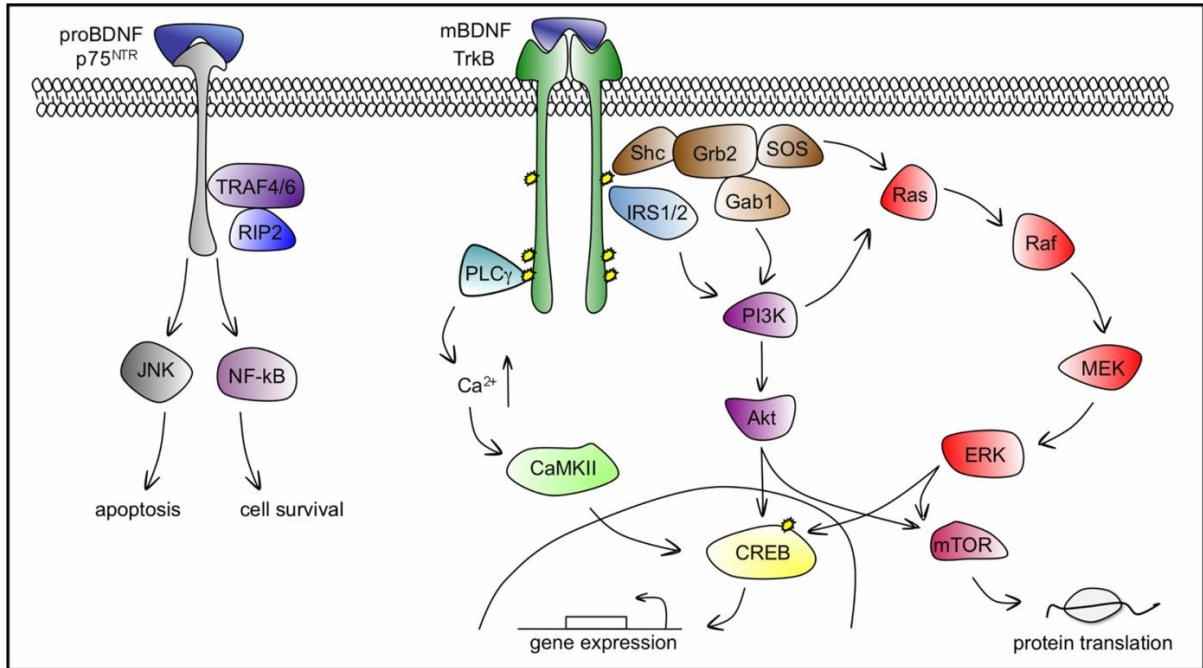


Figura 12 - Vias de sinalização intracelulares mediadas por BDNF/TrkB.

Fonte: CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010, p. 4.

A regulação da transcrição via BDNF é mediada pela fosforilação de CREB na *ser133* e pela ligação de CREB ao elemento de resposta a cAMP (CRE) e na cromatina em regiões promotoras de genes importantes para a memória como *c-fos*, *zif-268*, *nNos*, entre outros (CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010; RICCIO et al. 2006). O funcionamento anormal de certas áreas do cérebro estaria associado com a regulação da expressão e sinalização por BDNF (POO, 2001; BEKINSCHTEIN et al., 2008; ROTH; SWEATT, 2010).

Alguns estudos avaliaram a relação entre os níveis de acetilação de histonas, a expressão gênica de BDNF e a sinalização por TrkB (revisado em BOULLE et al., 2012). Bredy e colaboradores, em 2007, utilizando VPA e a tarefa CFC, observaram que a extinção do CFC é acompanhada de aumento na acetilação de H4 em torno do promotor de *bdnf* e que VPA aumenta a memória de extinção (BREDY et al., 2007). Lubin e colaboradores, em 2008, demonstraram que a transcrição do mRNA de BDNF é superregulada no hipocampo durante a consolidação da memória de medo, evento que é acompanhado de um aumento da fosfoacetilação de H3 nos promotores deste gene (LUBIN; ROTH; SWEATT, 2008). Em 2010, Wang e colaboradores demonstraram aumento de acetilação de H3 nos promotores do gene *bdnf* em resposta ao uso crônico de cocaína por ratos (WANG et al., 2010). Ishimaru e colaboradores, também em 2010, demonstraram que o tratamento com TSA *in vitro* aumenta a acetilação de H3 e H4 nos promotores do gene *bdnf* (ISHIMARU et al., 2010).

Adicionalmente, o receptor TrkB também demonstra possuir um papel importante na plasticidade sináptica dependente de atividade e está sendo implicado como mediador de eventos de aprendizado e memória (MINICHELLO et al., 1999; RATTINER et al., 2004; SAARELAINEN et al., 2000). O desenvolvimento de antagonistas específicos aos diferentes receptores de Trks (A, B, C) nos últimos anos tem permitido uma melhor compreensão dos mecanismos que governam a sinalização mediada por cada um deles e a sua importância nos processos celulares e patofisiológicos (CAZORLA et al., 2011; CAZORLA et al, 2010; MUSUMECI; MINICHELLO, 2011). Com base nestas evidências é de grande importância a elucidação do envolvimento da sinalização por BDNF e TrkB com os reguladores epigenéticos, principalmente os de acetilação de proteínas, a fim de se entender suas ações no aprendizado e na memória.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos dos inibidores globais de histona desacetilases TSA e NaB durante a formação e consolidação da memória de longa duração em ratos na tarefa de esquiva inibitória.

2.2 Objetivos Específicos

a) Testar se os HDACis TSA e NaB administrados intra-hipocampalmente em diferentes momentos durante a consolidação melhoram a retenção da memória da tarefa de esquiva inibitória.

b) Verificar se a atividade da região da amígdala basolateral é requerida para a melhora da retenção da memória da tarefa de esquiva inibitória após tratamento com HDACis administrados no hipocampo.

c) Testar se a administração I.P. de NaB imediatamente após o treino melhora a retenção da memória de ratos velhos na tarefa de esquiva inibitória.

d) Verificar se a inibição de receptores TrkB pelo antagonista ANA-12 no hipocampo prejudica a formação da memória da esquiva inibitória.

e) Testar se o tratamento com NaB 10 minutos antes do treino previne os efeitos do antagonismo de TrkB no hipocampo na formação da memória da esquiva inibitória.

3 ARTIGOS

3.1 ARTIGO DE DADOS – Regular Article

Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus.

Autores: Martina Blank; Arethuza S Dornelles; Aline Werenicz; Luciana A Velho; Diana F Pinto; Ana C Fedi; Nadja Schröder; Rafael Roesler

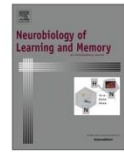
Periódico: Neurobiology of Learning and Memory

Status: Publicado. Volume 111, May 2014, Pages 1–8.



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynlme

Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus



Martina Blank^{a,b,c,d,1}, Arethusa S. Dornelles^{a,b,c,1}, Aline Werenicz^{a,b,c}, Luciana A. Velho^a, Diana F. Pinto^a, Ana Cláudia Fedi^a, Nadja Schröder^{c,e}, Rafael Roesler^{a,b,c,*}

^aLaboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^bCancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^cNational Institute for Translational Medicine, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^dCenter for Molecular Structural Biology, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^eNeurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2014
Revised 20 February 2014
Accepted 21 February 2014
Available online 28 February 2014

Keywords:

Histone deacetylase
Chromatin
Epigenetics
Amygdala
Hippocampus
Memory consolidation

ABSTRACT

Histone acetylation, a type of chromatin modification that allows increased gene transcription and can be pharmacologically promoted by histone deacetylase (HDAC) inhibitors (HDACis), has been consistently associated with promoting memory formation in the hippocampus. The basolateral nucleus of the amygdala (BLA) is a brain area crucially involved in enabling hormones and drugs to influence memory formation. Here, we show that BLA activity is required for memory enhancement by intrahippocampal administration of an HDACi. Two different HDACis, sodium butyrate (NaB) and trichostatin A (TSA), differentially enhanced the retention of memory for inhibitory avoidance (IA) when administered to the dorsal hippocampus after training. TSA showed a biphasic pattern of response during consolidation, in which infusions given immediately or 3 h after training produced memory enhancement, whereas no effect was observed when it was infused 1.5 or 6 h posttraining. Muscimol (MUS)-induced unilateral functional inactivation of the BLA prevented the enhancement of memory retention produced by post-training infusion of TSA into the ipsilateral hippocampus. TSA did not affect IA extinction or reconsolidation. These results indicate that HDACis can increase IA memory retention when given into the hippocampus, and, most importantly, BLA activity is necessary for enabling HDACi-induced influences on memory formation.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Gene expression associated with the formation of long-term memories is regulated by epigenetic processes that alter the chromatin state. Chromatin modifications allow for enduring alterations in the patterns of cell function without the need for changes in DNA sequence, thus constituting ideal candidate mechanisms mediating long-term alterations induced by learning (Gräff & Tsai, 2013). Among the several types of epigenetic phenomena that

occur in the brain and have been linked to memory formation, histone acetylation is the best studied (Barrett & Wood, 2008; Bridi & Abel, 2013; Gräff & Tsai, 2013; Levenson & Sweatt, 2005). Histones constitute the major protein component of chromatin, and acetylation of their lysine residues by histone acetyltransferases (HATs) disrupts the interaction between histone and DNA, resulting in a "relaxed" chromatin structure that allows increased gene readout. An opposing role is played by histone deacetylases (HDACs), which, by removing acetyl groups, promote chromatin condensation and repress gene transcription (Haberland, Montgomery, & Olson, 2009; Kouzarides, 2007; Li, Carey, & Workman, 2007).

HDAC types are divided into four groups: class I (HDAC1 – HDAC3 and HDAC8), class II (subdivided into class IIa, comprising HDAC4, HDAC5, HDAC7 and HDAC9, and class IIb, consisting of HDAC6 and HDAC10), class III (sirtuins), and class IV (HDAC11). All class I, II, and IV HDACs are expressed in neurons (Broide

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 33083121.

E-mail address: rafael.roesler@pq.cnpq.br (R. Roesler).

¹ These authors contributed equally to this work.

et al., 2007; Gräff & Tsai, 2013; Haberland et al., 2009). Formation of memory for contextual fear conditioning is accompanied by an increase in histone H3 acetylation in the CA1 area of the dorsal hippocampus (Levenson et al., 2004). Overexpression of HDAC2 in mice impairs memory and long-term potentiation (LTP) in the hippocampus, whereas knocking it out enhances memory (Guan et al., 2009), and HDAC3 deletion in the dorsal hippocampus enhances contextual fear (McQuown et al., 2011). HDAC2 content is increased in the CA1 hippocampal area in mouse models of neurodegeneration as well as in the brains from patients with Alzheimer's disease, and an epigenetic blockade of gene transcription mediated by HDAC2 was associated with memory dysfunction in experimental neurodegeneration models (Gräff et al., 2012).

The use of HDAC inhibitors (HDACis) is the most widely investigated pharmacological approach to produce memory enhancement through manipulating the epigenome. The HDACis most frequently used in memory experiments include sodium butyrate (NaB), trichostatin A (TSA), suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), and valproic acid (VPA). All these drugs inhibit preferentially class I HDACs, which are localized predominantly to the cell nucleus, and also act with lower activity on HDAC8. TSA and SAHA also inhibit HDAC6, the main cellular cytoplasmic deacetylase (Bhalla, 2005; Bolden, Peart, & Johnstone, 2006; Nott, Fass, Haggarty, & Tsai, 2013). TSA facilitates LTP in the CA1 hippocampal area (Vecsey et al., 2007) as well as in amygdala slices (Monsey, Ota, Akingbade, Hong, & Schafe, 2011). Systemic administration of NaB or VPA enhances fear memory formation and extinction (Bredy & Barad, 2008; Lattal, Barrett, & Wood, 2007; Levenson et al., 2004; Stafford, Raybuck, Ryabinin, & Lattal, 2012). Intrahippocampal administration of TSA immediately after training enhances long-term contextual fear memory (Vecsey et al., 2007), whereas NaB enhances fear extinction (Stafford et al., 2012) in mice. In addition to fear-motivated memory, studies using either systemic injections of NaB or posttraining intrahippocampal infusions of NaB, TSA, or the class I HDAC-selective inhibitor MS275 have found enhancement of long-term memory for specific types of object location or object recognition tasks in rats or mice (Haetig et al., 2011; Hawk, Florian, & Abel, 2011; Reolon et al., 2011; Roozendaal et al., 2010; Silva et al., 2012; Stefanko, Barrett, Ly, Reolon, & Wood, 2009).

Extensive evidence indicates that normal activity of the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) is required to mediate drug influences on memory consolidation for emotionally-arousing tasks (McGaugh, 2002; McGaugh, Cahill, & Roozendaal, 1996; McIntyre, McGaugh, & Williams, 2012; Roesler & McGaugh, 2010). Selective lesions, functional inactivation, or pharmacological inhibition of the BLA block the effects of systemically administered drugs and hormones on memory (Quirarte, Roozendaal, & McGaugh, 1997; Roesler et al., 2004; Roozendaal & McGaugh, 1996). The BLA is also required for enabling the memory-enhancing effects of drugs infused directly into the hippocampus or related brain areas. Experiments using inhibitory avoidance (IA) showed that BLA lesions or intra-BLA administration of a noradrenergic antagonist can prevent the enhancement produced by post-training intrahippocampal infusion of glucocorticoid receptor agonists on memory consolidation (Roozendaal & McGaugh, 1997; Roozendaal, Nguyen, Power, & McGaugh, 1999), and excitotoxic lesions of the BLA block the memory-enhancing effect of administration of the cAMP analog 8-Br-cAMP into the entorhinal cortex (Roesler, Roozendaal, & McGaugh, 2002). The functional interaction between the BLA and the hippocampus is restricted to the ipsilateral hemisphere. Thus, induction of hippocampal LTP is impaired by lesions of the ipsilateral BLA (Ikegaya, Saito, & Abe, 1994), and inhibition of the noradrenergic system in the ipsilateral, but not the contralateral, BLA blocks the memory-enhancing effects of a glucocorticoid receptor agonist infused into the

dorsal hippocampus (Roozendaal et al., 1999). In addition, expression of the immediate-early gene *Arc* in the dorsal hippocampus is increased by administration of the β -adrenoreceptor agonist clenbuterol into the ipsilateral BLA.

Also, the BLA–hippocampal interaction seems to be specific to the dorsal part of the hippocampus, since intra-BLA clenbuterol does not affect *Arc* expression in the ventral hippocampus (McIntyre et al., 2005). It is possible that the nucleus accumbens (NAc) is a critical site of convergence between the BLA and the dorsal hippocampus. The BLA projects directly to the NAc via the stria terminalis (ST), and the NAc in turn also receives direct projections from the hippocampus. Lesioning either the ST or the NAc blocks the memory enhancement induced by administration of a glucocorticoid receptor agonist into the BLA or the dorsal hippocampus (Roozendaal, de Quervain, Ferry, Setlow, & McGaugh, 2001).

Although the effects of HDACis on memory have been increasingly investigated, little is known about the time course of HDACi enhancement of consolidation. In addition, previous studies have not verified whether the BLA influences the actions of HDACis given into other brain areas. In the present study, we describe the effects of administering NaB and TSA to the dorsal hippocampus on the consolidation of memory for IA, and examine the requirement of intact BLA activity in mediating the memory-enhancing effect of TSA.

2. Methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (280–320 g at time of surgery) were obtained from the institutional breeding facility (CREAL, ICBS, UFRGS) and maintained at the university hospital experimental animal facility (UEA, CPE-HCPA). Animals were housed five per cage in plastic cages with sawdust bedding, and maintained on a 12 h light/dark cycle at a room temperature of 22 ± 1 °C. The rats were allowed ad libitum access to standardized pellet food and water. All experiments took place during the light phase of the cycle, between 8 AM and 4 PM. All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Guideline for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI; http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/j226494.pdf) and were approved by the institutional animal care committee under protocol number 120068.

2.2. Surgery

Animals were implanted under anesthesia with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (25 mg/kg) with either unilateral (left hemisphere) or bilateral 8.0-mm, 23-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus, or unilateral (left hemisphere) 14-mm 23-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the BLA, as described in previous reports (Jobim et al., 2012; Roesler et al., 2004; Roesler et al., 2006). Coordinates (BLA, anteroposterior, -2.8 mm from bregma, mediolateral, ± 4.8 mm from bregma, ventral, -7.5 mm from skull surface; DH anteroposterior, -4.3 mm from bregma; mediolateral, ± 3.0 mm from bregma; ventral, -2.0 mm from skull surface) were obtained from the atlas of Paxinos and Watson (2007). Animals were allowed to recover at least 7 days after surgery.

2.3. Intrahippocampal infusions and BLA inactivation

The general procedures for intrahippocampal infusions were as described in previous reports (Jobim et al., 2012; Roesler et al., 2006). At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was

fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at either the BLA or the dorsal hippocampus. Drug or its respective control solution (saline or vehicle) was infused during a 30-s period. The infusion needle was left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the needle tip.

In experiments examining the effect of intrahippocampal administration of HDACis on memory consolidation, rats received a bilateral 1.0- μ l infusion of NaB (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA; 55, 100, or 250 mM) dissolved in saline (SAL, 0.9% NaCl), or TSA (Sigma–Aldrich; 22 mM) dissolved in 50% ethanol in saline (vehicle, VEH; Vecsey et al., 2007), into the hippocampus immediately after training. Control animals received SAL in experiments using NaB and VEH in experiments using TSA. In the experiment examining the possible effects of TSA on reconsolidation or extinction, animals were given a bilateral 1.0- μ l infusion of TSA (22 mM) or VEH immediately after the first test trial. In the experiment focusing on the possible BLA requirement for TSA-induced memory enhancement, unilateral functional inactivation of the left BLA was carried out as previously described (Roesler et al., 2004) by giving rats a unilateral 0.5- μ l infusion of the γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor agonist muscimol (MUS) (0.5 μ g) (Sigma–Aldrich) dissolved in SAL into the left BLA 5 min before training. Control animals received an infusion of SAL. Immediately after training, the same animals were given a unilateral 1.0- μ l infusion of VEH or TSA (22 mM) into the left dorsal hippocampus. In all experiments, drug dose ranges and appropriate vehicles were chosen on the basis of previous studies (Hawk et al., 2011; Lattal et al., 2007; Roozendaal et al., 2010; Stafford et al., 2012; Vecsey et al., 2007). Drug solutions were freshly prepared before each experiment.

2.4. Inhibitory avoidance (IA)

Single-trial step-down IA is an established model of fear-motivated conditioning. In this task, animals learn to associate a location in the training apparatus (a grid floor) with an aversive stimulus (footshock). The general procedures for IA behavioral training and retention test were described in previous reports (Jobim et al., 2012; Roesler et al., 2004; Roesler et al., 2006). The IA training apparatus was a 50 × 25 × 25-cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm wide, 2.5-cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall.

On training trials, rats were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with a digital chronometer. Immediately after stepping down on the grid, rats received a 0.4-mA, 3.0-s footshock and were removed from the apparatus immediately afterwards. Retention test trials took place at different intervals after training by placing the rats on the platform and recording their latencies to step down (see Section 3 for detailed procedures for each experiment). Depending on the experiment, rats were given up to six test trials. No footshock was presented during retention test trials. In the experiment examining possible drug effects on reconsolidation, rats that did not step down to the grid floor within 300 s during the 24-h test trial (“reactivation session”) were gently led by experimenter to the grid floor. Step-down latencies on the retention test trial (maximum 300 s) were used as a measure of IA memory retention. In some of the experiments, at the end of series of test trials, rats were given a 0.3-mA reminder footshock (Tronel & Alberini, 2007), followed by a retention test 24 h later.

2.5. Histology

Twenty-four to 72 h after behavioral testing, a 1.0- or 0.5- μ l infusion of a 4% methylene blue solution was given into the dorsal

hippocampus or BLA respectively. Rats were killed by decapitation 15 min later, and their brains were removed and stored in 10% formalin for at least 72 h. The brains were sectioned and examined for cannulae placements. The extension of the methylene blue dye was taken as indicative of diffusion of the drugs previously given to each rat, as previously described (Jobim et al., 2012; Roesler et al., 2004; Roesler et al., 2006). Rats with incorrect cannula placements were excluded from the analysis.

2.6. Statistics

Data are shown as mean + S.E.M. retention test latencies to step-down (s). Comparisons of training and retention test step-down latencies between control and drug-treated groups were performed using Kruskal–Wallis analysis of variance and Mann–Whitney *U* tests, two-tailed (Jobim et al., 2012; Roesler et al., 2004; Roesler et al., 2006). In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. Enhancement of IA memory consolidation by posttraining administration of NaB into the dorsal hippocampus

The first experiment examined the effect of posttraining intrahippocampal administration of NaB on the retention of IA memory. Rats were given IA training followed by an infusion of SAL ($N = 10$) or NaB (55 mM, $N = 10$; 100 mM, $N = 10$; or 250 mM, $N = 8$) into the CA1 hippocampal area immediately after training. All rats were tested for retention 1 (Test 1), 2 (Test 2), 3 (Test 3), and 4 (Test 4) days after training. Based on the results showing that only the highest dose (250 mM) of NaB produced a significant effect, rats treated with this dose were given additional test trials at 11 (Test 5), and 21 (Test 6) days after training. Immediately after Test 6, rats were given a reminder footshock and tested again 1 day later.

Results are shown in Fig. 1. There were significant differences between SAL-treated rats and rats given NaB at 250 mM in Test 1 ($p < 0.01$), Test 2 ($p < 0.05$), and Test 3 ($p < 0.01$), but not in the other behavioral trials. There were no significant differences between the SAL group and groups given NaB at 55 or 100 mM. There was a decline in retention levels across test trials, and both groups displayed similarly high latencies when tested after a reminder shock. The results indicate that NaB at the highest dose used produced an enhancement of IA memory retention that persisted for 3 days.

3.2. Time course of consolidation enhancement by intrahippocampal administration of TSA

Next, we aimed to compare the effects of posttraining NaB with those of TSA. Rats were trained as described above and given an infusion of VEH ($N = 11$) or TSA (22 mM, $N = 13$) into the hippocampus immediately after training. Retention tests were carried out 1 (Test 1), 2 (Test 2), 3 (Test 3), 4 (Test 4), 11 (Test 5), and 21 (Test 6) days after training. Immediately after Test 6, animals received a reminder footshock and were tested again 1 day later. There were significant differences between rats given VEH and TSA in Test 1 ($p < 0.05$), Test 2 ($p < 0.01$), Test 3 ($p < 0.01$), Test 4 ($p < 0.05$), and Test 5 ($p < 0.05$), but not in other behavioral trials. As in the previous experiment, one can observe a reduction in retention levels across test trials, and both groups displayed high latencies when tested after a reminder shock (Fig. 2A). The results indicate that TSA administration resulted in significant enhancement of IA memory retention that lasted for 11 days.

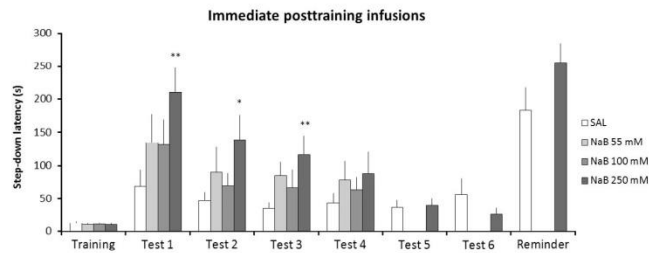


Fig. 1. Administration of NaB into the hippocampus enhances long-term retention of IA memory. Rats were trained and given an infusion of SAL ($N = 10$) or NaB (55 mM, $N = 10$; 100 mM, $N = 10$; or 250 mM, $N = 8$) into the CA1 hippocampal area immediately after training. All rats were tested for retention 1 (Test 1), 2 (Test 2), 3 (Test 3), and 4 (Test 4) days after training. Animals treated with 250 mM NaB were given additional test trials at 11 (Test 5), and 21 (Test 6) days after training. Immediately after Test 6, rats were given a reminder footshock and tested again 1 day later. Data are mean + S.E.M. retention test latencies to step-down (s); * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to SAL-treated rats.

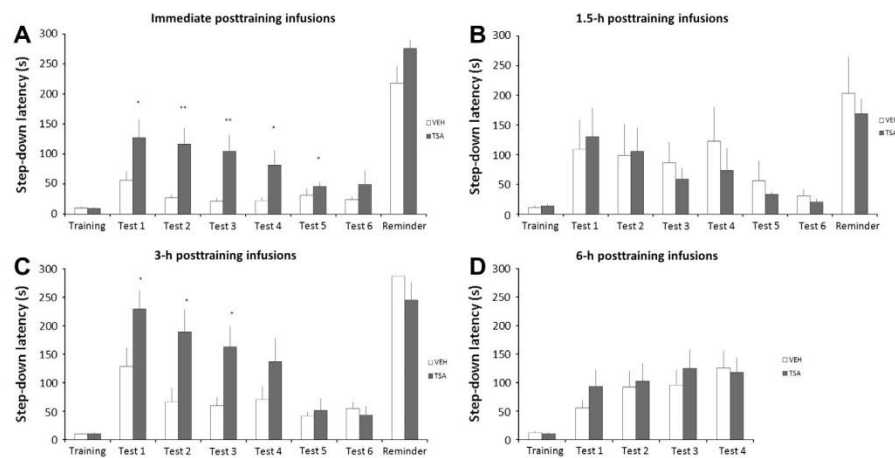


Fig. 2. Biphasic enhancement of long-term memory for IA by intrahippocampal administration of TSA. (A) Rats were given IA training followed by an infusion of VEH ($N = 11$) or TSA (22 mM, $N = 13$) into the hippocampus. Retention was tested 1 (Test 1), 2 (Test 2), 3 (Test 3), 4 (Test 4), 11 (Test 5), and 21 (Test 6) days after training. Immediately after Test 6, animals received a reminder footshock and were tested again 1 day later. (B) Rats were trained and tested as described above, but infusion of VEH or TSA (22 mM, $N = 7$ rats per group) was given 1.5 h after training. (C) Rats were trained and tested as above, but infusion of VEH or TSA (22 mM, $N = 9$ rats per group) was given 3 h after training; (D) VEH or TSA ($N = 11$ rats per group) was infused 6 h after training, and retention was tested 1 (Test 1), 2 (Test 2), 3 (Test 3), and 4 (Test 4) days later. Data are mean + S.E.M. retention test latencies to step-down (s); * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to VEH-treated rats.

For all subsequent experiments, TSA was chosen as the HDACi of use. When rats were trained and tested as above, but TSA was infused 1.5 h after training, no significant effect of TSA was observed (Fig. 2B; $N = 7$ rats per group). In contrast, an infusion given 3 h after training produced significantly enhanced retention in Tests 1, 2, and 3 ($N = 9$ rats per group; all $ps < 0.05$) (Fig. 2C). Finally, TSA infusions given 6 h posttraining had no significant effect on memory tested up to 4 days after training (Fig. 2D; $N = 11$ rats per group). Due to the clear lack of drug effect, rats in this experiment were no further tested (see Figs. 3 and 4)

3.3. Functional inactivation of the BLA prevents memory enhancement by intrahippocampal TSA administration

We then examined whether a functionally active BLA was required for intrahippocampal TSA to enhance memory. Rats were given a unilateral infusion of SAL or MUS into the left BLA before IA training, and a unilateral infusion of VEH or TSA into the hippocampus immediately after training as described in Section 2. The

resulting experimental groups were SAL/VEH ($N = 11$); SAL/TSA ($N = 15$); MUS/VEH ($N = 11$); and MUS/TSA ($N = 11$). A retention test trial was carried out 24 h later. TSA administration induced a significant enhancement of retention ($p < 0.001$) in rats given intra-BLA SAL, whereas animals infused with MUS showed retention levels that did not differ from those in the control group, regardless of whether they received intrahippocampal VEH or TSA after training (Fig. 3). These results indicate that MUS-induced BLA inhibition prevented the TSA enhancement of IA retention.

3.4. Post-retrieval administration of TSA into the hippocampus does not affect IA memory

In order to verify whether TSA would affect processes related to extinction or reconsolidation, rats were trained and tested for retention 1 day later (Test 1). Immediately after Test 1, an infusion of VEH ($N = 14$) or TSA ($N = 11$) was given into the hippocampus. Retention was tested again 1 day after the infusion (Test 2). There

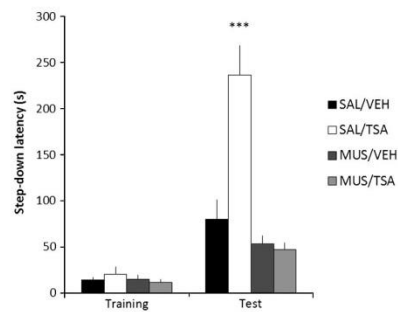


Fig. 3. Memory enhancement induced by TSA administration into the hippocampus requires the BLA. Rats were given a unilateral infusion of SAL or MUS (0.5 μ g) into the left BLA before IA training, and a unilateral infusion of VEH or TSA (22 mM) into the hippocampus immediately after training (SAL/VEH, $N = 11$; SAL/TSA, $N = 15$; MUS/VEH, $N = 11$; MUS/TSA, $N = 11$). Retention was tested 24 h later. Data are mean \pm S.E.M. retention test latencies to step-down (s); *** $p < 0.001$ compared to SAL/VEH controls.

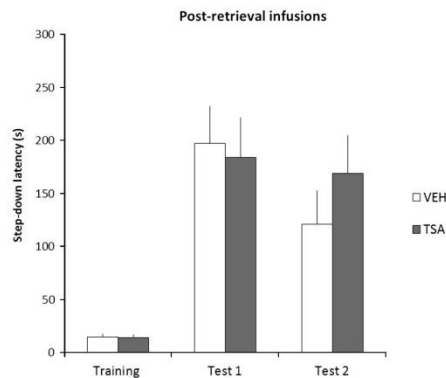


Fig. 4. Administration of TSA into the hippocampus does not affect IA memory when given after retrieval. Rats were trained and given a retention test trial 1 day later (Test 1). Immediately after Test 1, VEH ($N = 14$) or TSA (22 mM; $N = 11$) was infused into the hippocampus. Retention was tested again 1 day after the infusion (Test 2). Data are mean \pm S.E.M. retention test latencies to step-down (s). There were no significant differences between groups.

were no significant differences between groups, indicating that TSA given after retrieval did not affect IA memory Fig. 4.

3.5. Histology

All animals included in the final analysis (189 rats) had cannula placed in the intended sites. Fig. 5 shows schematic drawings of the diffusion of methylene blue, which indicates infusion placements and spread of drug infusions, within the dorsal hippocampus and BLA.

4. Discussion

The novel findings reported here can be summarized as follows: (1) administration of the HDACis, NaB or TSA, into the dorsal hippocampus immediately after training enhanced retention of memory for IA; (2) The enhancement induced by TSA showed a biphasic temporal pattern during consolidation, in which memory retention

was significantly enhanced by infusions given immediately after or 3 h after training, but not when the drug was administered 1.5 or 6 h after training; (3) The enhancing effect of TSA infused unilaterally into the dorsal hippocampus was completely prevented by MUS-induced functional inactivation of the ipsilateral BLA; and (4) TSA given immediately after retrieval did not affect retention of IA memory.

Perhaps the most important finding of the present study was that functional inactivation of the BLA blocked the memory-enhancing effect of intrahippocampal TSA (Fig. 6). As previously shown (Roesler et al., 2004), unilateral inhibition of the left BLA induced by a high dose of MUS before training did not significantly affect IA memory retention per se, but could prevent the effect of another pharmacological intervention on memory consolidation. This is strongly consistent with the view that the BLA has a general and critical role as a brain area required to enable the influence of endogenous hormones, as well as of systemic or localized administration of drugs, on memory consolidation (McGaugh, 2002; McGaugh et al., 1996; McIntyre et al., 2012). The present findings provide the first evidence indicating that this view should be extended to encompass epigenetic modulators, such as HDACis, as agents that require BLA activity in order to be able to influence memory in other brain areas.

Previous studies have indicated that HDACis can enhance memory formation or extinction by increasing the acetylation of specific histone residues, such as histone 3 lysine residues 9 and 14 (H3K9/14), resulting in enhanced expression of genes related to synaptic plasticity and memory (Gräff & Tsai, 2013). Facilitation of hippocampal memory and LTP by HDACis was shown to involve transcriptional activation mediated by cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP). Probably through this mechanism, TSA administration into the mouse hippocampus results in a selective and transient increase in the expression of genes related to synaptic plasticity and contextual fear, including *Nr4a1*, *Nr4a2*, and *NGFI-B* (nerve growth factor inducible-B) (Vecsey et al., 2007). A recent seminal study showed that, in hippocampal extracts from mice given extinction training, systemic administration of the selective inhibitor of class I HDACs, CI-994, was associated with the differential expression of 475 genes between controls and CI-994-treated animals. Genes involved in hippocampal memory shown to be upregulated in response to CI-994 paired with extinction training included *Arc*, *cFos*, *Npas4*, and *Igf2*. These changes were accompanied by increased glucose utilization, facilitated LTP, enhanced dendritic branching, and an increase in the number of dendritic spines, in the hippocampi of mice given CI-994 (Gräff et al., 2014).

The discussion on candidate mechanisms mediating the memory-enhancing effects of HDACis is further complicated because histones are not the only molecular targets of HDACis, which can also display activities independent of histone regulation of gene expression. For instance, transcription factors including E2F1, STAT1, STAT3, and NF- κ B might be directly hyperacetylated by HDACis (Bolden et al., 2006; Glozak, Sengupta, Zhang, & Seto, 2005; Johnstone & Licht, 2003), and in vitro experiments using brain tumor cells have indicated that TSA may influence protein kinase signaling through an acetylation-independent mechanism involving a disruption of HDAC-protein phosphatase 1 (PP1) complexes (Chen, Weng, Tseng, Lin, & Chen, 2005). The possibility that HDACi induce effects directly on signaling pathways in the cytoplasm is particularly relevant for studies using TSA, which inhibits HDAC6, a predominantly cytoplasmic histone deacetylase, which likely has several mechanisms of action independent of alterations in gene expression mediated by increased histone acetylation (Chen et al., 2005; Glozak et al., 2005; Johnstone & Licht, 2003).

In this regard, it is interesting to speculate on the mechanisms underlying our somewhat surprising finding that the time course

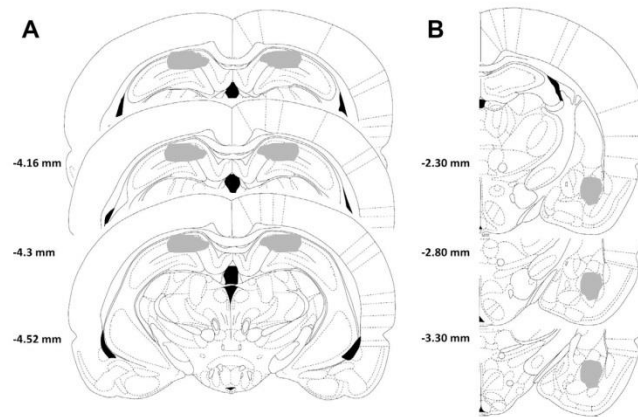


Fig. 5. Infusion placements into the hippocampus and BLA. Schematic diagrams of coronal sections of the rat brain, adapted from the atlas of Paxinos and Watson (2007), depicting the diffusion of methylene blue in the (A) dorsal hippocampus and (B) left BLA for rats included in the statistical analysis.

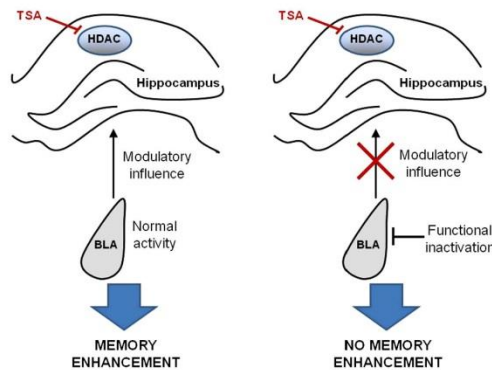


Fig. 6. A model of BLA requirement for HDACi-induced memory enhancement in the hippocampus. Normal BLA activity may be necessary to enable the influence of drugs acting on HDACs on memory consolidation. Muscimol-induced functional inactivation of the BLA prevents the memory-enhancing effect of intrahippocampal administration of TSA after training.

of memory enhancement by posttraining administration of TSA showed a biphasic pattern, in which the effect was observed with infusions given shortly after training or 3 h later, but not at an intermediate time point. These findings support evidence from a previous study, which used the context-signal memory task in the *Chasmagnathus granulatus* crab to examine the time course of histone acetylation and HDACi effects during memory consolidation. The authors found that NaB injections resulted in memory enhancement when given immediately or 6 h posttraining, but not at 3 or 12 h after training, which is consistent with the two phases of PKA activity involved in consolidation in crabs (Federman, Fustiñana, & Romano, 2009). In rats, similar patterns of two waves of drug effects in the hippocampus during consolidation of IA memory have previously been observed in experiments using a protein synthesis inhibitor (Quevedo et al., 1999) or drugs acting on the cAMP/protein kinase A (PKA)/CREB signaling pathway (Bevilaqua et al., 1997). These effects are consistent with the well-established requirement of two waves of protein synthesis

and PKA activity in the hippocampus for memory formation (Abel et al., 1997; Alberini, 2009; Kandel, 2012). However, the mechanisms and time course of action of HDACis do not necessarily predict that their effects should display a similar two-phase pattern. Histone H3 acetylation in the mouse hippocampus was found to be significantly increased 4 h after intrahippocampal TSA administration (Vecsey et al., 2007), making it unexpected that TSA infusions separated by short time intervals could produce markedly different effects, as was the case in our experiment. On the other hand, some effects of TSA seem to be more transient. Thus, the expression of *Nr4a1* was significantly increased 2 h after TSA infusion and fear conditioning, but returned to normal levels by 4 h after conditioning (Vecsey et al., 2007). It is possible that extra-epigenetic effects of TSA, such as interactions with proteins involved in cell signaling in the cytoplasm (Chen et al., 2005; Glozak et al., 2005), rather than long-lasting alterations in gene expression, are predominantly involved in the TSA influences on consolidation. In addition, TSA might be more effective in modulating consolidation when its administration coincides with the waves of activation of protein synthesis and PKA activity in the hippocampus. Although detailing the mechanisms underlying the effects of TSA infusion given at different time points after learning falls out of the scope of the present study, future experiments should confirm and further explore the observed biphasic pattern for the effects of TSA infusions given during consolidation.

Another aspect of our findings was related to the persistence of memory enhancement by HDACis, which is consistent with previous evidence indicating that increased acetylation induced by HDACis is a molecular feature of stronger and more persistent memories (Federman et al., 2009). Compared to controls, rats given NaB shortly after training, or TSA 3 h posttraining, showed significantly enhanced retention for 3 days, whereas in rats given TSA immediately after training the effect persisted for 11 days. However, for both drugs, memory retention eventually returned back to basal levels in a relatively short period of time. It should be pointed out, however, that a proper evaluation of the effects of HDACis on memory persistence would require experiments using different animals tested at different time points, as well as dose-response curves for all the drugs used. In step-down IA, repeated exposure to test trials in the absence of footshock exposure usually results in memory extinction, which can be influenced by drugs given upon retrieval (Vianna, Szapiro, McGaugh, Medina, &

Izquierdo, 2001). Although in our experiments the drugs had an effect when given after training and not after retrieval, it cannot be ruled out that the decline in memory retention across multiple retention test trials was influenced by a differential processing of extinction in rats given posttraining HDACis compared to controls.

When TSA was infused after retrieval (i.e., post-first retention test) no significant alteration in IA memory retention tested 1 day later was observed. This is in contrast with previous reports showing that systemic or intrahippocampal administration of HDACis after retrieval can accelerate extinction of different types of conditioning (Bredy & Barad, 2008; Fujita et al., 2012; Gräff et al., 2014; Itzhak, Anderson, Kelley, & Petkov, 2012; Lattal & Wood, 2013; Lattal et al., 2007; Malvaez, Sanchis-Segura, Vo, Lattal, & Wood, 2010; Malvaez et al., 2013; Raybuck, McCleery, Cunningham, Wood, & Lattal, 2013; Stafford et al., 2012; Wang, Zhang, Qing, Liu, & Yang, 2010). Moreover, overexpression of HDAC1 in the mouse hippocampus (Bahari-Javan et al., 2012) or knockout of the HDAC2 gene in postmitotic forebrain neurons (Morris, Mahgoub, Na, Pranav, & Monteggia, 2013) predominantly affects extinction. Other studies have shown that HDACis administered systemically or into the amygdala around retrieval can lead to memory enhancement, an effect that has been interpreted as a facilitation of reconsolidation-like processes (Bredy & Barad, 2008; Maddox & Schafe, 2011). Although pharmacological manipulation of the dorsal hippocampus after retrieval, using protocols similar to the one used in the present study, is capable of affecting both extinction and reconsolidation of IA memory (Jobim et al., 2012; Luft et al., 2006; Vianna et al., 2001), it remains unclear which specific experimental parameters and boundaries determine the outcome of post-retrieval interventions in IA. Further experiments exploring different training, testing, and drug administration conditions are required to establish whether HDACis can influence retrieval-dependent memory modifications in this task.

In summary, here we show that the enhancement of IA memory consolidation produced by administration of an HDACi into the dorsal hippocampus depends on a functionally intact BLA. This is the first evidence indicating a critical role of the BLA in enabling memory enhancement by manipulation of epigenetic mechanisms in another brain area.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Grant numbers 484185/2012-8 and 303276/2013-4 to R.R.); PNPD CAPES/HCPA 0130110 (to R.R. and A.S.D.); the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM); and the HCPA institutional research fund (FIPE/HCPA). The funding sources had no role in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the paper for publication.

References

- Abel, T., Nguyen, P. V., Barad, M., Deuel, T. A., Kandel, E. R., & Bourchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*, *88*, 615–626.
- Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, *89*, 121–145.
- Bahari-Javan, S., Maddalena, A., Kerimoglu, C., Wittnam, J., Held, T., Bähr, M., et al. (2012). HDAC1 regulates fear extinction in mice. *Journal of Neuroscience*, *32*, 5062–5073.
- Barrett, R. M., & Wood, M. A. (2008). Beyond transcription factors: The role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learning & Memory*, *15*, 460–467.
- Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Schröder, N., Bromberg, E., Schmitz, P. K., Schaeffer, E., et al. (1997). Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signalling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. *Behavioural Pharmacology*, *8*, 331–338.
- Bhalla, K. N. (2005). Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, *23*, 3971–3993.
- Bolden, J. E., Peart, M. J., & Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*, 769–784.
- Bredy, T. W., & Barad, M. (2008). The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learning & Memory*, *15*, 39–45.
- Bridi, M., & Abel, T. (2013). Histone modifications in the nervous system and neuropsychiatric disorders. In J. D. Sweatt, M. J. Meaney, E. J. Nestler, & S. Akbarian (Eds.), *Epigenetic regulation in the nervous system: Basic mechanisms and clinical impact* (pp. 35–67). London: Elsevier.
- Broide, R. S., Redwine, J. M., Aftahi, N., Young, W., Bloom, F. E., & Winrow, C. J. (2007). Distribution of histone deacetylases 1–11 in the rat brain. *Journal of Molecular Neuroscience*, *31*, 47–58.
- Chen, C. S., Weng, S. C., Tseng, P. H., Lin, H. P., & Chen, C. S. (2005). Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. *Journal of Biological Chemistry*, *280*, 38879–38887.
- Federman, N., Fustiñana, M. S., & Romano, A. (2009). Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. *Learning and Memory*, *16*, 600–606.
- Fujita, Y., Morinobu, S., Takei, S., Fuchikami, M., Matsumoto, T., Yamamoto, S., et al. (2012). Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, facilitates fear extinction and enhances expression of the hippocampal NR2B-containing NMDA receptor gene. *Journal of Psychiatric Research*, *46*, 635–643.
- Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X., & Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, *363*, 15–23.
- Gräff, J., Joseph, N. F., Horn, M. E., Samiei, A., Meng, J., Seo, J., et al. (2014). Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell*, *156*, 261–276.
- Gräff, J., Rei, D., Guan, J. S., Wang, W. Y., Seo, J., Hennig, K. M., et al. (2012). An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*, *483*, 222–226.
- Gräff, J., & Tsai, L. H. (2013). Histone acetylation: Molecular mnemonics on the chromatin. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*, 97–111.
- Guan, J. S., Haggarty, S. J., Giacometti, E., Dannenberg, J. H., Joseph, N., Gao, J., et al. (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*, *459*, 55–60.
- Haberland, M., Montgomery, R. L., & Olson, E. N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: Implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics*, *10*, 32–42.
- Haettig, J., Stefanko, D. P., Multani, M. L., Figueroa, D. X., McQuown, S. C., & Wood, M. A. (2011). HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learning & Memory*, *18*, 71–79.
- Hawk, J. D., Florian, C., & Abel, T. (2011). Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. *Learning & Memory*, *18*, 367–370.
- Ikegaya, Y., Saito, H., & Abe, K. (1994). Attenuated hippocampal long-term potentiation in basolateral amygdala-lesioned rats. *Brain Research*, *656*, 157–164.
- Itzhak, Y., Anderson, K. L., Kelley, J. B., & Petkov, M. (2012). Histone acetylation rescues contextual fear conditioning in nNOS KO mice and accelerates extinction of cued fear conditioning in wild type mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *97*, 409–417.
- Jobim, P. F., Pedrosa, T. R., Christoff, R. R., Werenicz, A., Maurmann, N., Reolon, G. K., et al. (2012). Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *97*, 105–112.
- Johnstone, R. W., & Licht, J. D. (2003). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: Is transcription the primary target? *Cancer Cell*, *4*, 13–18.
- Kandel, E. R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and C/EBP. *Molecular Brain*, *5*, 14.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*, 693–705.
- Lattal, K. M., Barrett, R. M., & Wood, M. A. (2007). Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behavioral Neuroscience*, *121*, 1125–1131.
- Lattal, K. M., & Wood, M. A. (2013). Epigenetics and persistent memory: Implications for reconsolidation and silent extinction beyond the zero. *Nature Neuroscience*, *16*, 124–129.
- Levenson, J. M., O’Riordan, K. J., Brown, K. D., Trinh, M. A., Molfese, D. L., & Sweatt, J. D. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 40545–40559.
- Levenson, J. M., & Sweatt, J. D. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*, 108–118.
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, *128*, 707–719.
- Luft, T., Flores, D. G., Vianna, M. R., Schwartsmann, G., Roesler, R., & Izquierdo, I. (2006). A role for hippocampal gastrin-releasing peptide receptors in extinction of aversive memory. *NeuroReport*, *17*, 935–939.
- Maddox, S. A., & Schafe, G. E. (2011). Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory. *Learning and Memory*, *18*, 579–593.
- Malvaez, M., McQuown, S. C., Rogge, G. A., Astarabadi, M., Jacques, V., Carreiro, S., et al. (2013). HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking

- behavior in a persistent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 110, 2647–2652.
- Malvaez, M., Sanchis-Segura, C., Vo, D., Lattal, K. M., & Wood, M. A. (2010). Modulation of chromatin modification facilitates extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Biological Psychiatry*, 67, 36–43.
- McGaugh, J. L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: A systems perspective. *Trends in Neurosciences*, 25, 456–461.
- McGaugh, J. L., Cahill, L., & Roozendaal, B. (1996). Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 93, 13508–13514.
- McIntyre, C. K., McGaugh, J. L., & Williams, C. L. (2012). Interacting brain systems modulate memory consolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 1750–1762.
- McIntyre, C. K., Miyashita, T., Setlow, B., Marjon, K. D., Steward, O., Guzowski, J. F., et al. (2005). Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 102, 10718–10723.
- McQuown, S. C., Barrett, R. M., Matheos, D. P., Post, R. J., Rogge, G. A., Alenghat, T., et al. (2011). HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *Journal of Neuroscience*, 31, 764–774.
- Monsey, M. S., Ota, K. T., Akingbade, I. F., Hong, E. S., & Schafe, G. E. (2011). Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PLoS ONE*, 6, e19958.
- Morris, M. J., Mahgoub, M., Na, E. S., Pranav, H., & Monteggia, L. M. (2013). Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. *Journal of Neuroscience*, 33, 6401–6411.
- Nott, A., Fass, D. M., Haggarty, S. J., & Tsai, L. H. (2013). HDAC inhibitors as novel therapeutics in aging and Alzheimer's disease. In J. D. Sweatt, M. J. Meaney, E. J. Nestler, & S. Akbarian (Eds.), *Epigenetic regulation in the nervous system: Basic mechanisms and clinical impact* (pp. 225–248). London: Elsevier.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). San Diego: Academic Press.
- Quevedo, J., Vianna, M. R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., & Rose, S. P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: Protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learning & Memory*, 6, 600–607.
- Quirarte, G. L., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 94, 14048–14053.
- Raybuck, J. D., McCleery, E. J., Cunningham, C. L., Wood, M. A., & Lattal, K. M. (2013). The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate modulates acquisition and extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 106, 109–116.
- Reolon, G. K., Maurmann, N., Werenicz, A., Garcia, V. A., Schröder, N., Wood, M. A., et al. (2011). Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behavioural Brain Research*, 221, 329–332.
- Roesler, R., Lessa, D., Venturilla, R., Vianna, M. R., Luft, T., Henriques, J. A., et al. (2004). Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, 19, 1041–1045.
- Roesler, R., Luft, T., Oliveira, S. H., Farias, C. B., Almeida, V. R., Quevedo, J., et al. (2006). Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 51, 350–357.
- Roesler, R., & McGaugh, J. L. (2010). Memory consolidation. In G. F. Koob, M. Le Moal, & R. F. Thompson (Eds.), *Encyclopedia of behavioral neuroscience* (vol. 2, pp. 206–214). Oxford: Academic Press.
- Roesler, R., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2002). Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training. *European Journal of Neuroscience*, 15, 905–910.
- Roozendaal, B., de Quervain, D. J., Ferry, B., Setlow, B., & McGaugh, J. L. (2001). Basolateral amygdala–nucleus accumbens interactions in mediating glucocorticoid enhancement of memory consolidation. *Journal of Neuroscience*, 21, 2518–2525.
- Roozendaal, B., Hernandez, A., Cabrera, S. M., Hagewoud, R., Malvaez, M., Stefanko, D. P., et al. (2010). Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *Journal of Neuroscience*, 30, 5037–5046.
- Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1996). Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65, 1–8.
- Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *European Journal of Neuroscience*, 9, 76–83.
- Roozendaal, B., Nguyen, B. T., Power, A. E., & McGaugh, J. L. (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 96, 11642–11647.
- Silva, P. F., Garcia, V. A., Dornelles, A. S., Silva, V. K., Maurmann, N., Portal, B. C., et al. (2012). Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. *Neuroscience*, 200, 42–49.
- Stafford, J. M., Raybuck, J. D., Ryabinin, A. E., & Lattal, K. M. (2012). Increasing histone acetylation in the hippocampus–infralimbic network enhances fear extinction. *Biological Psychiatry*, 72, 25–33.
- Stefanko, D. P., Barrett, R. M., Ly, A. R., Reolon, G. K., & Wood, M. A. (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 106, 9447–9452.
- Tronel, S., & Alberini, C. M. (2007). Persistent disruption of a traumatic memory by postretrieval inactivation of glucocorticoid receptors in the amygdala. *Biological Psychiatry*, 62, 33–39.
- Vecsey, C. G., Hawk, J. D., Lattal, K. M., Stein, J. M., Fabian, S. A., Attner, M. A., et al. (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation. *Journal of Neuroscience*, 27, 6128–6140.
- Vianna, M. R., Szapiro, G., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 98, 12251–12254.
- Wang, R., Zhang, Y., Qing, H., Liu, M., & Yang, P. (2010). The extinction of morphine-induced conditioned place preference by histone deacetylase inhibition. *Neuroscience Letters*, 483, 137–142.

3.2 ARTIGO DE DADOS – *Research article*

Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats.

Autores: Martina Blank; Aline Werenicz; Luciana A Velho; Diana F Pinto; Ana C Fedi; Mark W Lopes; Tanara V Peres; Rodrigo B Leal; Arethuza S Dornelles; Rafael Roesler.

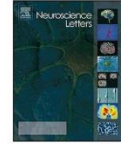
Periódico: Neuroscience Letters

Status: Publicado. Volume 594, 6 May 2015, pages 76-81.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Research article

Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats



Martina Blank^{a,b,c,*}, Aline Werenicz^{a,c}, Luciana Azevedo Velho^a, Diana F. Pinto^a, Ana Cláudia Fedi^a, Mark William Lopes^d, Tanara Vieira Peres^d, Rodrigo Bairy Leal^d, Arethusa S. Dornelles^{a,c}, Rafael Roesler^{a,b,c}

^a Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Cancer and Neurobiology Laboratory, University Hospital Experimental Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul 90035-003 Porto Alegre, Brazil

^c National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, Brazil

^d Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brazil

HIGHLIGHTS

- Sodium butyrate produced memory enhancement and persistence in aged rats.
- Memory formation in younger rats was not affected by sodium butyrate.
- Aged rats with normal memory might be particularly sensitive to sodium butyrate.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2015

Received in revised form 26 March 2015

Accepted 27 March 2015

Available online 30 March 2015

Keywords:

Sodium butyrate
Histone deacetylase
Inhibitory avoidance
Epigenetics
Memory consolidation

ABSTRACT

Here we show that a systemic injection of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) sodium butyrate (NaB) immediately after training in a step-down inhibitory avoidance task produced an enhancement of memory consolidation that persisted across consecutive retention tests during 14 days in aged rats, while it did not significantly affect memory in young adults. Control aged and young adult rats showed comparable basal levels of memory retention. Our results suggest that HDACis can display memory-enhancing effects specific for aged animals, even in the absence of age-related memory impairment.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Over the last decade, several studies have demonstrated that transcriptional regulation involved in the formation of long-term memories (LTM) needs the synchronized interaction of several transcription factors and transcriptional co-activators in the chromatin structure [1,2]. It is well established that epigenetic mechanisms, such as histone acetylation, orchestrate molecular events during LTM formation by relaxing or condensing the chro-

matin structure altering gene transcription [3]. Proteins named histone acetyltransferases (HATs) add acetyl groups to lysine residues of histones and are responsible for the modulation of the histone-DNA interactions. The chromatin structure relaxation leads to enhanced transcription which is a reversible process by the action of histone deacetylases (HDACs). HDACs acts by removing the acetyl group from lysine residues of histones and non-histone proteins favoring the closed repressive state of chromatin [4].

Pharmacological treatment with histone deacetylase inhibitors (HDACis), such as trichostatin A and sodium butyrate (NaB), induce a histone hyperacetylated state regulating the accessibility of chromatin to the transcription machinery, affecting gene expression [5] and the essential mechanisms acting in neurological diseases as well as those underlying memory formation [6–8].

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro)/UFRGS, 90050-070 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33083183; fax: +55 51 33083121.

E-mail address: martina.blank@ufsc.br (M. Blank).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.059>

0304-3940/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

HDACs were first designed as anticancer agents [5] and the treatment with HDACs have been shown to enhance memory and ameliorate deficits in aged rats and experimental models of memory dysfunction [8,9,10,11]. Recent evidence has demonstrated epigenetic alterations in specific brain areas of aged animals [9,12] that may play a crucial role in aging being correlated to diseases, such as diabetes, cancer, neurodegenerative and psychiatric disorders [13]. In the present study we sought to establish whether HDAC inhibition by an acute systemic treatment with NaB affects LTM formation for a one-trial inhibitory avoidance (IA) task in aged rats.

2. Materials and methods

Young adult (3 months) or aged (20–24 months) male Wistar rats were obtained from our institutional certified breeding colony (CREAL-UFRGS). Animals were housed three per cage in plastic cages with sawdust bedding and maintained on a 12 h light/dark cycle at a room temperature of 22 ± 1 °C. The rats were allowed *ad libitum* access food and water. Experiments using aged and young rats were carried out separately and took place between 8 AM and 4 PM. All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Guideline for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI) and were approved by the institutional animal care committee under protocol number 12-0424.

Animals were allowed to acclimate to the laboratory for 2 h before any experimental manipulation. One week before experimental manipulation animals were handled once a day every 2 days during home-cage cleaning. We used the single-trial step-down IA conditioning as an established model of fear-motivated memory. In step-down IA training, animals learn to associate a location in the training apparatus (a grid floor) with an aversive stimulus (foot-shock). The general procedures for IA training and retention test were described in previous report [14]. On training trials, rats were gently placed on the platform facing the left rear corner of the apparatus box and their latency to step down on the grid with all four paws was measured. Immediately after stepping down on the grid, rats received a 0.4-mA, 3.0-s foot shock and were removed from the apparatus. Retention test trials took place at different intervals after training. No foot shock was presented during retention test trials. No cut-off value of step-down latencies for the training session was assigned. A ceiling of 300 s was imposed on retention test measures. Step-down latencies on the retention test trials were used as a measure of IA memory retention. At the 21 day, rats were given a mild reminder shock (0.3-mA, 3 s), followed by a retention test 24 h later. Immediately after training rats received a single intraperitoneal (i.p.) injection of saline (NaCl 0.9%) or NaB (1.2 g/kg; Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in saline in a 1.0 ml/kg injection volume. The dose of NaB was chosen on the basis of previous studies [10,11,15]. Rats were tested for memory retention 1 day after training and subsequently they were submitted to test sessions daily until 7 days. Animals were tested again at 14 days and 21 days after training. Additional test and reminder shock session were performed at 23 and 24 days after training.

Western blot analysis was performed as previously described [11,16]. Histones were extracted from hippocampal brain region of aged rats that were systemically treated with SAL or NaB immediately after training and euthanized 1 h after injections. Rats were trained in the IA learning task (TRAIN group), exposed to the context alone (1 min habituation in task chamber, HAB group) or exposed to aversive stimulus alone (0.4-mA 3-s shock, SHOCK group). The tissue was stored at -80 °C. The samples were homogenized ($n = 4$ per group) in 400 μ l of 50 mM Tris, pH 7.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 0.1 mM PMSF, 2 mM Na_2VO_4 , 1% Triton X-100, 10% glycerol and

protease inhibitor cocktail (P2714; Sigma–Aldrich). After 20 min on ice, samples were centrifuged at 12,000 rpm for 1 min. The supernatant was collected and the same volume of 0.2-N HCl was added. Acid extraction of histones was carried out over night at 4 °C then samples were centrifuged at 6500 g for 10 min at 4 °C. The supernatants were diluted 1/1 (v/v) in 100 mM Tris, pH 6.8, 4 mM EDTA, and 8% SDS and were then boiled for 5 min. The protein content was determined by the method of Lowry modified [17]. Thereafter, the loading buffer (40% glycerol, 100 mM Tris, bromophenol blue, pH 6.8, 8% β -mercaptoethanol) was added to the sample. Twenty-five μ g total protein was separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in TBS containing 0.05% Tween 20 (TBS-T) and were incubated overnight with the following antibodies: β -actin at 1:3000, H3 at 1:3000, acetyl-H3K14 at 1:1000; acetyl-H3K9 at 1:500 (ab34731, ab1791, ab52946, ab10812; Abcam, San Francisco, CA, USA). Thereafter, the membranes were incubated with goat anti-rabbit (ab6721, HRP) radish-conjugated secondary antibodies and reactions were developed by chemiluminescent substrate (LumiGlo). All steps were followed by three washes with TBS-T. The bands were quantified using the Scion Image® software, which is a derivative of NIH Image (Frederick, MD, USA). Total protein levels in the blotting were normalized according to each sample's β -actin protein levels and the results were expressed as a ratio of acetylated H3 residues to total H3.

Data are expressed as mean \pm SEM. Comparisons between groups were performed using a Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Mann–Whitney *U*-tests. Comparisons between trials within the same group were performed by Wilcoxon signed-rank test. Western blotting data were analyzed using an ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test. In all comparisons, $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

The effects of intraperitoneal administration of NaB immediately after training on the retention and persistence of IA memory for aged rats are shown in Fig. 1. There was no significant difference between rats given SAL and NaB in training performances ($P > 0.05$; $U 33.000$). All rats were tested for retention 1 (Test 1d), 2 (Test 2d), 3 (Test 3d), 4 (Test 4d), 5 (Test 5d), 6 (Test 6d), 7 (Test 7d), 14 (Test 14d), 21 (Test 21d) and 23 (Test 23d) days after training. Immediately after Test 23d, rats were given a reminder foot shock and tested again 1 day later. Statistical comparison using Wilcoxon signed-rank test showed that animals in both groups displayed significant memory retention on Test 1d compared to training ($P < 0.001$ for SAL group and $P < 0.01$ for NaB group). Further analysis with Mann–Whitney *U*-tests showed that there were significant differences between SAL-treated rats and rats given NaB in Test 1d ($P < 0.01$; $U 103.000$), Test 2d ($P < 0.05$; $U 94.000$), Test 3d ($P < 0.01$; $U 101.000$), Test 4d ($P < 0.05$; $U 90.000$), Test 5d ($P < 0.05$; $U 95.000$), Test 6d ($P < 0.05$; $U 92.000$), Test 7d ($P < 0.05$; $U 96.000$) and Test 14d ($P < 0.05$; $U 94.500$), but not in the other behavioral trials. Both groups demonstrated significant retention levels at Reminder test when compared to training by Wilcoxon signed-rank test ($P < 0.001$ for SAL and $P < 0.01$ for NaB), additionally the retention level of NaB-treated aged rats in the Reminder test was significantly greater than SAL-treated aged rats as showed by Mann–Whitney *U* test ($P < 0.01$; $U 95.000$). The results indicate that NaB administration in aged rats resulted in significant enhancement of IA memory retention that lasted for 14 days compared to SAL treated rats.

On the other hand, younger animals treated with NaB did not demonstrate enhancement of IA retention (Fig. 2). Young adult rats were treated with NaB intraperitoneally immediately after train-

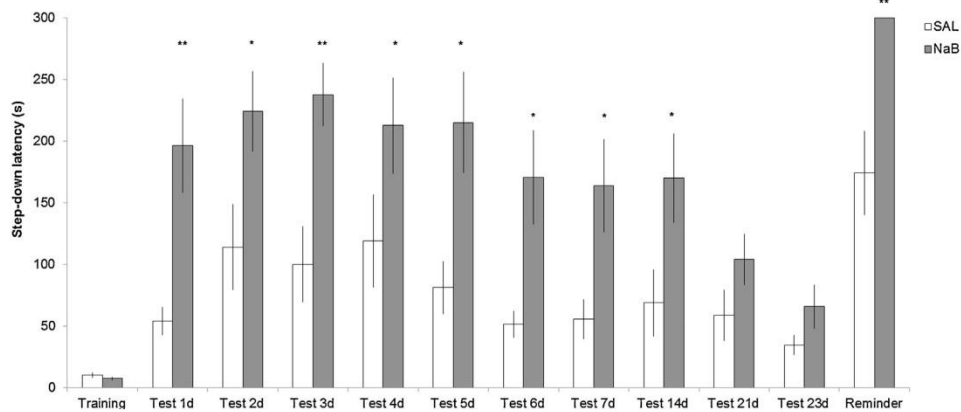


Fig. 1. Administration of NaB enhances long-term retention of IA memory in aged rats. Rats were trained and given an acute systemic intraperitoneal injection of SAL ($N = 12$) or NaB (1.2 g/kg, $N = 10$) immediately after training. Data are mean + SEM retention test latencies to step-down (s); * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to SAL-treated rats.

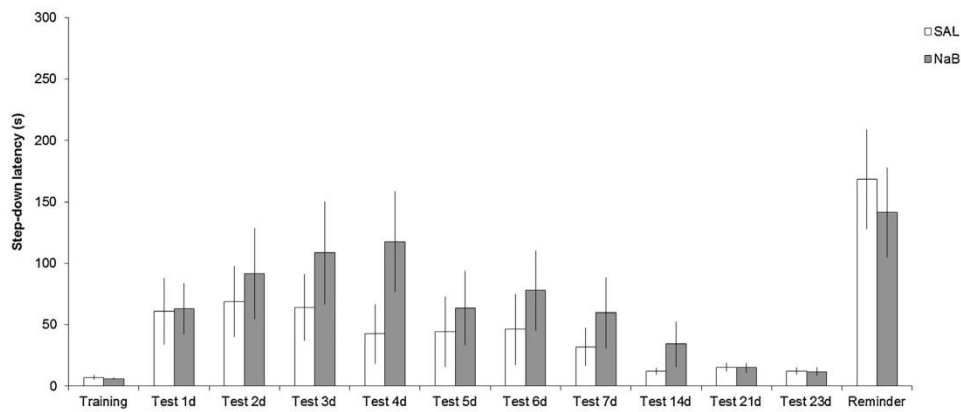


Fig. 2. Administration of NaB had no effect on long-term retention of IA memory in young rats. Rats were trained and given an acute systemic intraperitoneal injection of SAL ($N = 10$) or NaB (1.2 g/kg, $N = 10$) immediately after training. Data are mean + SEM retention test latencies to step-down (s).

ing and tested for retention 1 (Test 1d), 2 (Test 2d), 3 (Test 3d), 4 (Test 4d), 5 (Test 5d), 6 (Test 6d), 7 (Test 7d), 14 (Test 14d), 21 (Test 21d) and 23 (Test 23d) days after training. Immediately after Test 23d, rats were given a reminder footshock and tested again 1 day later. Although both groups demonstrated memory retention on Test 1d compared to training by Wilcoxon signed-rank test ($P < 0.01$ for both groups), no memory enhancement was observed in the group treated with NaB in comparison to SAL-treated group by further Mann–Whitney U -tests. In addition, no significant differences between SAL-treated rats and rats given NaB were observed in any other trial. There was a decline in retention levels across test trials, and both groups displayed a high retention level when tested after a reminder shock ($P < 0.01$ compared to training for both groups). The results indicate that NaB had no effect on learning in young adult rats.

In order to investigate if the pharmacological effects of NaB observed in aged rats during learning reflected biochemical

alterations in specific histones modifications, we examined the acetylation level of histone H3 in both residues of lysine 9 and 14 in the hippocampus of aged rats. We chose those residues because histone acetylation of H3 lysine residues has been linked to memory formation and consolidation [15,32]. In addition, Peleg et al. [9] had found a transient increase of H3K9 and H3K14 acetylation 60 min in the hippocampus after fear conditioning in 3 and 16-month-old mice and Silva et al. [11] demonstrated that memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by a reduction in H3K9 acetylation in the hippocampus that is rescued after treatment with NaB. Fig. 3A and B shows Histone H3 acetylation at lysine 9 and 14 in the hippocampus of aged rats treated with SAL or NaB. Systemic NaB treatment immediately after training did not affect H3K9 and H3K14 acetylation in aged rats measured 1 hour post-training. Although there was an apparent NaB-induced increase in H3K9 acetylation in trained rats compared to SAL group, this comparison did not reach statistical significance ($P > 0.05$).

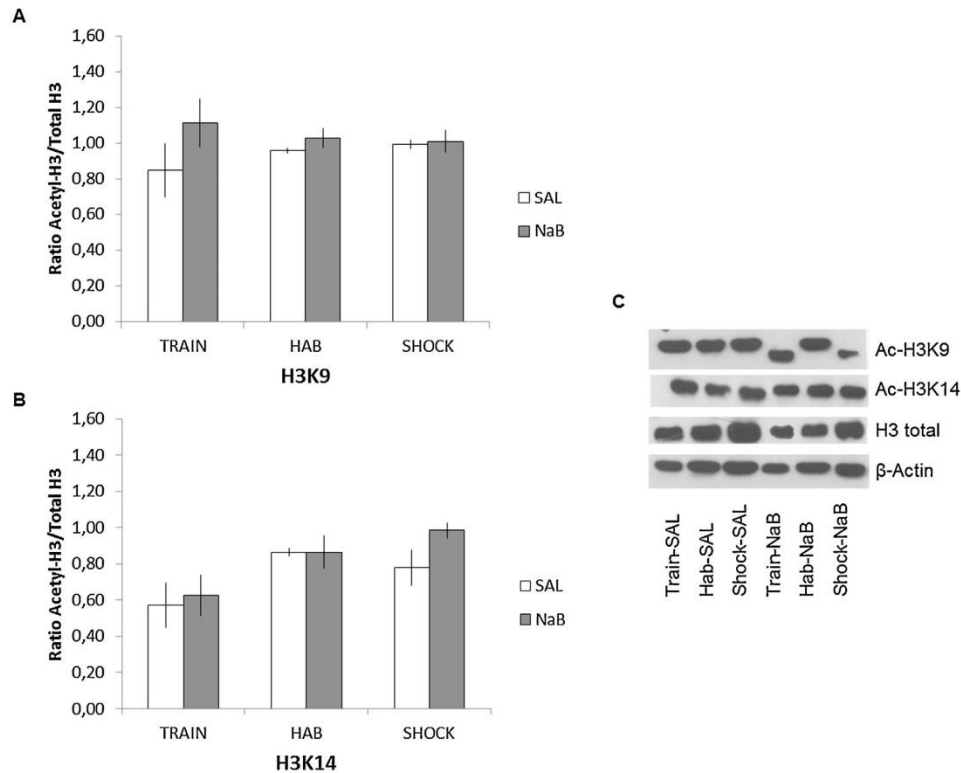


Fig. 3. Histone H3 acetylation in the hippocampus of aged rats treated with SAL or NaB. Rats were either trained in the IA learning task (TRAIN), exposed to the context alone (HAB) or exposed to aversive stimulus alone (SHOCK). Data are shown as means \pm SEM ratio of acetylated H3K9 (A) or H3K14 (B) to total histone H3. (C) Representative Western blots for acetylated histones, total H3, and β -actin in the hippocampus; $N = 4$ animals per group.

4. Discussion

Recent evidence indicates that epigenetic mechanisms can orchestrate molecular events during long-term memory formation and affect learning in aged rats [2,6,7,8,9,10,12,15,18]. Our data indicate that treatment with NaB can enhance memory consolidation for aged rats but not young adult rats. In addition, it supports the view of learning being critically modulated by the activity of HDACs [3,19]. Since NaB injections were given after training, the NaB-induced improvement of memory observed in aged rats cannot be explained by drug-induced alterations in sensorial or motor parameters.

Kilgore et al. [8] showed that beyond rescuing memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, treatment with HDACis resulted in a type of memory resistant to weakening in response to time or reactivation. Consistently, we found that the enhanced memory was more persistent lasting longer even with daily re-exposure to the IA apparatus when compared to control aged animals. Therefore, HDACis might be regulating mechanisms of plasticity generating stability and improving the efficiency of original memory consolidation when administered at specific time points after learning. This is in accordance with our previous results [14] and with evidence indicating that increased acetylation induced by HDACis is a molecular feature of stronger and more

persistent memories [20]. Further studies are necessary to understand which mechanisms are being modulated by NaB in aged rats and additional tests evaluating memory in different time points after training and NaB administration are important to clarify this memory-enhancing effect.

Previously, our group has demonstrated that a posttraining injection of NaB did not affect memory in younger rats showing normal memory retention, but ameliorated aging-related memory deficits in an object recognition task [10,11]. Our findings extend that previous evidence by indicating that NaB can display a memory-enhancing effect that is specific for aged animals, even when they do not show age-related memory impairment. Many studies showed memory-enhancing effects of HDAC inhibitors in young rodents [7,8,15,18,21] but, in our study no effect of NaB was observed in young rats. Perhaps the null effect of NaB observed in young rats could be explained by differences in behavioral protocols and route of administration used that may reflect a complex action of NaB since there are variations of NaB effects across research laboratories. The hypothesis that animals with different genetic backgrounds can present different behavioral responses as well as diverse patterns of epigenetic modifications should also be taken into account when comparing different studies [8].

In our study, aged animals with no learning deficits were selectively affected by NaB administration. This result is in accordance

with studies demonstrating that aging is not always accompanied by memory impairment as nearly half of aged rats demonstrate normal learning scores [23,24,25,26,27]. Furthermore, different patterns of chromatin modifications occur in the hippocampus of young and aged rats after training and the use of HDACis might alter chromatin resulting in divergent gene transcription and behavioral responses [23,26]. Haberman and co-workers [26,27] demonstrated that although some gene profiles are the same between young and aged rats with no impaired memory, many other genes are differentially expressed. Thus, perhaps treatment with NaB could be altering gene expression by acting on those genes promoters. Our finding of specific memory-enhancing effects of NaB in aged rats could also be partly explained by the fact that epigenetic markers at histones may not be deregulated in these animals and possibly HDACs inhibition by NaB is affecting non-histone substrates [31].

The lack of alterations in H3 acetylation for aged rats in our work might be explained by transient variations in acetylation on numerous histones, not only in histone H3, triggered by memory formation [9,28]. Studies with altered H3 acetylation used object recognition training, contextual fear conditioning, spatial memory, food aversion training among others that differ from our IA training which could result in a different pattern of histone acetylation [29]. Peleg et al. [9] showed that age-related memory impairment was associated with a reduction in acetylation of H4K12, but not H3K9. In addition, Castellano et al. [22] demonstrated that increases in H3 acetylation after systemic administration of NaB occurred 30 min after injection but not at 60 min. NaB also act on HDACs with ubiquitous expression probably inducing acetylation in other substrates aside from nuclear histones [30]. Recently, enzymatic cleavage of histone H3 tail was reported *in vivo* [33] and it could interfere with histone acetylation biochemical measures since most studied modifications in histone H3 are located downstream of known H3 cleavage sites. Future experiments investigating acetylation in other lysine residues, comparing histone acetylation in aged and young rats as well as in habituated rats with naïve and non-habituated control rats might shed light on this issue.

5. Conclusion

In summary, our results indicate that aged animals, even with the absence of alterations in normal memory formation, might be particularly sensitive to the enhancing effects of a single systemic administration of an HDACi on the consolidation of aversively-motivated memory.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 484185/2012-8 and 303276/2013-4 to R.R.); PNPD CAPES/HCPA 01/2011 (scholarship to A.S.D.); the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM); and the HCPA institutional research fund (FIPE/HCPA). The funding sources had no role in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the paper for publication.

References

- J.J. Day, J.D. Sweatt, Epigenetic mechanisms in cognition, *Neuron* 70 (June 9 5) (2011) 813–829, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.019>.
- T.L. Roth, J.D. Sweatt, Regulation of chromatin structure in memory formation, *Curr. Opin. Neurobiol.* 19 (June 3) (2009) 336–342, <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2009.05.011>.
- J. Gräff, L.H. Tsai, Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (February 2) (2013) 97–111, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3427>.
- C.M. Grozinger, S.L. Schreiber, Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors, *Chem. Biol.* 9 (January 1) (2002) 3–16, [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)92-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(02)92-3).
- P.A. Marks, W.S. Xu, Histone deacetylase inhibitors: potential in cancer therapy, *J. Cell. Biochem.* 107 (July 1(4)) (2009) 600–608, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.22185>.
- J.M. Alarcón, G. Malleret, K. Touzani, S. Vronskaya, S. Ishii, E.R. Kandel, A. Barco, Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration, *Neuron* 42 (June 24 (6)) (2004) 947–959, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.021>.
- K.M. Lattal, R.M. Barrett, M.A. Wood, Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction, *Behav. Neurosci.* 121 (October 5) (2007) 1125–1131, <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.121.5.1125>.
- M. Kilgore, C.A. Miller, D.M. Fass, K.M. Hennig, S.J. Haggarty, J.D. Sweatt, G. Rumbaugh, Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, *Neuropsychopharmacology* 35 (March 4) (2010) 870–880, <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2009.197>.
- S. Peleg, F. Sananbenesi, A. Zovolis, S. Burkhardt, S. Bahari-Javan, R.C. Agis-Balboa, P. Cota, J.L. Wittmann, A. Gogol-Doering, L. Opitz, G. Salinas-Riester, M. Dettenhofer, H. Kang, L. Farinelli, W. Chen, A. Fischer, Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice, *Science* 328 (May 7 (5979)) (2010) 753–756, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1186088>.
- G.K. Reolon, N. Maurmann, A. Werenicz, V.A. Garcia, N. Schröder, M.A. Wood, R. Roesler, Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats, *Behav. Brain Res.* 221 (August 1 (1)) (2011) 329–332, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.033>.
- P.F. Silva, V.A. Garcia, S. Dornelles, V.K. Ada, N. Silva, B.C. Maurmann, R.D. Portal, F.C. Ferreira, R. Piazza, N. Roesler, Schröder memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate, *Neuroscience* 200 (January 3) (2012) 42–49, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.038>.
- J.F. Castellano, B.R. Fletcher, B. Kelley-Bell, D.H. Kim, M. Gallagher, P.R. Rapp, Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus, *PLoS One* 7 (3) (2012) e33249, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033249>.
- M. Berdasco, M. Esteller, Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011, *Aging Cell* 11 (April 2) (2012) 181–186, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00806.x>.
- M. Blank, A.S. Dornelles, A. Werenicz, L.A. Velho, D.F. Pinto, A.C. Fedi, N. Schröder, R. Roesler, Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus, *Neurobiol. Learn. Mem.* 111 (May) (2014) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2014.02.003>.
- J.M. Levenson, K.J. O'Riordan, K.D. Brown, M.A. Trinh, D.L. Molfese, J.D. Sweatt, Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus, *J. Biol. Chem.* 279 (September 24 (39)) (2004) 40545–40559, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M40229200>.
- M.W. Lopes, F.M. Soares, N. de Mello, J.C. Nunes, A.C. Cajado, D. de Brito, F.M. de Cordova, R.M. da Cunha, R. Walz, R.B. Leal, Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy, *Exp. Brain Res.* 226 (April 2) (2013) 153–163, <http://dx.doi.org/10.1007/s00221-013-3421-8>.
- G.L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83 (December 2) (1977) 346–356.
- D.P. Stefanko, R.M. Barrett, A.R. Ly, G.K. Reolon, M.A. Wood, Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (June 9 (23)) (2009) 9447–9452, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0903964106>.
- S.C. McQuown, M.A. Wood, HDAC3 and the molecular brake pad hypothesis, *Neurobiol. Learn. Mem.* 96 (July 1) (2011) 27–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2011.04.002>.
- N. Federman, M.S. Fustiñana, A. Romano, Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories, *Learn. Mem.* 16 (September 30 (10)) (2009) 600–606, <http://dx.doi.org/10.1101/lm.1537009>.
- T.W. Bredy, M. Barad, The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear, *Learn. Mem.* 15 (January 3 (1)) (2008), <http://dx.doi.org/10.1101/lm.801108>.
- J.F. Castellano, B.R. Fletcher, H. Patzke, J.M. Long, A. Sewal, D.H. Kim, B. Kelley-Bell, P.R. Rapp, Reassessing the effects of histone deacetylase inhibitors on hippocampal memory and cognitive aging, *Hippocampus* 24 (August 8) (2014) 1006–1016, <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.22286>.
- J.F. Castellano, B.R. Fletcher, B. Kelley-Bell, D.H. Kim, M. Gallagher, P.R. Rapp, Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus, *PLoS One* 7 (3) (2012) e33249, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033249>.
- M.M. Nicolle, M. Gallagher, M. McKinney, No loss of synaptic proteins in the hippocampus of aged, behaviorally impaired rats, *Neurobiol. Aging* 20 (May–June 3) (1999) 343–348, [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)54-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580(99)54-8).

- [25] P.R. Rapp, M. Gallagher, Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (September 3 (18)) (1996) 9926–9930.
- [26] R.P. Haberman, C. Colantuoni, A.M. Stocker, A.C. Schmidt, J.T. Pedersen, M. Gallagher, Prominent hippocampal CA3 gene expression profile in neurocognitive aging, *Neurobiol. Aging* 32 (September (9)) (2011) 1678–1692, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.10.005>.
- [27] R.P. Haberman, C. Colantuoni, M.T. Koh, M. Gallagher, Behaviorally activated mRNA expression profiles produce signatures of learning and enhanced inhibition in aged rats with preserved memory, *PLoS One* 8 (December 13 (12)) (2013) e83674, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083674>.
- [28] O. Bousiges, R. Neidl, M. Majchrzak, M.A. Muller, A. Barbelivien, A. Pereira de Vasconcelos, A. Schneider, J.P. Loeffler, J.C. Cassel, A.L. Boutillier, Detection of histone acetylation levels in the dorsal hippocampus reveals early tagging on specific residues of H2B and H4 histones in response to learning, *PLoS One* 8 (3) (2013) e57816, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057816>.
- [29] Z.Z. Bronfman, S. Ginsburg, E. Jablonka, Shaping the learning curve: epigenetic dynamics in neural plasticity, *Front. Integr. Neurosci.* 8 (July (7)) (2014) 55, <http://dx.doi.org/10.3389/fnint.2014.00055>.
- [30] M. Buchwald, O.H. Krämer, T. Heinzel, HDACi—targets beyond chromatin, *Cancer Lett.* 280 (August 8 (2)) (2009) 160–167, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.028>.
- [31] S. Spange, T. Wagner, T. Heinzel, O.H. Krämer, Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41 (January (1)) (2009) 185–198, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioce.2008.08.027>.
- [32] C.G. Vecsey, J.D. Hawk, K.M. Lattal, J.M. Stein, S.A. Fabian, M.A. Attner, S.M. Cabrera, C.B. McDonough, P.K. Brindle, T. Abel, M.A. Wood, Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation, *J. Neurosci.* 27 (June 6 (23)) (2007) 6128–6140, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0296-07.2007>.
- [33] C.G. Howe, M.V. Gamble, Enzymatic cleavage of histone H3: a new consideration when measuring histone modifications in human samples, *Clin. Epigenetics* 7 (January 22 (1)) (2015), <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-014-0041-5>.

3.3 ARTIGO DE DADOS – Research article

TrkB blockade in the hippocampus after training or retrieval impairs memory: protection from consolidation impairment by histone deacetylase inhibition

Autores: Martina Blank, Fernanda dos Santos Petry, Martina Lichtenfels, Fernanda Endler Valiati, Arethuzza S Dornelles; Rafael Roesler.

Periódico: Journal of Neural Transmission

Status: Submetido em 21.05.2015.

De: em.jont.0.434808.d75a270@editorialmanager.com [mailto:em.jont.0.434808.d75a270@editorialmanager.com] Em nome de JNT Editorial Office

Enviada em: quinta-feira, 21 de maio de 2015 11:42

Para: Rafael Roesler

Assunto: *** Journal of Neural Transmission: Submission Confirmation for TrkB blockade in the hippocampus after training or retrieval impairs memory: protection from consolidation impairment by histone deacetylase inhibition

Dear Dr. Roesler,

Your submission entitled "TrkB blockade in the hippocampus after training or retrieval impairs memory: protection from consolidation impairment by histone deacetylase inhibition" has been received by journal Journal of Neural Transmission

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jont.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

De: "JNT Editorial Office" <em@editorialmanager.com>

Data: 21 de maio de 2015 12:33:32 BRT

Para: "Rafael Roesler" <rroesler@terra.com.br>

Assunto: **A manuscript number has been assigned to TrkB blockade in the hippocampus after training or retrieval impairs memory: protection from consolidation impairment by histone deacetylase inhibition**

Responder A: "JNT Editorial Office" <jntspringer@web.de>

Dear Dr. Roesler,

Your submission entitled "TrkB blockade in the hippocampus after training or retrieval impairs memory: protection from consolidation impairment by histone deacetylase inhibition" has been assigned the following manuscript number: JONT-D-15-00134.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <http://jont.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Christian Riederer
Managing Editor (Editorial Office)
Journal of Neural Transmission

Manuscrito submetido:

Journal of Neural Transmission

ORIGINAL ARTICLE

**TrkB blockade in the hippocampus after training or retrieval impairs memory:
protection from consolidation impairment by histone deacetylase inhibition**

Martina Blank • Fernanda S. Petry • Martina Lichtenfels • Fernanda E. Valiati • Arethuza
S. Dornelles • Rafael Roesler

Martina Blank • Fernanda S. Petry • Martina Lichtenfels • Fernanda E. Valiati • Arethuza S. Dornelles •
Rafael Roesler

Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do
Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA),
Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, Brazil

Martina Blank

Center for Molecular Structural Biology, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis,
SC, Brazil

Corresponding author: Rafael Roesler, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul; Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33083183; fax: +5551 33083121.

E-mail: rafael.roesler@pq.cnpq.br (R. Roesler)

Abstract

Relatively little is known about the requirement of signaling initiated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor, tropomyosin receptor kinase B (TrkB), in the early phases of memory consolidation, as well as about its possible functional interactions with epigenetic mechanisms. Here we show that blocking TrkB in the dorsal hippocampus after learning or retrieval impairs retention of memory for inhibitory avoidance (IA). More importantly, the impairing effect of TrkB antagonism on consolidation was completely prevented by the histone deacetylase (HDAC) inhibitor sodium butyrate (NaB). Male Wistar rats were given an intrahippocampal infusion of saline (SAL) or NaB before training, followed by an infusion of either vehicle (VEH) or the selective TrkB antagonist ANA-12 immediately after training. In a second experiment, the infusions were administered before and after retrieval. ANA-12 after either training or retrieval produced a significant impairment in a subsequent memory retention test. Pretraining administration of NaB prevented the effect of ANA-12, although NaB given before retrieval did not alter the impairment resulting from TrkB blockade. The results indicate that inhibition of BDNF/TrkB in the hippocampus can hinder consolidation and reconsolidation of IA memory. However, TrkB activity is not required for consolidation when HDACs are inhibited, suggesting that a dysfunction in BDNF/TrkB signaling can be fully compensated by epigenetic mechanisms to allow hippocampal memory formation.

Keywords TrkB • Histone deacetylase • Hippocampus • Inhibitory avoidance • Memory consolidation • Reconsolidation

Introduction

Increasing evidence indicates an important role for the tropomyosin receptor kinase B (TrkB, also called receptor tyrosine kinase B), encoded by *NTRK2*, in nervous system development, synaptic plasticity, memory formation, and neuroprotection. TrkB is a member of the neurotrophin receptor kinase family activated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF). (Huang and Reichardt, 2003; Yoshii and Constantine-Paton, 2010). TrkB activation by BDNF stimulates several intracellular signaling cascades involved in synaptic plasticity, including the phospholipase C(PLC)/protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinase (MAPK), and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways (Huang and Reichardt, 2003; Minichiello, 2009; Yoshii and Constantine-Paton, 2010).

Recombinant BDNF stimulates hippocampal long-term potentiation (LTP), whereas pretreatment with an antibody against TrkB impairs LTP maintenance (Kang and Schuman, 1995; Korte et al., 1998; Patterson et al., 1996; reviewed by Minichiello, 2009). Consolidation of memory for inhibitory avoidance (IA) in rats involves learning-related requirement of BDNF/TrkB activity that accompanies protein synthesis in the dorsal hippocampus (Bambah-Mukku et al., 2014), and intrahippocampal administration of an anti-BDNF antibody before training impairs long-term retention (Chen et al., 2012). When given around the time of retention testing, under experimental conditions in which retrieval can trigger extinction or reconsolidation, BDNF might also enhance these processes (Peters et al., 2010; Samartgis et al., 2012; Wang et al., 2012), although it has been suggested that hippocampal BDNF does not play a role in the reconsolidation of fear memory in rats (Lee et al., 2004).

In different types of cultured brain cells, gene transcription for BDNF is upregulated by inhibitors of histone deacetylases (HDACs) such as sodium butyrate (NaB) (Koppel and Timmusk, 2013; Wu et al., 2008). In addition, BDNF can potentiate some effects of HDAC inhibition *in vitro* (Nör et al., 2011), and treatment with NaB increases protein levels of BDNF in the rat brain (Kim et al., 2009). The action

of HDACs is part of the set of epigenetic mechanisms regulating chromatin state and gene expression. HDACs remove acetyl groups from histones, leading to chromatin condensation and repression of gene transcription (Kouzarides, 2007). Current evidence increasingly implicates histone acetylation and deacetylation in synaptic plasticity and memory formation (reviewed in Gräff and Tsai, 2013; Levenson and Sweatt, 2005). Systemic or intracerebral administration of HDAC inhibitors has been used as an approach to produce memory enhancement through the pharmacological manipulation of the epigenome. NaB and other inhibitors including trichostatin A (TSA), suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), and valproic acid have been shown to enhance LTP and the formation and extinction of memory for fear-motivated tasks (Blank et al., 2014; Bredy and Barad, 2008; Lattal et al., 2007; Levenson et al., 2004; Stafford et al., 2012; Vecsey et al., 2007). We have previously shown that infusions of either NaB or TSA into the dorsal hippocampus given immediately or 3 h after training resulted in a long-lasting enhancement of IA memory (Blank et al., 2014).

The evidence reviewed above suggests that BDNF/TrkB signaling might functionally interact with epigenetic mechanisms involving HDACs to regulate memory formation or its modification by retrieval, and raises the possibility that HDAC inhibition may ameliorate memory impairment associated with reduced TrkB activity. In the present study, we examined the effects of combined pharmacological inhibition of hippocampal TrkB and HDAC on IA memory.

Material and methods

Animals

Adult male Wistar rats (280 - 350g at time of surgery) were obtained from the institutional breeding facility (CREAL, ICBS, UFRGS). Animals were housed three per cage in plastic cages with sawdust bedding, and maintained on a 12 h light/dark cycle at a room temperature of 22 ± 1 °C. The rats were

allowed ad libitum access to standardized pellet food and water. All experiments took place between 8 AM and 5 PM. All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Guideline for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI) and were approved by the institutional animal care committee under protocol number 130381.

Surgery

Animals were implanted under anesthesia with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (25 mg/kg) with bilateral 8.0-mm, 23-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus as described in previous studies (Blank et al., 2014; Roesler et al., 2003). Coordinates (anteroposterior, -4.3 mm from bregma; mediolateral, ± 3.0 mm from bregma; ventral, -2.0 mm from skull surface) were obtained from the atlas of Paxinos and Watson (2007). Animals were allowed to recover at least 5 days after surgery.

Drugs and infusion procedures

The general procedures for intrahippocampal infusions were described in previous reports (Blank et al., 2014; Jobim et al., 2012). At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at the CA1 hippocampal area. Drug or vehicle was infused during a 60-s period. The infusion needle was left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the needle tip.

NaB (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) was chosen as an HDAC inhibitor. It inhibits preferentially class I HDACs, which are localized predominantly to the cell nucleus, and also act with lower activity on HDAC8 (Bolden et al., 2006). For TrkB inhibition, the novel and highly selective antagonist {[N2–2-2-Oxoazepan-3-yl amino]carbonyl phenyl benzo (b)thiophene-2-carboxamide (ANA-12)]} (Sigma–Aldrich) (Cazorla et al., 2011) was used. In the first experiment, rats received a bilateral 1.0- μ l infusion of saline or NaB (100 mM dissolved in saline) into the dorsal hippocampus 10 min before training, then immediately after training they received vehicle (1% DMSO in saline) or ANA-12 (0.3, 1, or 3 μ g/ μ l dissolved in vehicle). In the second experiment, rats received a bilateral intrahippocampal 1.0- μ l infusion of saline or NaB (100 mM dissolved in saline) and immediately after reactivation they were infused with vehicle (1% DMSO in saline) or ANA-12 (1.0 μ g/ μ l dissolved in vehicle). The doses of NaB and ANA-12 was chosen on the basis of previous studies (Blank et al., 2014; Spaeth et al., 2012). Drug solutions were freshly prepared before each experiment.

Inhibitory avoidance (IA)

In step-down IA training, animals learn to associate a location in the training apparatus (a grid floor) with an aversive stimulus (footshock). The general procedures for IA training and retention testing were described in previous reports (Blank et al., 2014; Jobim et al., 2012; Pedroso et al., 2013). The IA apparatus was a 50 × 25 × 25-cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm wide, 2.5-cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. On training trials, rats were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured manually with a digital chronometer. Immediately after stepping down on the grid, rats received a 0.4-mA, 3.0-s footshock and were removed from the apparatus immediately after the footshock. Rats were tested for

retention 24 h in the first experiment (examining the effects of drug treatments on consolidation). In the second experiment (verifying the effects of drugs given after retrieval), the first test trial was used as a reactivation session that could induce reconsolidation or extinction, and a second test trial was given 48 h after training. A ceiling of 180 s was imposed on retention test measures. No footshock was presented during retention test trials. Step-down latencies on the retention test trial were used as a measure of IA memory retention.

Histology

Twenty-four to 72 h after behavioral testing, a 1.0- μ l infusion of a 4% methylene blue solution was given into the dorsal hippocampus. Rats were killed by decapitation 15 min later, and their brains were removed and stored in 10% formalin for at least 72 h. The brains were sectioned and examined for cannulae placement in the hippocampus. The extension of the methylene blue dye was taken as indicative of diffusion of the drugs previously given to each rat, as previously described (Blank et al., 2014; Jobim et al., 2012). Rats with incorrect cannula placements were excluded from the final analysis.

Statistical analyses

Data are shown as mean \pm S.E.M. retention test latencies to step-down (s). Since the variable being analyzed (step-down latency) does not follow a normal distribution and we limited the observation to 180 seconds comparisons of latencies between groups were made using Kruskal-Wallis analyzes of variance followed by Mann–Whitney *U* tests, two-tailed (Blank et al., 2014; Jobim et al., 2012; Pedroso et al., 2013). In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Results

HDAC inhibition protects from the impairment of IA memory consolidation produced by TrkB antagonism in the dorsal hippocampus

We first verified the effect of intrahippocampal infusions of NaB given before training, ANA-12 given after training, or NaB followed by ANA-12. There was no difference among groups in training latencies ($H = 12.46$, $df = 7$, $p = 0.09$; Table 1). Results for retention test latencies are shown in Fig. 1. Analysis with the Kruskal-Wallis test revealed a significant difference among groups ($H = 40.41$, $df = 7$, $p < 0.001$). Further analysis with Mann-Whitney U tests showed that posttraining ANA-12 at any of the three doses used produced a significant impairment of 24-h IA retention (all $ps < 0.01$ compared to controls) in rats given saline before training. This result indicates that TrkB activity in the dorsal hippocampus shortly after training is required for IA memory consolidation. Pretraining administration of NaB did not affect retention by itself, but completely prevented the impairing effect of ANA-12. There were no significant differences between groups treated with NaB combined with any dose of ANA-12 and control rats given saline followed by vehicle. This finding indicates that HDAC inhibition by NaB could fully protect against the memory-impairing effect of TrkB blockade.

Table 1 should be inserted here

Fig. 1 should be inserted here

HDAC inhibition does not protect from the impairment of IA memory reconsolidation produced by hippocampal TrkB antagonism

In the second experiment, NaB or saline was given before first test trial (which also served as a memory reactivation session), and ANA-12 or vehicle was given immediately after retrieval. Kruskal-Wallis analyzes revealed a significant difference among groups in the second test ($H = 17.01$, $df = 3$, $p < 0.001$), but not in the training ($H = 0.76$, $df = 3$, $p = 0.86$; Table 2) or first test trial ($H = 0.92$, $df = 3$, $p = 0.82$). Mann-Whitney U tests showed that, when given immediately after the first test, ANA-12 produced a significant impairment compared to controls in a second retention test ($p < 0.05$). NaB given before test did not affect retrieval or retention in the second test, but rats treated with NaB followed by ANA-12 showed a level of memory impairment at the second test comparable to animals given ANA-12 only ($p < 0.01$) (Fig. 2). These findings indicate, first, that TrkB antagonism in the hippocampus after retrieval might hinder reconsolidation-like processes; and, second, that this effect is not ameliorated by HDAC inhibition before retrieval.

Table 2 should be inserted here

Fig. 2 should be inserted here

Histology

All animals included in the final analysis (103 rats) had cannula placed in the intended sites. Fig. 3 shows schematic drawings of the diffusion of methylene blue, which indicates infusion placements and spread of drug infusions, within the dorsal hippocampus.

Fig. 3 should be inserted here

Discussion

The role of BDNF/TrkB in the early phases of memory consolidation and reconsolidation remains poorly characterized. Also, previous studies have not fully determined how BDNF signaling can interact with epigenetic mechanisms during memory formation. We show that TrkB activity in the dorsal hippocampus shortly after learning is required for IA memory. In addition, although BDNF has been

proposed to be recruited for the consolidation but not reconsolidation of hippocampal fear memory (Lee et al., 2004), we found that blocking TrkB after retrieval can reduce memory in a subsequent test, suggesting its requirement for reconsolidation. Moreover, the impairment in consolidation produced by TrkB inhibition was prevented by an HDAC inhibitor, suggesting that enhanced chromatin relaxation can compensate for decreased TrkB signaling during memory formation. Confirming previous findings (Blank et al., 2014), administration of NaB at 100 mM before training did not affect IA retention. Also, although histone acetylation and HDAC inhibitors have been shown to influence reconsolidation (Bredy and Barad, 2008; Federman et al., 2012), NaB infused after retrieval changed neither retention tested 24 h later nor the reconsolidation impairment produced by ANA-12.

It is possible that the reduced latency on the second test trial in rats given ANA-12 after retrieval results from accelerated extinction. However, this is unlikely since BDNF has been shown to enhance rather than impair extinction, thus facilitated extinction would not be an expected effect of a TrkB antagonist. Previous work from our laboratory has demonstrated that IA memory can undergo reconsolidation dependent on mTOR activity in the hippocampus and amygdala after retrieval (Jobim et al., 2012). Reconsolidation might serve to maintain (Jobim et al., 2012) or strengthen (Pedroso et al., 2013) IA memory.

Perhaps the most important finding of the present study is that BDNF/TrkB activity is not necessary for the early phase of memory formation when HDAC is inhibited. Several molecular mechanisms might be involved in this replacement of TrkB signaling by chromatin relaxation during consolidation. BDNF-induced TrkB stimulation increases gene expression through the activation of multiple protein kinase pathways and transcription factors. It has been recently proposed that learning-related increases in the expression and release of BDNF through a positive autoregulatory feedback loop is crucially involved in the gene expression-dependent phase of IA memory consolidation (Bambah-Mukku et al., 2014). Blocking BDNF with an antibody prior to IA training abrogates learning-induced induction of hippocampal phospho cyclic adenosine monophosphate response element-binding

protein (pCREB), phospho Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (pCamKII), and CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β), among other targets related to synaptic plasticity and memory consolidation (Bambah-Mukku et al., 2014; Chen et al., 2012). Therefore, it is possible that TrkB stimulation and HDAC inhibition converge to enhance the expression of similar sets of genes related to consolidation. NaB acts mostly by inhibiting HDAC, thus increasing histone acetylation in cell nucleus to affect chromatin structure allowing its relaxation and promoting the recruitment of transcriptional machinery to gene promoters to activate gene expression (Gräff and Tsai, 2013). However, little is known about the biochemical consequences of HDAC inhibition by NaB and how they influence memory. In cultured cells, NaB has been shown to enhance cAMP levels and stimulate the activation of the cAMP/protein kinase A (PKA), PKC, and MAPK signaling pathways. These actions might be at least partially mediated by effects independent of epigenetic influences, through direct interactions with cAMP/PKA signaling in the cytoplasm (Prasad and Sinha, 1976; Rivero and Adunyah, 1996; 1998), which may result in induction of pCREB and other transcription factors and increased RNA transcription and protein synthesis mediating memory consolidation (Fig. 4). In addition, one possible mechanism of interaction involves regulation by HDAC of the expression of BDNF itself. HDAC2 has been shown to mediate the repression of the *bdnf exon IV* promoter, decreasing BDNF expression and thus terminating a late phase of the memory consolidation process (Bambah-Mukku et al., 2014). However, further research is required to examine why the actions of NaB do not suffice to overcome the consequences of TrkB blockade during reconsolidation.

In summary, our findings indicate that TrkB signaling is involved in both early consolidation and reconsolidation of hippocampal memory. Most importantly, HDAC inhibition can fully compensate for TrkB blockade during memory formation. From a translational perspective, since BDNF/TrkB signaling can be disrupted in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders (Li and Pozzo-Miller, 2014; Zuccato and Cattaneo, 2009), these findings support the investigation and development of HDAC inhibitors as potential therapeutics to treat cognitive deficits in patients with brain disease.

Fig. 4 should be inserted here

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 484185/2012-8 and 303276/2013-4 to R.R); PNPd CAPES/HCPA 0130110 (to R.R. and A.S.D.) and the HCPA institutional research fund (FIPE/HCPA; number 130381).

Conflicts of interest

None.

References

- Bambah-Mukku D, Travaglia A, Chen DY, Pollonini G, Alberini CM (2014). A positive autoregulatory BDNF feedback loop via C/EBP β mediates hippocampal memory consolidation. *Journal of Neuroscience* 34: 12547-12559.
- Blank M, Dornelles AS, Werenicz A, Velho LA, Pinto DF, Fedi AC, Schröder N, Roesler R (2014) Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory* 111:1-8.
- Bredy TW, Barad M (2008) The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learning & Memory* 15: 39–45.
- Cazorla M, Prémont J, Mann A, Girard N, Kellendonk C, Rognan D (2011) Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *Journal of Clinical Investigation* 121: 1846-1857.
- Chen DY, Bambah-Mukku D, Pollonini G, Alberini CM (2012). *Nature Neuroscience* 15: 1707-1714.
- Gräff J, Tsai LH (2013) Histone acetylation: Molecular mnemonics on the chromatin. *Nature Reviews Neuroscience* 14: 97–111.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 72: 609–642.
- Jobim PF, Pedroso TR, Christoff RR, Werenicz A, Maurmann N, Reolon GK, Roesler R (2012) Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 97: 105–112.
- Kang H, Schuman EM (1995) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267 : 1658-1662.

- Kim HJ, Leeds P, Chuang DM (2009) The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *Journal of Neurochemistry* 110: 1226-1240.
- Koppel I, Timmusk T (2013) Differential regulation of Bdnf expression in cortical neurons by class-selective histone deacetylase inhibitors. *Neuropharmacology* 75: 106-115.
- Korte M, Kang H, Bonhoeffer T, Schuman E (1998) A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* 37: 553-559.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693–705.
- Lattal KM, Barrett RM, Wood MA (2007) Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behavioral Neuroscience* 121: 1125–1131.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304: 839-843.
- Levenson JM, O’Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *Journal of Biological Chemistry* 279: 40545–40559.
- Levenson JM, Sweatt JD (2005) Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 108–118.
- Li W, Pozzo-Miller L (2009) BDNF deregulation in Rett syndrome. *Neuropharmacology* 76 Pt C: 737-746.
- Minichiello L (2009) TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 850-860.

- Nör C, de Farias CB, Abujamra AL, Schwartzmann G, Brunetto AL, Roesler R (2011) The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in combination with brain-derived neurotrophic factor reduces the viability of DAOY human medulloblastoma cells. *Child's Nervous System* 27: 897-901.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16: 1137-1145.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). Academic Press, San Diego.
- Pedroso TR, Jobim PF, Carvalho LM, Christoff RR, Maurmann N, Reolon GK, Werenicz A, Roesler R (2013) Inhibition of protein synthesis or mTOR in the basolateral amygdala blocks retrieval-induced memory strengthening. *Journal of Neural Transmission* 120: 1525-1531.
- Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ (2010) Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science* 328: 1288-1290.
- Prasad KN, Sinha PK (1976) Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. *In Vitro* 12: 125-132.
- Rivero JA, Adunyah SE (1996) Sodium butyrate induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase (ERK-1) in human K562 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 224: 796-801.
- Rivero JA, Adunyah SE (1998). Sodium butyrate stimulates PKC activation and induces differential expression of certain PKC isoforms during erythroid differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248: 664-668.

- Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G (2003) Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 24: 1069-1074.
- Samartgis JR, Schachte L, Hazi A, Crowe SF (2012) Brain-derived neurotrophic factor facilitates memory consolidation and reconsolidation of a weak training stimulus in the day-old chick. *Neuroscience Letters* 516: 119-123.
- Spaeth AM, Kanoski SE, Hayes MR, Grill HJ (2012) TrkB receptor signaling in the nucleus tractus solitarius mediates the food intake-suppressive effects of hindbrain BDNF and leptin. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 302: E1252-E1260.
- Stafford JM, Raybuck JD, Ryabinin AE, Lattal KM (2012) Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. *Biological Psychiatry* 72: 25–33.
- Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T, Wood MA (2007) Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation. *Journal of Neuroscience* 27: 6128–6140.
- Wang Y, Zhang TY, Xin J, Li T, Yu H, Li N, Chen ZY (2012) Differential involvement of brain-derived neurotrophic factor in reconsolidation and consolidation of conditioned taste aversion memory. *PLoS One*. 7: e49942.
- Wu X, Chen PS, Dallas S, Wilson B, Block ML, Wang CC, Kinyamu H, Lu N, Gao X, Leng Y, Chuang DM, Zhang W, Lu RB, Hong JS (2008) Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 11: 1123-1134.

Yoshii A, Constantine-Paton M (2010) Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Developmental Neurobiology* 70: 304–322.

Zuccato C, Cattaneo E (2009) Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology* 5: 311-322.

Table 1. Latencies to step-down during training of rats given intrahippocampal infusions before and immediately after training (treatment groups and retention test latencies are shown in Fig. 1).

Group	<i>n</i>	Mean + S.E.M. latency (s)	<i>p</i> value
SAL – VEH	8	16.82 ± 3.96	0.09
SAL – ANA-12 0.3 µg/µl	8	9.26 ± 1.60	
SAL – ANA-12 1 µg/µl	8	7.90 ± 1.42	
SAL – ANA-12 3 µg/µl	8	9.27 ± 2.24	
NaB – VEH	11	13.07 ± 2.77	
NaB – ANA-12 0.3 µg/µl	9	10.41 ± 1.86	
NaB – ANA-12 1 µg/µl	9	15.34 ± 2.24	
NaB – ANA-12 3 µg/µl	8	9.64 ± 2.56	

Table 2. Latencies to step-down during training of rats given intrahippocampal infusions before and immediately after the first test (treatment groups and retention test latencies are shown in Fig. 2).

Group	<i>n</i>	Mean + S.E.M. latency (s)	<i>p</i> value
SAL – VEH	9	12.32 ± 1.8	0.86
SAL – ANA-12 1 µg/µl	8	17.06 ± 5.89	
NaB – VEH	9	16.16 ± 5.08	
NaB – ANA-12 1 µg/µl	8	10.84 ± 2.33	

Legends for figures

Fig. 1. Administration of an HDAC inhibitor into the hippocampus prevents the impairment of memory consolidation produced by a TrkB antagonist. Rats received a bilateral infusion of saline (SAL) or NaB (100 mM) into the CA1 area of the hippocampus 10 min before IA training, and a bilateral infusion of vehicle (VEH) or ANA-12 (0.3, 1, or 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) into the hippocampus immediately after training (SAL/VEH, $n = 8$; SAL/ANA-12 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n = 8$; SAL/ANA-12 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n = 8$; SAL/ANA-12 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n = 8$; NaB/VEH, $n = 11$; NaB/ANA-12 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n = 9$; NaB/ANA-12 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n = 9$; NaB/ANA-12 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n = 8$). Retention was tested 24 h later. Data are mean + S.E.M. retention test latencies to step-down (s); ** $p < 0.01$ compared to SAL/VEH controls.

Fig. 2. Blocking TrkB in the hippocampus impairs reconsolidation regardless of HDAC inhibition. Rats were trained and given a retention test trial 1 day later (Test 1). A bilateral infusion of SAL or NaB (100 mM) was given into the hippocampus 10 min before Test 1, and a bilateral intrahippocampal infusion of VEH or ANA-12 (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) was given immediately after retrieval (SAL/VEH, $n = 9$; SAL/ANA-12 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n = 8$; NaB/VEH, $n = 9$; NaB/ANA-12 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n = 8$). Retention was tested again 1 day after the infusion (Test 2). Data are mean + S.E.M. retention test latencies to step-down (s); * $p < 0.05$ compared to SAL-VEH Test 1 latencies; *** $p < 0.001$ compared to latencies during Test 2 of NaB/VEH controls.

Fig. 3. Infusion placements into the dorsal hippocampus. Schematic diagrams of coronal sections of the rat brain, adapted from the atlas of Paxinos and Watson (2007), depicting the diffusion of methylene blue in the BLA for rats included in the final statistical analysis.

Fig. 4. Schematic model of some possible intracellular signaling pathways influenced by NaB and ANA-12 infusion in memory consolidation. Hippocampal BDNF/TrkB signaling stimulates multiple protein kinase pathways including MAPK/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), which can in turn influence chromatin histone acetylation and gene transcription through activation of CREB and CBP. Upon entering the cell, NaB might stimulate the adenylyl cyclase (AC)/cAMP/PKA pathway in the cytoplasm, enhancing RNA and protein synthesis that mediate the consolidation of IA memory. In addition, the epigenetic effects of NaB could lead to increased histone acetylation in the cell nucleus, relaxing the chromatin structure and activating gene expression related to memory consolidation. These actions can fully compensate for TrkB blockade, so that TrkB activity is not required for hippocampal memory consolidation in the presence of NaB.

Figure 1

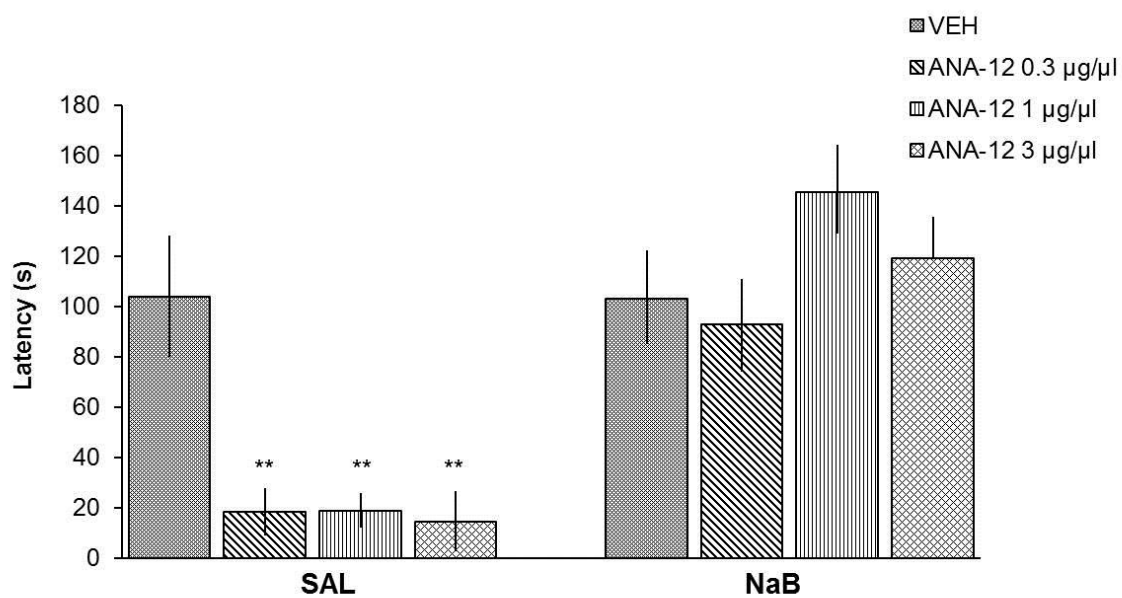


Figure 2

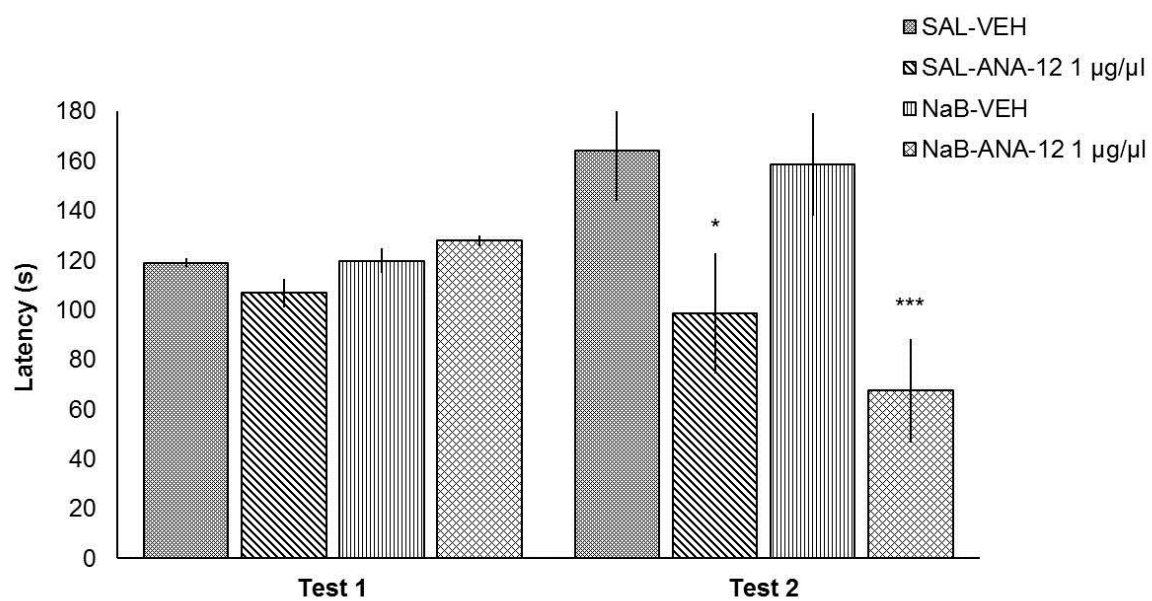


Figure 3

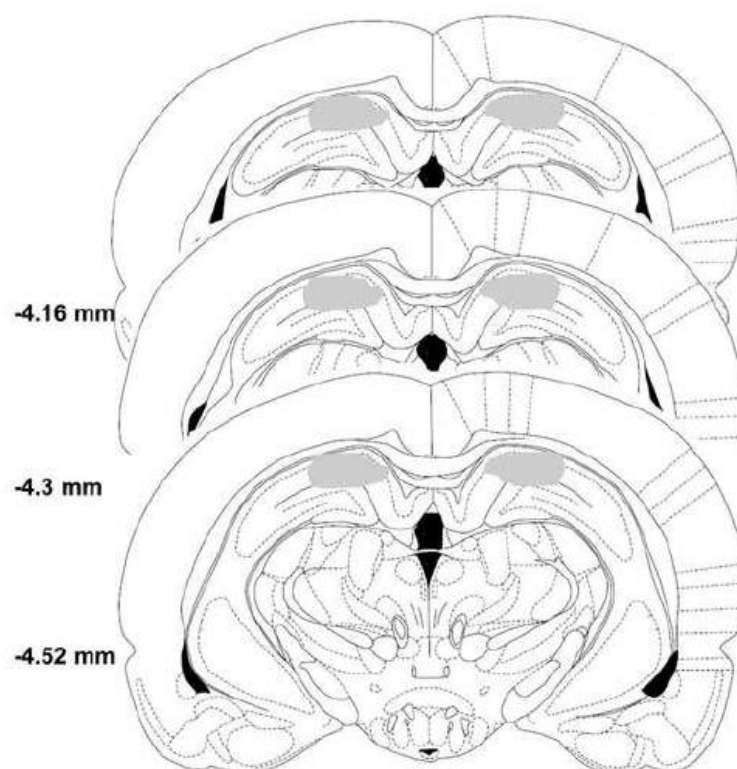
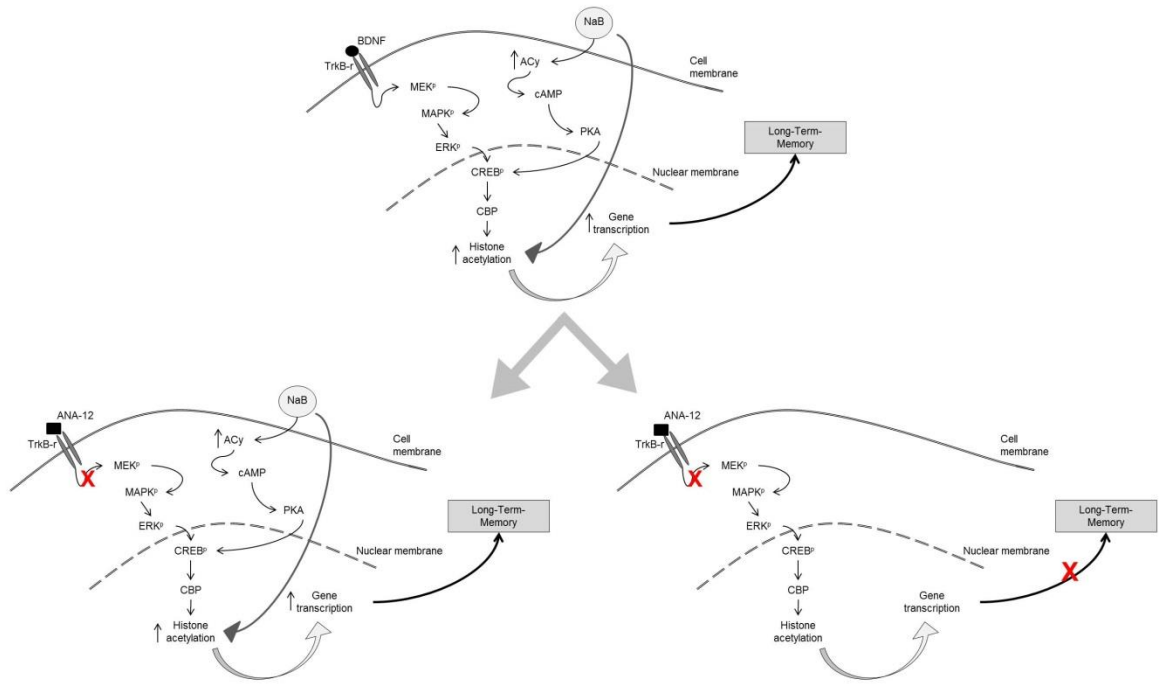


Figure 4



4 DISCUSSÃO

Estudos em modelos animais têm mostrado que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas intracelulares que culminam na modulação da expressão de genes importantes para a sua consolidação (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). No entanto, os mecanismos responsáveis pela regulação da expressão gênica, durante a consolidação da memória, não estão plenamente esclarecidos.

A utilização de roedores para estudos comportamentais já está bem estabelecida e inúmeras tarefas comportamentais já são descritas na literatura e tornaram-se clássicas para o estudo da formação e consolidação da memória (McGAUGH, 2000; McGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Dentre as tarefas já descritas, a esQUIVA inibitória tem sido a mais utilizada e considerada aquela que oferece maiores vantagens para estudos de memórias declarativas de variadas durações (GOLD, 1986). Sua rápida aquisição de informação na sessão de aprendizado/treino favorece a análise dos mecanismos de formação da memória que seguem a sessão de treino podendo ser modulados farmacologicamente em diferentes momentos (GOLD, 1986; IZQUIERDO et al., 1999). A integridade do circuito anatômico que inclui a região CA1 do hipocampo, região tradicionalmente responsável pelo processamento cognitivo nos mamíferos de forma geral e alvo de alterações patológicas que comprometem a cognição, é essencial para esta tarefa (EICHENBAUM, 1996) além de sua modulação por projeções adrenérgicas da região da amígdala cerebral, relacionadas com o conteúdo emocional do aprendizado que neste caso é aversivo e de medo (MCGAUGH, 2002). Os mecanismos de processamento de informação para a aquisição inicial de memórias para esta tarefa são conservados evolutivamente e por estar relacionada a respostas de medo esta consiste em uma importante ferramenta em estudos que visem descrever os substratos moleculares e celulares daquelas memórias tradicionalmente relacionadas com patologias comportamentais em humanos, como fobias e estresse pós-traumático (MCGAUGH, 2000; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000).

Os processos moleculares responsáveis pelas alterações sinápticas necessárias para a formação da LTM têm mostrado que, após a ativação das vias mediadas por cAMP, a regulação da expressão de genes relacionados com a plasticidade sináptica é um evento crucial (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; McGAUGH; IZQUIERDO, 2000; McGAUGH, 2000; CAMMAROTA et al., 2000; IZQUIERDO et al., 2006; MEDINA et al., 2008). Recentemente, pesquisadores demonstraram que alterações no estado da cromatina e, conseqüentemente na expressão de genes, associada à formação da LTM é regulada por mecanismos epigenéticos como, por exemplo, a acetilação de histonas (HENIKOFF et al., 2008; LEVENSON; SWEATT, 2006; GRÄFF; TSAI, 2013).

Considerando que o uso de HDACis é a abordagem farmacológica mais utilizada atualmente para se observar os efeitos do aumento de acetilação nos processos de formação da LTM, em nosso primeiro trabalho o objetivo inicial foi avaliar os efeitos da administração intra-hipocampal de TSA ou NaB durante o período de consolidação da memória que segue após o treino na tarefa de esQUIVA inibitória. Observamos que tanto TSA quanto NaB quando administrados imediatamente após o treino resultam em melhora da LTM medidas 24 h após o treino. TSA demonstrou ainda possuir duas ondas de efeitos melhoradores da LTM, uma imediatamente após o treino e outra 3 h após o treino. No entanto, a administração de TSA 1,5 h ou 6 h após o treino não alterou a LTM dos animais. Testes subsequentes demonstraram que a melhora da memória dos animais que receberam TSA intra-hipocampal permanecia aumentada por até 3 dias, quando administrada 3 h após o treino, e por até 11 dias, quando administrado imediatamente após o treino, enquanto que a memória dos animais controles decaía até o estado basal, se igualando com a latência de treino já a partir do teste 3. Estas evidências estão de acordo com estudos que mostram que HDACis podem melhorar a memória ou a extinção pelo aumento da acetilação em histonas que resultam na expressão dos genes importantes para plasticidade sináptica dependente do aprendizado (GRÄFF; TSAI, 2013). As ondas de efeitos da inibição de HDACs observadas condizem com as ondas de ativação da via de PKA e de síntese de novas proteínas importantes para a formação e consolidação da LTM (BEVILAQUA et al., 1997; QUEVEDO et al., 1999; ABEL et al., 1997; ALBERINI, 2009; KANDEL, 2012; IGAZ et al., 2002). Outro ponto importante a salientar é que, apesar de TSA e NaB possuírem ações sobre HDACs diferentes, ambos resultaram na melhora da memória, corroborando a importância da acetilação em diferentes substratos para o eventos de aprendizado.

Estudos que avaliaram o efeito da inibição de HDACs através de inibidores NaB, TSA e VPA já demonstraram os efeitos melhoradores da acetilação de histonas na formação da LTM. A infusão intra-hipocampal de TSA imediatamente após o treino melhorou a LTM na tarefa CFM (VECSEY et al., 2007). Igualmente, a administração sistêmica de NaB e a infusão na amígdala de TSA melhoraram a LTM aversiva (LEVENSON et al., 2004; YEH; LIN; GEAN, 2004). A administração sistêmica de NaB ou intra-hipocampal de TSA após o teste facilitou a extinção da memória aversiva em camundongos (LATTAL; BARRETT; WOOD, 2007). E, adicionalmente, a administração sistêmica de VPA melhorou a aquisição, extinção e reconsolidação de memória aversiva (BREDY et al., 2008). O trabalho de Federman, Fustiñana e Romano (2009) traz evidências dos períodos de efeitos da acetilação de histonas e de HDACis durante a consolidação em caranguejos utilizando a tarefa de memória de som associada ao contexto (FEDERMAN; FUSTIÑANA; ROMANO, 2009). Os autores demonstraram melhora da memória dos animais quando NaB era administrado imediatamente ou 6 h após o treino,

mas não 3 h ou 12 h, o que seria consistente com as ondas de ativação de PKA na consolidação da memória em caranguejos. Todos estes estudos apontam para a importância da acetilação no aprendizado e os resultados de nosso trabalho complementam estes achados, demonstrando haver momentos específicos durante a formação da memória em que HDACs exercem efeitos positivos de melhoramento da LTM, condizente com as vias cruciais para ativação da expressão gênica durante a consolidação da memória no hipocampo.

Com relação às regiões neuroanômicas envolvidas na formação da LTM, o segundo objetivo do nosso estudo ratifica a importância da integridade da amígdala basolateral (BLA) para os efeitos de melhora de memória observados com administração de TSA no hipocampo imediatamente após o treino. A inativação da BLA por muscimol, agonista GABAérgico, antes do treino preveniu a melhora da memória decorrente da administração de TSA no hipocampo imediatamente após o treino. Inúmeros estudos já demonstraram que a BLA modula os efeitos de fármacos e hormônios na formação da LTM proveniente de experiências com alto aspecto emocional, como no caso da tarefa de esquiva inibitória utilizada em nosso estudo. Em estudos anteriores, a inativação farmacológica ou física da BLA foi efetiva em bloquear os efeitos de fármacos administrados sistemicamente ou localmente. Roesler e colaboradores demonstraram que a inativação da BLA por muscimol antes do treino não afetou a retenção da memória, mas alterou os efeitos da intervenção farmacológica sistêmica com RC-3095 na LTM (ROESLER et al., 2004). Também já foi demonstrado que lesões da BLA bloqueiam os efeitos induzidos na memória pela administração sistêmica de corticosterona e de infusão de um agonista de receptores glicocorticoide no córtex pré-frontal (ROOZENDAAL; MCREYNOLDS; MCGAUGH, 2004). Outro experimento examinando a importância da integridade da BLA na formação da memória demonstrou que a lesão da BLA bloqueou os efeitos melhoradores de memória da administração de um análogo de cAMP no córtex entorhinal (ROESLER; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2002). Adicionalmente, em 2006, Huff e colaboradores, demonstraram que os efeitos modulatórios da BLA no hipocampo poderiam estar relacionados ao controle da expressão gênica nesta região (HUFF et al., 2006). O trabalho demonstrou que com a BLA inativada funcionalmente por muscimol os aumentos na expressão de alguns genes de plasticidade sináptica observados no hipocampo em resposta ao aprendizado foram atenuados. Estes resultados embasam os achados de nosso estudo e demonstram que a BLA possui papel crítico durante a formação de memórias emocionais, influenciando sua consolidação e interagindo com outras regiões cerebrais, no nosso caso, o hipocampo, bem como alterando a expressão gênica nesta região (MCGAUGH, 2002; MCGAUGH; CAHILL; ROOZENDAAL, 1996; HUFF et al., 2006). É importante ressaltar que esta é a primeira demonstração da influência da

interação entre regiões cerebrais nos mecanismos epigenéticos decorrentes do tratamento com HDACis no hipocampo.

No nosso segundo trabalho, o foco foi a avaliação os efeitos de HDACis na LTM de animais velhos e jovens, pois há evidências de que a dinâmica e a estrutura da cromatina se modificam durante o processo de envelhecimento assim como a atividade de histonas (CASTELLANO et al., 2012; DAS; TYLER, 2012). O objetivo deste trabalho foi verificar se a administração I. P. de NaB resultaria em melhora de LTM em animais velhos e jovens e seus efeitos ao longo do tempo com exposições diárias dos animais ao contexto sem administração do fator aversivo (choque). Nossos resultados demonstram que o tratamento sistêmico com NaB em animais velhos imediatamente após o treino não só melhora a LTM destes animais como parece gerar uma LTM mais forte, não decaindo sua latência perante testes sucessíveis mesmo estes animais não apresentando déficits cognitivos em comparação ao grupo jovem. Interessantemente, a administração de NaB em animais jovens não afetou a LTM medida 24 h após o treino. Devido ao fato de NaB ter sido administrado após o treino e possuir uma meia vida curta em roedores, nós rejeitamos a hipótese de interferência do fármaco durante o treino e testes dos animais (DANIEL et al., 1989). Nossos resultados também estão de acordo com os trabalhos que demonstram os efeitos melhoradores de memória com a administração de HDACis em modelos animais da Doença de Alzheimer (KILGORE et al., 2010), em animais tratados com ferro neonatal apresentando déficits de memória na tarefa de NOR (SILVA et al., 2012) e animais velhos apresentando déficits de memória na tarefa de NOR (REOLON et al., 2011). A falta de efeitos na LTM com a administração sistêmica de NaB em animais jovens condiz com estudos prévios de nosso grupo na tarefa de NOR (REOLON et al., 2011) e de esQUIVA INIBITÓRIA (SILVA et al., 2012). Adicionalmente, Castellano e colaboradores também demonstraram que administração sistêmica de NaB não afeta a LTM de ratos jovens no CFC (CASTELLANO et al., 2014). E ainda, os trabalhos de Kilgore e colaboradores e Federman, Fustiñana e Romano demonstram evidências de que o tratamento com HDACis pode resultar num tipo de memória mais resistente em resposta ao tempo e a reativação, desta forma concordando com nossas evidências de persistência da memória dos animais velhos tratados com NaB, mesmo quando reapresentados diariamente ao contexto (KILGORE et al., 2010; FEDERMAN; FUSTIÑANA; ROMANO, 2009). Estes dados mostram que HDACis podem estar de fato regulando mecanismos de plasticidade sináptica, gerando maior estabilidade das conexões e melhorando a eficiência sináptica durante a consolidação da memória original, quando administrado em momentos específicos após o aprendizado.

Para compreender se os efeitos melhoradores de LTM nos animais velhos estariam relacionados com alterações nos níveis de acetilação de resíduos específicos de H3 nós analisamos

via *Western blotting* o hipocampo dos animais velhos tratados ou não com NaB. Contudo, não foram observadas alterações significativas nos níveis de acetilação de H3K9 e H3K14, ambos resíduos já implicados nos processos de memória em animais velhos (PELEG et al., 2010; CASTELLANO et al., 2012). A falta de efeitos na acetilação de H3 pode ser explicada, em parte, pelo fato das alterações epigenéticas serem transientes e estarem ocorrendo em um momento diferente do analisado, como demonstrado no trabalho de Castellano e colegas, em que o aumento da acetilação em H3 resultante da administração sistêmica de NaB ocorre em 30 min, mas não em 60 min após a injeção (CASTELLANO et al., 2014). Além disso, Castellano e colegas demonstraram que as alterações da acetilação de H3K9 ocorrem significativamente na área CA1 do hipocampo em resposta ao estímulo (CASTELLANO et al., 2012) e ao analisar o hipocampo como um todo esta abordagem pode ter prejudicado a nossa análise por acabar diluindo as possíveis modificações que ocorreram em áreas específicas. Outra observação é que HATs e HDACs também possuem substratos proteicos diferentes de histonas, podendo atuar sobre HDACs nucleares e citosolicas, agindo via efeitos em outras proteínas (BUCHWALD; KRÄMER; HEINZEL, 2009; SPANGE et al., 2009). Usando HDACis de ação global, como o NaB, outros resíduos na H3 podem estar sendo modificados e alterações em outras histonas podem estar ocorrendo impossibilitando a sua detecção em nosso estudo (BLACKWELL et al., 2008). Recentemente, Howe e Gamble, publicaram dados evidenciando que há clivagem enzimática da cauda N-terminal de H3 *in vivo* e que certas modificações não poderiam ser corretamente mensuradas por terem sido clivadas (HOWE; GAMBLE, 2015). Os autores comentam que as modificações mais estudadas como acetilação e metilação nos resíduos H3K4, H3K9 e H3K27 estariam alocadas na porção *downstream* dos sítios de clivagem enzimática, sendo removidas juntamente com a porção clivada (figura 13). A razão para ocorrência da clivagem poderia se dever a um fenômeno biológico importante ou, alternativamente, estaria ocorrendo como resultado da coleta e do processamento de amostras, pois alguns coquetéis de inibidores de proteases comerciais não bloqueariam a atividade de algumas das enzimas proteolíticas que agem sobre as histonas. Outras circunstâncias que poderiam influenciar a clivagem da cauda N-terminal de H3, segundo os autores, seriam ciclo celular, desenvolvimento, infecção, diferenciação celular, espermatogênese e envelhecimento já demonstrados em outros trabalhos (revisado em ZHOU et al., 2014).

Apesar de não termos relacionado os efeitos farmacológicos na retenção da memória dos animais velhos com possíveis alterações na acetilação de H3K9 e H3K14, os resultados deste nosso trabalho surpreendem ao demonstrar efeitos significativos da administração sistêmica de NaB na melhora da retenção da memória de animais velhos mesmo estes animais não apresentando prejuízo cognitivo em decorrência do envelhecimento. Além disso, nosso estudo reforça os resultados de outros

trabalhos que demonstram que NaB não afeta LTM de animais jovens e saudáveis, o que é um efeito desejado quando se pensa no desenvolvimento de tratamentos para prejuízos cognitivos decorrentes do envelhecimento.

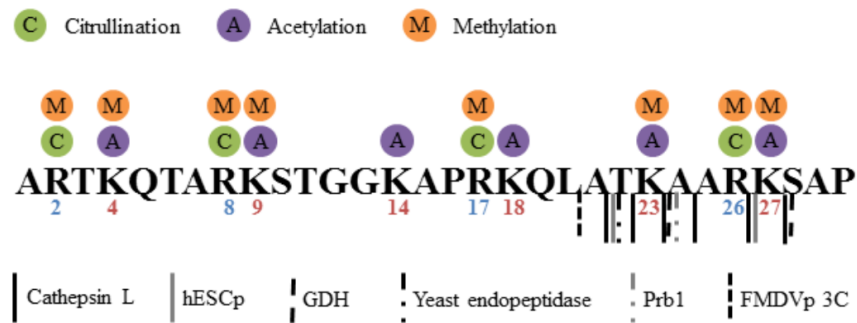


Figura 13. Sequência de aminoácidos da cauda N-terminal de H3. Representação dos sítios de clivagem por diferentes proteases e das modificações pós-traducionais melhor estudadas.

Fonte: ZHOU et al., 2014, p. 2.

Nos últimos anos, estudos demonstraram que a via BDNF/TrkB possui um papel crucial na consolidação da memória da tarefa de esquila inibitória (ALONSO et al., 2002; BEKINSCHTEIN et al., 2007; PANG; LU, 2004). O foco dos trabalhos na investigação dos efeitos da sinalização do BDNF e a falta de inibidores específicos para o TrkB até então não permitiu a compreensão de seus efeitos específicos na formação da memória, já que a ativação do receptor TrkB pode ocorrer pela ligação de outros fatores além do BDNF (SKAPER, 2008).

O nosso terceiro trabalho teve como objetivo compreender os efeitos da acetilação e desacetilação de histonas nas memórias e a possível interação com a via BDNF/TrkB. O recente desenvolvimento e viabilidade comercial de um antagonista específico para o receptor TrkB (CAZORLA et al., 2011) nos permitiu avaliar os efeitos do bloqueio da sinalização via este receptor especificamente durante a formação e reconsolidação da memória. A coadministração de um inibidor de histona desacetilases nos permitiu ainda verificar uma possível interação funcional entre os mecanismos desencadeados pela ativação do receptor TrkB e mecanismos epigenéticos.

O aprendizado desencadeia a ativação de vias como MAPK/ERK, CAMK e cAMP/PKA que convergem suas ações no núcleo celular, fosforilando CREB, e recrutam o coativador transcricional, e também HAT, CBP que promove a acetilação de histonas próximas aos promotores relaxando a cromatina, facilitando o acesso à maquinaria de transcrição ao DNA e influenciando a transcrição de

genes importantes para a LTM como *c-fos*, *zif-268* e *bdnf* (RICCIO et al., 2006; RICCIO, 2010; CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010). A ativação destas vias ocorre, em parte, através da sinalização do BDNF via receptor TrkB. E, sendo o aumento da transcrição e a síntese de novas proteínas suas ações mais importantes, mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos. Porém, pouco se sabe a respeito desta interação.

Alguns trabalhos demonstram que existe certa interação entre a acetilação de histonas e a sinalização ou expressão de BDNF. No trabalho de Nott e colaboradores, neurônios corticais quando expostos ao BDNF desencadeavam a S-nitrosilação de HDAC2, o que induziu sua dissociação dos promotores de genes regulados por BDNF e, assim, estaria permitindo o aumento de acetilação próximo a estes promotores, com conseqüente aumento da expressão gênica (NOTT et al., 2008). Já em células de meduloblastoma, o tratamento com NaB combinado ao BDNF reduziu significativamente a viabilidade destas células, mostrando que há uma regulação positiva entre os mecanismos ativados por ambos tratamentos (NÖR et al., 2011). Outros estudos *in vitro* demonstraram ainda que o tratamento com NaB induz a transcrição do gene de BDNF e o aumento nos níveis da proteína BDNF no cérebro de ratos (WU et al., 2008; KIM et al., 2009). Recentemente se demonstrou que a consolidação da memória aversiva em ratos ocorreria através de *feedback* positivo e autoregulatório de BDNF no hipocampo. A sinalização por BDNF/TrkB após o aprendizado induziria a dissociação de HDAC2 do promotor do gene *bdnf* desta forma permitindo aumento de acetilação no local e aumento da expressão gênica de BDNF que estaria ocorrendo pela ativação de CREB e expressão de C/EBP com conseqüente aumento dos níveis da proteína BDNF que através da ligação com o receptor TrkB iniciaria novamente a sinalização (BAMBAH-MUKKU et al., 2014). Neste trabalho ainda se demonstrou que este *feedback* positivo ocorreria por cerca de 48h quando o repressor transcricional MeCP2 acaba por se ligar no promotor do gene *bdnf*, assim como a HDAC2, desta forma reprimindo a transcrição e terminando o processo de consolidação da memória através da sinalização por BDNF/TrkB.

Os resultados de nosso trabalho sustentam as evidências de que a sinalização por TrkB é importante para formação da memória aversiva e mostram que o bloqueio do receptor TrkB pela administração intrahipocampal de ANA-12 imediatamente após o treino ou da evocação da memória foi prejudicial para a retenção da memória na tarefa de esQUIVA inibitória. O prejuízo na memória causado pelo bloqueio da sinalização por TrkB imediatamente após o treino ou da evocação pode ter ocorrido devido a interferência na sinalização intracelular importante para a formação da memória ativada por ele. MAPK/ERK, PI3K e fosfolipase C- γ são vias de sinalização intracelulares comumente ativadas pelo estímulo do aprendizado através da sinalização de BDNF/TrkB que são cruciais para desencadear os eventos celulares e moleculares que determinarão a consolidação da LTM (YANO; CHAO, 2000;

KAPLAN; MILLER, 2000; BRAMHAM; MESSAOUDI, 2005; LU; CHRISTIAN; LU, 2008). Desta forma, nossos resultados estão de acordo com a literatura que demonstra papel crucial de sinalização de BDNF/TrkB na plasticidade sináptica e na consolidação da memória (BEKINSCHTEIN et al., 2007; PANG; LU, 2004; ALONSO et al., 2002; TYLER et al., 2002). Apesar do fato de que BDNF parece não ser necessário para reconsolidação, da mesma forma que é para a consolidação da memória (LEE et al., 2004), nossos resultados demonstram que a atividade de TrkB seria também importante para a reconsolidação, pois o seu bloqueio logo após a evocação prejudicou a formação da memória medida 24 h depois.

O efeito de NaB prevenindo o prejuízo causado pelo bloqueio de TrkB demonstrado em nosso experimento sugere que mecanismos epigenéticos, como a acetilação, estariam envolvidos no processo e sua modulação na acetilação, no caso pela inibição da atividade de HDACs, poderia compensar a falta de sinalização por outras vias durante a formação da LTM. Nós utilizamos uma dose de NaB que previamente não havia influenciado no processo de consolidação da memória, confirmando que os efeitos de NaB não foram devido a um aumento da LTM estimulada por ele e, sim, pela sua atividade intracelular.

Nos últimos anos, muitos trabalhos focaram no NaB como inibidor de HDACs e pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação extra-epigenéticos após permear a membrana celular. Na década de 70, alguns estudos verificaram que, tratando células mamíferas em cultivo com NaB, os níveis de cAMP se apresentavam aumentados, provavelmente pelo aumento da atividade da enzima adenilato ciclase, e subsequentemente observaram aumento da transcrição de mRNAs e síntese proteica (PRASAD; SINHA, 1976; PRASAD; GILMER, 1974). Alguns anos mais tarde, Rivero & Adunyah, demonstraram que NaB possuía a capacidade de fosforilar resíduos tirosinas, serinas e treoninas e assim induziria a ativação das vias de sinalização intracelulares MAPK/ERK e PKC em células em cultivo (RIVERO; ADUNYAH, 1996; 1998). Desta forma NaB estimularia a expressão gênica e síntese protéica, tanto agindo em proteínas no citoplasma celular quanto diretamente no núcleo inibindo a ação de HDACs possibilitando o aumento e permanência da acetilação em histonas, promovendo o relaxamento da cromatina e o recrutamento da maquinaria de transcrição gênica para os promotores de genes importantes na plasticidade sináptica e consolidação da memória (GRÄFF; TSAI, 2013). Nota-se que algumas das vias de sinalização estimuladas por BDNF/TrkB e NaB são as mesmas que agem em decorrência do aprendizado para a consolidação da LTM como as vias da PKA e ERK (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Logo, podemos observar que quando NaB está presente inibindo atividade de HDACs, a atividade de TrkB parece não ser necessária para a consolidação da LTM, o

que sugere que mecanismos epigenéticos podem compensar, de certa forma, a falta de sinalização via BDNF/TrkB no hipocampo durante a formação da memória.

A administração de NaB antes da evocação não conseguiu prevenir os efeitos prejudiciais de ANA-12 na memória, possivelmente pelo fato de que, no hipocampo, a síntese de novas proteínas parece não ser crucial para a reconsolidação da memória aversiva (TAUBENFELD et al., 2001) e algumas vias de sinalização estimuladas pelo NaB parecem não ser induzidas no momento da evocação 24 h após o treino como no caso da cAMP/PKA (KEMENES et al., 2006).

Nossos resultados indicam que, no hipocampo, a sinalização por TrkB está envolvida tanto na consolidação como na reconsolidação da memória aversiva. E, interessante, a inibição de HDACs por NaB no hipocampo consegue compensar a falta de sinalização por TrkB quando este é bloqueado durante a formação da memória. Estes dados demonstram a importância dos mecanismos desencadeados por BDNF/TrkB e inibidores de HDACs, bem como sua possível interação funcional no sistema nervoso, já que a perturbação de sua atividade parece estar envolvida em diversas doenças neurológicas, como transtornos de humor, doenças neurodegenerativas e de neurodesenvolvimento (revisado em YOSHII; CONSTANTINE-PATON, 2010).

5 CONCLUSÕES

- TSA e NaB possuem efeitos melhoradores de LTM quando administrados no hipocampo de ratos jovens;
- Há 2 momentos específicos durante a consolidação em que HDACis exercem efeitos positivos de melhoramento da LTM em ratos jovens, imediatamente após o treino e 3 h após o treino, que condizem com as vias cruciais para ativação da expressão gênica durante a consolidação da memória no hipocampo;
- TSA administrado 1,5 h e 6 h após o treino não resulta em efeitos positivos na LTM de ratos jovens;
- A inativação da BLA por infusão de muscimol preveniu a melhora da memória decorrente da administração de TSA no hipocampo imediatamente após o treino;
- A integridade da BLA é importante para os efeitos melhoradores de LTM do TSA;
- O tratamento sistêmico com NaB em animais velhos imediatamente após o treino melhora a LTM destes animais;
- A administração de NaB sistemicamente em animais velhos parece gerar uma LTM mais estável e forte que não decai perante testes sucessivos;
- NaB exerce efeitos melhoradores de LTM em animais velhos mesmo estes animais não apresentando déficits cognitivos em comparação ao grupo jovem;
- A administração de NaB em animais jovens saudáveis não afetou a LTM;
- Apesar de observarmos efeitos positivos da administração sistêmica de NaB em ratos velhos não se observou alterações nos níveis de acetilação de histona 3 nas lisinas 9 e 14 medidos 1 h após o treino.
- A interrupção da via BDNF/TrkB pela administração intrahipocampal do antagonista ANA-12 bloqueou a formação da LTM, evidenciando sua importância neste processo.
- A administração intrahipocampal de NaB antes do treino conseguiu prevenir o efeito prejudicial na formação da memória decorrente da administração de ANA-12 após o treino.
- ANA-12 administrado via intrahipocampal imediatamente após a evocação da memória prejudicou a sua reconsolidação.

- NaB administrado intrahipocampalmente antes da evocação da memória não conseguiu prevenir o efeito negativo de ANA-12 na reconsolidação da memória.

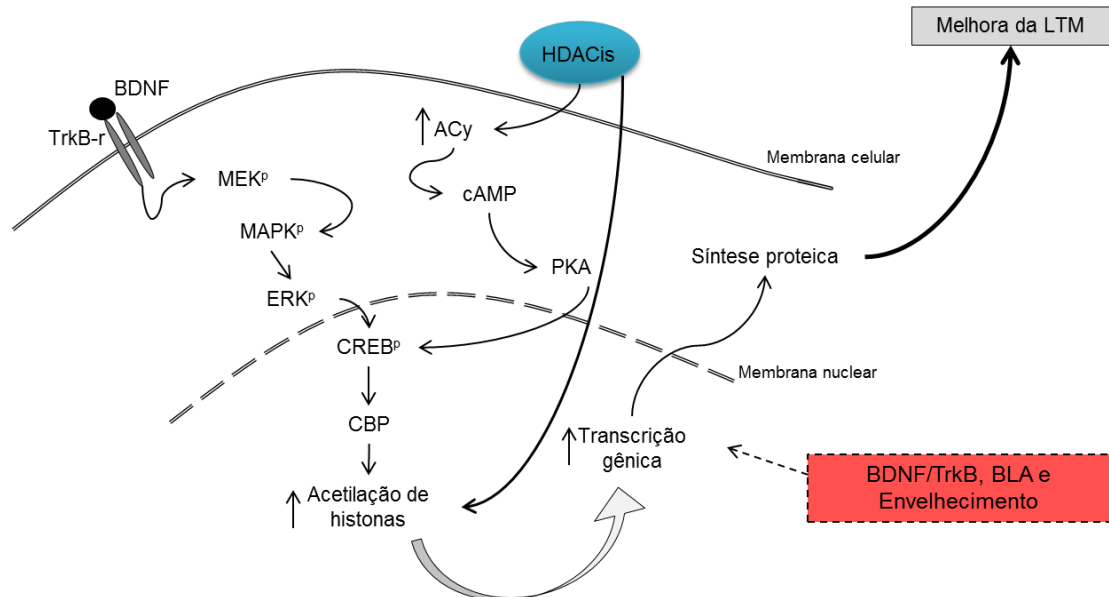


Figura 14. Modelo esquemático dos dados apresentados neste trabalho. A atividade neuronal resulta na ativação de BDNF/TrkB. Intracelularmente, BDNF/TrkB estimula vias de sinalização, como a via da MAPK/ERK, que, no núcleo, fosforilam e ativam CREB e CBP resultando no aumento de acetilação em histonas, no remodelamento da cromatina e no consequente aumento da transcrição gênica e síntese de proteínas envolvidas na plasticidade sináptica. Estes processos culminam na modulação positiva da LTM. Da mesma forma, o tratamento com HDACis em certos momentos durante a formação e consolidação das memórias resulta na melhora significativa da LTM. Esta atividade de HDACis sobre a LTM pode ser explicada em parte pela sua atuação inibindo HDACs e em menor parte pela sua capacidade em agir sobre a atividade de proteínas não-histonas, como a ACy e cAMP. A inibição de HDACs resulta em um estado hiperacetilado das histonas na cromatina o que facilita a transcrição gênica. Conseqüentemente, há um aumento na síntese de proteínas que regulam a consolidação de memórias. Eventos como distúrbios na sinalização por BDNF/TrkB, o envelhecimento e a inativação funcional da região cerebral da BLA, que possui conexão direta com o hipocampo, modulam negativamente a LTM possivelmente agindo sobre estas vias de sinalização.

Fonte: Acervo da autora.

REFERÊNCIAS

ABEL, T.; ZUKIN, R. S. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, p. 57-64, 2008.

ABEL, T. et al. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. **Cell**, v. 88, p. 615-626, 1997.

ALARCON, J. M. et al. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. **Neuron**, v. 42, p. 947-959, 2004.

ALBERINI, C. M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 121-145, 2009.

ALBERINI, C. M.; KANDEL, E. R. The Regulation of Transcription in Memory Consolidation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2014. No prelo.

ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends in Neurosciences**, v. 28, p. 51-56, 2005.

ALBERINI, C. M.; MILEKIC, M.H.; TRONEL, S. Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 999-1008, 2006.

ALONSO, M.; et al. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, p. 663-674, 2002.

BAMBAH-MUKKU, D. et al. A positive autoregulatory BDNF feedback loop via C/EBP β mediates hippocampal memory consolidation. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, p.12547-12559, 2014.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, p. 381-395, 2011.

BANNISTER, A. J. et al. Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. **Current Biology**, v. 10, p. 467-470, 2000.

BANTSCHIEFF, M. et al. Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes. **Nature Biotechnology**, v. 29, p. 255-265, 2011.

BARRETT, R. M. et al. Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 1545-1556, 2011.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, p. 261-277, 2007.

BERNABEU, R. et al. Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. **Neuroreport**, v. 8, p. 2221-2224, 1997a.

BERNABEU, R. et al. Involvement of hippocampal AMPA glutamate receptor changes and the cAMP/protein kinase A/CREB-P signalling pathway in memory consolidation of an avoidance task in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 961-965, 1997b.

BERNABEU, R. et al. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 7041-7046, 1997c.

BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. **Cell**, v. 128, p. 669-681, 2007.

BEVILAQUA, L. et al. Agents that affect cAMP levels or protein kinase A activity modulate memory consolidation when injected into rat hippocampus but not amygdala. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 967-970, 1997.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 6, p. 6-21, 2002.

BISHOP, N. A.; LU, T.; YANKNER, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, v. 464, p. 529-535, 2010.

BLACKWELL, L. et al. The use of diversity profiling to characterize chemical modulators of the histone deacetylases. **Life Sciences**, v. 82, p. 1050-8, 2008.

BOLDEN, J. E.; PEART, M. J.; JOHNSTONE, R. W.. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 769-784, 2006.

BORRELLI, E. et al. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. **Neuron**, v. 60, p. 961-974, 2008.

BOULLE, F. et al. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 17, p. 584-596, 2012.

BRAMHAM, C. R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. **Progress in Neurobiology**, v. 76, p. 99-125, 2005.

BREDY, T. W.; BARAD, M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. **Learning & Memory**, v. 15, p. 39-45, 2008.

BREDY, T. W. et al. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. **Learning & Memory**, v. 14, p. 268-276, 2007.

BRENNER, C.; FUKS, F A methylation rendezvous: reader meets writers. **Developmental Cell**, v. 12, p. 843-844, 2007.

BUCHWALD, M.; KRÄMER, O. H.; HEINZEL, T. HDACi--targets beyond chromatin. **Cancer Letters**, v. 280, p. 160-167, 2009.

CACCAMO, A. et al. CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 22687-22692, 2010.

CAILLAUD, A. et al. Acetylation of interferon regulatory factor-7 by p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor (PCAF) impairs its DNA binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 49417-49421, 2002.

CAMMAROTA, M. et al. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research**, v.76, p. 36-46, 2000.

CAO, X.; SÜDHOF, T. C. A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. **Science**, v. 293, p. 115-120, 2001.

CARON, C.; BOYVAULT, C.; KHOCHBIN, S. Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. **Bioessays**, v. 27, p. 408-415, 2005.

CARONI, P.; CHOWDHURY, A.; LAHR, M. Synapse rearrangements upon learning: from divergent-sparse connectivity to dedicated sub-circuits. **Trends in Neurosciences**, v. 37, p. 604-614, 2014.

CASTELLANO, J. F. et al. Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. **PLoS One**, v. 7, p.33249, 2012.

CASTELLANO, J.F. et al. Reassessing the effects of histone deacetylase inhibitors on hippocampal memory and cognitive aging. **Hippocampus**, v. 24, p. 1006-1016, 2014.

CAZORLA, M. et al. Cyclotraxin-B, the first highly potent and selective TrkB inhibitor, has anxiolytic properties in mice. **PLoS One**, v.5, 2010.

CAZORLA, M. et al. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 1846-1857, 2011.

CHWANG, W.B. et al. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. **Learning & Memory**, v. 13, n. 3, p. 322-8, 2006.

COSMA, M. P.; TANAKA, T.; NASMYTH, K. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. **Cell**, v. 97, p. 299-311, 1999.

COUSENS, L. S.; GALLWITZ, D.; ALBERTS, B. M. Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 1716-23, 1979.

CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K. L. A simple role for BDNF in learning and memory? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 3, 2010.

DAGNAS, M. et al. HDAC inhibition facilitates the switch between memory systems in young but not aged mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 1954-1963, 2013.

DAGNAS, M. et al. Post-training, intra-hippocampal HDAC inhibition differentially impacts neural circuits underlying spatial memory in adult and aged mice. **Hippocampus**, 2014 (No prelo).

DANIEL, P. et al. Pharmacokinetic study of butyric acid administered in vivo as sodium and arginine butyrate salts. **Clinica Chimica Acta**, v. 181, p. 255-263, 1989.

DAS, C.; TYLER, J. K. Histone exchange and histone modifications during transcription and aging. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 332-342, 2013.

DASH, P. K.; ORSI, S. A.; MOORE, A. N. Histone deacetylase inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. **Neuroscience**, v. 163, p. 1-8, 2009.

DAVIE, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2485S-2493S, 2003.

DAY, J. J.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in cognition. **Neuron**, v. 70, p. 813-829, 2011.

DE OLIVEIRA ALVARES, L. et al. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. **Neuroscience**, v. 244, p. 42-48, 2013.

DE RUIJTER, A. J. et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 737-749, 2003.

DUCLOT, F. et al. Mice knock out for the histone acetyltransferase p300/CREB binding protein-associated factor develop a resistance to amyloid toxicity. **Neuroscience**, v. 167, p. 850-863, 2010.

DUDAI, Y The restless engram: consolidations never end. **Annual Review of Neuroscience**, v. 35, p. 227-247, 2012.

DUNNING, J.; DURING, M. J. Molecular mechanisms of learning and memory. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p.1-11, 2003.

EICHENBAUM, H. Is the rodent hippocampus just for 'place'? **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, p.187-195, 1996.

EICHENBAUM, H. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. **Behavioural Brain Research**, v.103, p. 123-133, 1999.

FALKENBERG, K. J.; JOHNSTONE, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, p. 673–691, 2014.

FEDERMAN, N.; FUSTIÑANA, M. S.; ROMANO A. Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. **Learning & Memory**, v. 16, p. 600-606, 2009.

FENG, J. et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 423-430, 2010.

FENRICK, R.; HIEBERT, S. W. Role of histone deacetylases in acute leukemia. **Journal of Cellular Biochemistry. Supplement.**, v. 30-31, p. 194-202,1998.

FINNIN, M. S. et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. **Nature**, v. 401, p. 188–193, 1999.

FISCHER, A. et al. Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 605-617, 2010.

FISCHER, A. et al. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. **Nature**, v. 447, p. 178-182, 2007.

FONTÁN-LOZANO, A. et al. Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 39, p. 193-201, 2008.

FRANCIS, Y. I. et al. Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.18, p. 131-139, 2009.

FUKS, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15, p. 490–495, 2005.

FUSTER, J. M. Distributed memory for both short and long-term. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 70, p. 268-274, 1998.

GLOZAK, M.A. et al. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. **Gene**, v. 363, p. 15–23, 2005.

GOLD, P. E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behavioral and Neural Biology**, v. 46, p. 87-98, 1986.

GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v. 128, p. 635-638, 2007.

GOLL, M. G.; BESTOR, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 481-514, 2005.

GRÄFF, J.; MANSUY, I. M. Epigenetic codes in cognition and behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 192, p. 70-87, 2008.

GRÄFF, J.; TSAI, L. H. Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, p. 97-111, 2013.

GUAN, J. S. et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. **Nature**, v. 459, p. 55-60, 2009.

GUAN, J. S.; XIE, H.; DING, X. The role of epigenetic regulation in learning and memory. **Experimental Neurology**, 2014. No prelo.

GUAN, Z. et al. Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. **Cell**, v. 111, p. 483-493, 2002.

GUPTA, S. et al. Histone methylation regulates memory formation. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, p. 3589–3599, 2010.

GUPTA-AGARWAL, A. V. et al. G9a/GLP histone lysine dimethyltransferase complex activity in the hippocampus and the entorhinal cortex is required for gene activation and silencing during memory consolidation. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 5440–5453, 2012.

GUPTA-AGARWAL, S. et al. NMDA receptor- and ERK-dependent histone methylation changes in the lateral amygdala bidirectionally regulate fear memory formation. **Learning & Memory**, v. 21, p. 351-362, 2014.

HAETTIG, J. et al. HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. **Learning & Memory**, v. 18, p. 71-79, 2011.

HAIGIS, M. C.; GUARENTE, L. P. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. **Genes & Development**, v. 20, p. 2913-2921, 2006.

HAWK, J. D.; FLORIAN, C.; ABEL, T. Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. **Learning & Memory**, v. 18, p. 367–370, 2011.

HE, H.; LEHMING, N. Global effects of histone modifications. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 2, p. 234-43, 2003.

HENIKOFF, S. Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 15-26, 2008.

HODAWADEKAR, S. C.; MARMORSTEIN, R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. **Oncogene**, v. 26, p. 5528-5540, 2007.

HOWE, C. G.; GAMBLE, M. V. Enzymatic cleavage of histone H3: a new consideration when measuring histone modifications in human samples. **Clinical Epigenetics**, v. 7, p. 7, 2015.

HUFF, N. C.; et al. Amygdala regulation of immediate-early gene expression in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, v. 26, p. 1616-1623, 2006.

IGAZ, L. M.; et al. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *Journal of Neuroscience*, v. 22, p. 6781-6789, 2002.

ISHIMARU, N. et al. Differential epigenetic regulation of BDNF and NT-3 genes by trichostatin A and 5-aza-20-deoxycytidine in Neuro-2a cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, p.173–177, 2010.

ITZHAK, Y.; LIDDIE, S.; ANDERSON, K. L. Sodium butyrate-induced histone acetylation strengthens the expression of cocaine-associated contextual memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 102, p. 34-42, 2013.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long term memory. *Behavioural Brain Reserach*, v.103, p. 1-11, 1999.

IZQUIERDO, I. et al. Short and long-term memory are differentially affected by metabolic inhibitors given into hippocampus and entorhinal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 73, p. 141-149, 2000.

IZQUIERDO, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, p. 496-505, 2006.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology Learning Memory**, v. 68, p. 285-316, 1997.

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

JOHNSTONE, R. W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.1, p. 287-99, 2002.

JOSHI, P. et al. The functional interactome landscape of the human histone deacetylase family. **Molecular Systems Biology**, v. 9, p. 672, 2013.

KAAS, G. A. et al. TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. **Neuron**, v. 79, p. 1086-1093, 2013.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, p. 1030-1038, 2001.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. **Molecular Brain**, v. 14, p. 5:14, 2012.

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, p. 381-391, 2000.

KATCHE, C.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J. H. Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 106, p. 40-47, 2013.

KEMENES, G. et al. Phase-dependent molecular requirements for memory reconsolidation: differential roles for protein synthesis and protein kinase A activity. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 6298-6302, 2006.

KERIMOGLU, C. et al. Histone-methyltransferase MLL2 (KMT2B) is required for memory formation in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 3452–3464, 2013.

KILGORE, M. et al. Inhibitors of Class 1 Histone Deacetylases Reverse Contextual Memory Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 870–880, 2010.

KIM, H. J.; LEEDS, P.; CHUANG, D. M. The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, p. 1226-1240, 2009.

KIM, J. S.; SHUKLA, S.D. Acute in vivo effect of ethanol (binge drinking) on histone H3 modifications in rat tissues. **Alcohol and Alcoholism**, v. 41, p. 126-132, 2006.

KIM, M. S. et al. An essential role for histone deacetylase 4 in synaptic plasticity and memory formation. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 10879-10886, 2012.

KONTOPOULOS, E. PARVIN, J. D.; FEANY, M. B. Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Human Molecular Genetics*, v. 15, p. 3012–3023, 2006.

KORZUS, E.; ROSENFELD, M. G.; MAYFORD, M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. **Neuron**, v. 42, p. 961-972, 2004.

KOUZARIDES , T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, p. 693-705, 2007.

KOUZARIDES, T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 9, p. 40-48, 1999.

KRUH, J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 42, p. 65-82, 1982.

LACHNER, M.; JENUWEIN, T. The many faces of histone lysine methylation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, p. 286-298, 2002.

LATTAL, K. M.; BARRETT, R. M.; WOOD, M. A. Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, p. 1125-1131, 2007.

LEE, J. L.; EVERITT, B. J.; THOMAS, K. L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science**, v. 304, p. 839-843, 2004.

LESLIE, J. H.; NEDIVI, E. K. J. Activity-regulated genes as mediators of neural circuit plasticity. **Progress in Neurobiology**, v. 94, p. 223-237, 2011.

LEVENSON, J. M. et al. A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 3933–3943, 2004.

LEVENSON, J. M. et al. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 40545–40559, 2004.

LEVENSON, J. M.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 1009–1016, 2006.

LEVENSON, J. M.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in memory formation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, p. 108–118, 2005.

LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. **Cell**, v. 128, p. 707–719, 2007.

LIYANAGE, V. R. et al. DNA modifications: function and applications in normal and disease States. **Biology (Basel)**, v. 3, p. 670–723, 2014.

LU, Y.; CHRISTIAN, K.; LU, B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, p. 312–323, 2008.

LUBIN, F. D.; ROTH, T. L.; SWEATT, J. D. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 10576–10586, 2008.

LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, p. 251–60, 1997.

MAHAN, A. L. et al. Epigenetic modulation of Homer1a transcription regulation in amygdala and hippocampus with pavlovian fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 4651–4659, 2012.

MALVAEZ, M. et al. HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 2647–2652, 2013.

MARIADASON, J. M.; CORNER, G. A.; AUGENLICHT, L. H. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. **Cancer Research**, v. 60, p. 4561–4572, 2000.

MARKOWITSCH, H. Varieties of memory: systems, structures, mechanisms of disturbance. **Neurology Psychiatry and Brain Research**, v. 5, p. 49-68, 1997.

MARKS, P. A.; XU, W. S. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, p. 600-608, 2009.

MCGAUGH, J. L.; CAHILL, L.; ROOZENDAAL, B. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 13508-13514, 1996.

MCGAUGH, J. L. Memory-a century of consolidation. **Science**, v.287, p. 248-51, 2000.

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends Pharmacological Sciences**, v.21, p.208-210, 2000.

MCGAUGH, J. L. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in Neurosciences**, v. 25, p. 456-461, 2002.

MCQUOWN, S. C. et al. HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 764-774, 2011.

MEDINA, J.H. et al. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? **Behavioural Brain Research**, v. 192, p. 61-69, 2008.

MIKAELSSON, M. A.; MILLER, C. A. The path to epigenetic treatment of memory disorders. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, p. 13-18, 2011.

MILLER, C. A.; CAMPBELL, S. L.; SWEATT, J. D. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, p. 599-603, 2008.

MILLER, C. A.; SWEATT, J. D. Covalent modification of DNA regulates memory formation. **Neuron**, v. 53, p. 857-869, 2007.

MINICHELLO, L. et al. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. **Neuron**, v. 24, p. 401-414, 1999.

MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 38-51, 2006.

MONNERET, C. Histone deacetylase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 40; p. 1-13, 2005.

MONSEY, M. S. et al. Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. **PLoS One**, v. 6, 2011.

MUNSHI, N. et al. Coordination of a transcriptional switch by HMGI(Y) acetylation. **Science**, v. 293, p. 1133-1136, 2001.

MURER, M. G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 63, p. 71-124, 2001.

MUSUMECI, G.; MINICHELLO, L. BDNF-TrkB signalling in fear learning: from genetics to neural networks. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, p. 303-315, 2011.

NADER, K. Memory traces unbound. **Trends in Neurosciences**, v. 26, p. 65-72, 2003.

NDLOVU, M. N.; DENIS, H.; FUKS, F. Exposing the DNA methylome iceberg. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, p. 381-387, 2011.

NÖR, C. et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in combination with brain-derived neurotrophic factor reduces the viability of DAOY human medulloblastoma cells. **Child's Nervous System**, v. 27, p. 897-901, 2011.

NOTT, A.; et al. S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. **Nature**, v. 455, p. 411-415, 2008.

PANG, P. T.; LU, B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. **Ageing Research Reviews**, v. 3, p. 407-430, 2004.

PARTHUN, M. R. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. **Oncogene**, v. 26, p. 5319-5328, 2007.

PEIXOTO, L.; ABEL, T. The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, p. 62-76, 2013.

PELEG, S. et al. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. **Science**, v. 328, p. 753-756, 2010.

PHIEL, C. J. et al. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 36734–36741, 2001.

PHILLIPS, D. M. The presence of acetyl groups of histones. **Biochemical Journal**, v. 87, p. 258-263, 1963.

PLOENSE, K. L. et al. Exposure to histone deacetylase inhibitors during Pavlovian conditioning enhances subsequent cue-induced reinstatement of operant behavior. **Behavioural Pharmacology**, v. 24, p. 164–171, 2013.

PRASAD, K. N.; GILMER, K. N. Demonstration of dopamine-sensitive adenylate cyclase in malignant neuroblastoma cells and change in sensitivity of adenylate cyclase to catecholamines in "differentiated" cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 71, p. 2525-2529, 1974.

PRASAD, K. N.; SINHA, P. K. Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. **In Vitro**, v. 12, p. 125-132, 1976.

POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 24-32, 2001.

QUEVEDO, J. et al. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. **Learning & Memory**, v. 6, p. 600-607, 1999.

RATTINER, L.M. et al. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 4796-4806, 2004.

RAYBUCK, J. D. et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate modulates acquisition and extinction of cocaine-induced conditioned place preference. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 106, p. 109-116, 2013.

REOLON, G. K. et al. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 329-332, 2011.

RESSLER, K. J. et al. Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 7892-7902, 2002.

RICCIO, A. et al. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. **Molecular Cell**, v. 21, p. 283-294, 2006.

RICCIO, A. Dynamic epigenetic regulation in neurons: enzymes, stimuli and signaling pathways. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 1330-1337, 2010.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Introduction: molecular mechanisms of memory formation – from receptor activation to synaptic changes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 521-524, 1999.

RIVERA, C. M.; REN, B. Mapping human epigenomes, **Cell**, v. 155, p. 39-55, 2013.

RIVERO, J. A.; ADUNYAH, S. E. Sodium butyrate stimulates PKC activation and induces differential expression of certain PKC isoforms during erythroid differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 248, p. 664-668, 1998.

RIVERO, J. A.; ADUNYAH, S. E. Sodium butyrate induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase (ERK-1) in human K562 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 796-801, 1996.

ROBERTSON, E. M.; COHEN, D. A. Understanding consolidation through the architecture of memories. **Neuroscientist**, v.12, p. 261-271, 2006.

ROESLER, R.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 905-910, 2002.

ROESLER, R. et al. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 1041-1045, 2004.

ROGGE, G. A. et al. HDAC3 is a negative regulator of cocaine-context-associated memory formation. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 6623-6632, 2013.

ROOZENDAAL, B.; MCREYNOLDS, J. R.; MCGAUGH, J. L. The basolateral amygdala interacts with the medial prefrontal cortex in regulating glucocorticoid effects on working memory impairment. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 1385-1392, 2004.

ROOZENDAAL, B. et al. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, p. 5037-5046, 2010.

ROTH, T. L.; SWEATT, J. D. Epigenetic marking of the BDNF gene by early-life adverse experiences. **Hormones and Behavior**, v. 59, p. 315-320, 2010.

SAARELAINEN, T. et al. Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons have impaired long-term spatial memory but normal hippocampal LTP. **Synapse**, v. 38, p. 102-104, 2000.

SCHONES, D. E.; ZHAO, K. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 179-191, 2008.

SELVI, B. R. et al. Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1799, p. 840-853, 2010.

SILVA, P. F. et al. Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. **Neuroscience**, v. 200, p. 42-49, 2012.

SKAPER, S. D. The Biology of Neurotrophins, Signalling Pathways, and Functional Peptide Mimetics of Neurotrophins and their Receptors. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 7, p. 46-62, 2008.

SPANGE, S. et al. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 185-198, 2009.

STEFANKO, D. P. et al. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 9447-9452, 2009.

STILLING, R. M.; FISCHER, A. The role of histone acetylation in age-associated memory impairment and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, p. 19-26. 2011.

SUI, L. et al. Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, p. 425-440, 2012.

SWANK, M. W.; SWEATT, J. D. Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 3383-3391, 2001.

TAN, M. et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. **Cell**, v. 146, p. 1016-1028, 2011.

TAUBENFELD, S. M. et al. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. **Nature Neuroscience**, v. 4, p. 813-818, 2001.

THOMPSON, R. F.; KIM, J. J. Memory systems in the brain and localization of a memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 13438-13444, 1996.

TIAN, F.; MARINI, A.M.; LIPSKY, R.H. Effects of histone deacetylase inhibitor Trichostatin A on epigenetic changes and transcriptional activation of Bdnf promoter 1 by rat hippocampal neurons. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1199, p. 186-93, 2010.

TIAN, Z. et al. Enhanced top-down characterization of histone post-translational modifications. **Genome Biology**, v. 13, p. R86, 2012.

TSANKOVA, N.M. et al. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. **Nature Neuroscience**, v. 9, p. 519-525, 2006.

TYLER, W. J. et al. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. **Learning & Memory**, v. 9, p. 224-237, 2002.

URDINGUIO, R. G.; SANCHEZ-MUT, J. V.; ESTELLER, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. **The Lancet Neurology**, v. 8, p. 1056-1072, 2009.

VECSEY, C. G. et al. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. **The Journal of Neuroscience**, v.27, p.6128-40, 2007.

WANG, L. et al. Chronic cocaine-induced H3 acetylation and transcriptional activation of CaMKII α in the nucleus accumbens is critical for motivation for drug reinforcement. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 913–928, 2010.

WHITTLE, N.; SINGEWALD, N. HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: where do we stand? **Biochemical Society Transactions**, v. 42, p. 569-581, 2014.

WOOD, M. A. et al. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. **Learning & Memory**, v. 12, p. 111–119, 2005.

WU, X. et al. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 1123-1134, 2008.

YANG, X. J.; GRÉGOIRE, S. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 2873-2884, 2005.

YANG, X. J.; SETO, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. **Oncogene**, v. 26, p. 5310-5318, 2007.

YANO, H.; CHAO, M. V. Neurotrophin receptor structure and interactions. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 74, p. 253-260, 2000.

YEH, S. H.; LIN, C. H.; GEAN, P. W. Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory. **Molecular Pharmacology**, v. 65, p. 1286-1292, 2004.

YOSHII, A.; CONSTANTINE-PATON, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. **Developmental Neurobiology**, v. 70, p. 304–322, 2010.

ZHANG, J.; ZHONG, Q. Histone deacetylase inhibitors and cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 3885-3901, 2014.

ZHANG, L.; FANG, H.; XU, W. Strategies in developing promising histone deacetylase inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, p. 585-602, 2010.

ZHOU, P. et al. Histone cleavage as a mechanism for epigenetic regulation: current insights and perspectives. **Current Molecular Medicine**, v. 14, p. 1164-1172, 2014.

ANEXO A



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 120068

Data da Versão do Projeto: 20/03/2012

Pesquisadores:

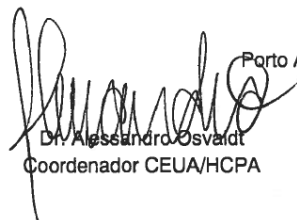
ARETHUZA DA SILVA DORNELLES

RAFAEL ROESLER

Título: PAPEL DA AMÍGDALA NA MODULAÇÃO DA MEMÓRIA POR TERAPIAS
EPIGENÉTICAS EXPERIMENTAIS

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.



Dr. Alessandro Osvaldt
Coordenador CEUA/HCPA

Porto Alegre, 29 de março de 2012.

ANEXO B



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 120424

Data da Versão do Projeto: 20/11/2012

Pesquisadores:

RAFAEL ROESLER

ALINE WERENICZ

MARTINA BLANK

ARETHUZA DA SILVA DORNELLES

ANA CLÁUDIA FEDI

Título: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE BUTIRATO SÓDICO DURANTE A
FORMAÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE ESQUIVA INIBITÓRIA EM RATOS E
SEUS EFEITOS SOBRE A ACETILAÇÃO DE HISTONAS

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 08 de janeiro de 2013.

Dr. Alessandro Qsvaldt
Coordenador CEUA/HCPA

ANEXO C



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 130381

Data da Versão do Projeto: 06/10/2013

Pesquisadores:

RAFAEL ROESLER

MARTINA BLANK

ARETHUZA DA SILVA DORNELLES

Título: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO BDNF COM A REGULAÇÃO EPIGENÉTICA ENVOLVIDA NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA NA TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 05 de dezembro de 2013.

Dr. Alessandro Osvaldi
Coordenador CEUA/HCPA

APÊNDICE A

Martina Blank

Curriculum Vitae

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1723737388747487>

Última atualização: 30/05/2015

Formação acadêmica/titulação

- 2011** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: MECANISMOS EPIGENÉTICOS NA FORMAÇÃO DE MEMÓRIA AVERSIVA
Orientador: Rafael Roesler
- 2008 - 2009** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
Título: Padronização de um paradigma comportamental de esquiva inibitória para zebrafish (Danio rerio Hamilton, 1822), Ano de obtenção: 2009
Orientador: Mônica Ryff Moreira Roca Vianna
Bolsista do(a): PUCRS
- 2002 - 2007** Graduação em Ciências Biológicas.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
-

Formação complementar

- 2014 - 2014** Curso de curta duração em MALDI-TOF Tissue Imaging Training Course.
Bruker Daltonics Inc. , Bruker, Billerica, Estados Unidos
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em MALDI-TOF Operator Course.
Bruker Daltonics Inc. , Bruker, Billerica, Estados Unidos
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Protein NMR.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Técnica de LC-MS/MS e suas aplicações.
Centro de Espectrometria de Massas Aplicada, CEMSA, Sao Paulo, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em LC/MS & LC/MS/MS.
Congresso Latino-Americano de Cromatografia e técnicas relacionadas,

COLACRO, Brasil

- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Mechanisms of neuroplasticity.
Centro Interdisciplinar de Neurociencias, Universidad de Valparaiso, Chile, CNV, Chile
- 2009 - 2009** Extensão universitária em Cuidados e Manejo de Animais de Experimentação.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Receptores de Membrana e a Tradução do Sinal.
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em The gain in the Brain lies mainly in the stain.
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Boas práticas de segurança no laboratório-módulo1.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Credenciamento ao CEMM.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
- 2004 - 2005** Extensão universitária em Ciências Biológicas.
Eberhard Karls Universität Tübingen, UT, Tübingen, Alemanha
Bolsista do(a): Landesstiftung Baden-Württemberg
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Comportamento de Felinos Selvagens.
Sociedade Brasileira de Etologia, SBET, Uberlandia, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Biólogo , Carga horária: 40, Regime: Integral

2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2011 - Atual Vínculo: livre , Enquadramento funcional: Doutorando , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

09/2011 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde
Linhas de pesquisa:
Biologia Molecular da Memória , Epigenética e Memória

3. NeuroAssay Pesquisa e Desenvolvimento - NeuroAssay

Vínculo institucional

2009 - 2011 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Pesquisadora Associada, Regime: Dedicção exclusiva

4. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Mestrado , Enquadramento funcional: Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

2007 - 2008 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Programa de Educação Continuada , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2007 - 2007 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Monitoria , Carga horária: 2, Regime: Parcial

2006 - 2006 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Bolsista BPA/PUCRS, Regime: Dedicção exclusiva

2006 - 2007 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Bolsista FAPERGS, Regime: Dedicção exclusiva

2006 - 2006 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Monitoria , Carga horária: 6, Regime: Parcial

2005 - 2005 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Monitoria , Carga horária: 4, Regime: Parcial

2005 - 2007 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Regime: Dedicção exclusiva

2004 - 2004 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Monitoria , Carga horária: 4, Regime: Parcial

2002 - 2002 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estagiário, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

03/2008 - 08/2009 Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Biociências

Linhas de pesquisa:

Memória em Zebrafish , Biologia Molecular da Memória , Memória e Aprendizado

09/2007 - 02/2008 Extensão Universitária, Faculdade de Biociências

Especificação:

Atividades de pesquisa em projeto no Lab. de Biologia do Desenvolvimento do Sistema Nervoso.

04/2006 - 07/2007 Estágio, Faculdade de Biociências, Departamento de Ciências morfológicas

Estágio:

Bolsista BPA/PUCRs e BIC/FAPERGS para desenvolvimento de atividades em projetos de pesquisas no Lab.de Biologia do Desenvolvimento do Sistema Nervoso.

04/2002 - 12/2002 Estágio, Faculdade de Biociências

Estágio:

Estágio voluntário no Laboratório de Ecologia Florestal

5. Max Planck Institute for Developmental Biology - MPI

Vínculo institucional

2004 - 2005 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Scientific helper student - HiWi , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

12/2004 - 06/2005 Estágio, Department of Molecular Biology

Estágio:

Genes Hox em Drosophila melanogaster

12/2004 - 06/2005 Pesquisa e Desenvolvimento, Department of Molecular Biology

Linhas de pesquisa:

Genes Hox em Drosophila melanogaster

6. Eberhard Karls Universtiät Tübingen - EKU

Vínculo institucional

2004 - 2005 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estágio voluntário ,
Carga horária: 16, Regime: Parcial

Atividades

11/2004 - 03/2005 Pesquisa e Desenvolvimento, Interfakultäres Institut für Zellbiologie,
Department of Molecular Biology

Linhas de pesquisa:

Migração Celular , Moléculas de adesão celular em neurônios

7. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul - FZB/RS

Vínculo institucional

2003 - 2004 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Bolsista CNPQ- ITI , Carga
horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

04/2004 - 04/2004 Outra atividade técnico-científica, Fundação Zoobotânica do Rio
Grande do Sul

Especificação:

Monitora da I Jornada de Iniciação Científica - Meio Ambiente

05/2003 - 05/2004 Estágio, Museu de Ciências Naturais

Estágio:

*Projeto de pesquisa: Estudo florístico comparativo do componente
arbóreo das formações florestais nas regiões das lagoas do
Casamento e do Cerro, Planície Costeira do RS.*

Linhas de pesquisa

1. Biologia Molecular da Memória
2. Memória e Aprendizado
3. Memória em Zebrafish
4. Biologia Molecular da Memória

5. Epigenética e Memória
6. Genes Hox em *Drosophila melanogaster*
7. Migração Celular
8. Moléculas de adesão celular em neurônios

Projetos

Projetos de pesquisa **2011 - Atual** MECANISMOS EPIGENÉTICOS NA
FORMAÇÃO DE MEMÓRIA AVERSIVA

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Martina Blank (Responsável); ; Rafael Roesler

2008 - 2009 Análise da expressão das caderinas 1 e 2 na memória da tarefa de esQUIVA
inibitória em zebrafish (*Danio rerio*)

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);
Integrantes: Martina Blank; Monica Vianna (Responsável)
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Pontificia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS
Número de produções C,T & A: 2/

2006 - Atual Papel de moléculas de adesão celular na plasticidade sináptica responsável pela
formação de memórias no hipocampo.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2);
Integrantes: Martina Blank; Monica Vianna (Responsável)

2006 - 2006 Moléculas de adesão celular na formação de memórias no hipocampo.

Descrição: Caracterização dos mecanismos de adesão celular mediados por moléculas de
adesão como caderinas e outras CAMs no sistema nervoso envolvidos com o aprendizado e
manutenção de memórias em roedores.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1);
Integrantes: Martina Blank; Monica Vianna (Responsável)

2006 - 2007 Moléculas de adesão celular na formação de memórias no hipocampo de
vertebrados.

Descrição: Caracterização dos mecanismos de adesão celular mediados por moléculas de
adesão como caderinas e outras CAMs no sistema nervoso envolvidos com o aprendizado e
manutenção de memórias em roedores.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2);
Integrantes: Martina Blank; Monica Vianna (Responsável)

Projetos de desenvolvimento tecnológico 2009 - 2011

Síntese e desenvolvimento pré-clínico de análogos estruturais de um antidepressivo tricíclico modificado e de butiratos como compostos terapêuticos candidatos para o tratamento de doenças neurológicas e psiquiátricas e câncer

Descrição: Auxílio concedido à NeuroAssay Pesquisa e Desenvolvimento Ltda. - Edital MCT/SETEC/CNPq No 67/2008 - RHAE - Pesquisador na Empresa.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de desenvolvimento tecnológico

Integrantes: Martina Blank; Rafael Roesler (Responsável)

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Áreas de atuação

1. Citologia e Biologia Celular
2. Biologia Molecular
3. Morfologia
4. Memória e Aprendizado
5. Espectrometria de massas

Idiomas

Alemão	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Bem , Lê Bem
Inglês	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
Espanhol	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Razoavelmente
Francês	Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Razoavelmente , Lê Razoavelmente

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. BLANK, M., WERENICZ, A., VELHO, L. A., PINTO, D. F., FEDI, A. C., LOPES, M. W., PERES, T. V., LEAL, R. B., DORNELLES, A.S., ROESLER, R.
Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged

rats. *Neuroscience Letters (Print)*. , v.594, p.76 - 81, 2015.

2. BLANK, M., DORNELLES, A.S., WERENICZ, A., VELHO, L. A., PINTO, D. F., FEDI, ANA CLÁUDIA, SCHRODER, N., ROESLER, R., ROESLER, R.

Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory (Print)*. , v.111, p.1 - 8, 2014.

3. PAGNUSSAT, NATÁLIA, PIATO, ANGELO L., SCHAEFER, ISABEL C., **Blank, Martina**, TAMBORSKI, ANGÉLICA R., Guerim, Laura D., BONAN, CARLA D., VIANNA, MÔNICA R.M., LARA, DIOGO R.

One for All and All for One: The Importance of Shoaling on Behavioral and Stress Responses in Zebrafish. *Zebrafish (Larchmont, NY)*. , v.10, p.338 - 342, 2013.

4. BAPTISTA, PEDRO PORTO ALEGRE, DE SENNA, PRISCYLLA NUNES, PAIM, MARIANA FONTOURA, SAUR, LISIANI, **Blank, Martina**, NASCIMENTO, PATRICIA DO, ILHA, JOCEMAR, VIANNA, MÔNICA RYFF MOREIRA, MESTRINER, RÉGIS GEMERASCA, ACHAVAL, MATILDE, XAVIER, LÉDER LEAL

Physical exercise down-regulated locomotor side effects induced by haloperidol treatment in Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. , v.104, p.113 - 118, 2013.

5. WERENICZ, A., CHRISTOFF, R. R., **BLANK, M.**, JOBIM, P. F. C., PEDROSO, T. R., REOLON, G. K., SCHRODER, N., ROESLER, R.

Administration of the phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram into the amygdala at a specific time interval after learning increases recognition memory persistence. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor Online)*. , v.19, p.495 - 498, 2012.

6. RICHETTI, S.K., **BLANK, M.**, CAPIOTTI, K.M., PIATO, A.L., BOGO, M.R., VIANNA, M.R., BONAN, C.D.

Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behavioural Brain Research*. , v.217, p.10 - 15, 2011.

7. **BLANK, MARTINA**, GUERIM, LAURA D., CORDEIRO, REINALDO F., VIANNA, MONICA R.M.

A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. , v.92, p.529 - 534, 2009.

8. HUEBER, S. D., BEZDAN, D., HENZ, S. R., **BLANK, M.**, WU, H., Lohmann. I.

Comparative analysis of Hox downstream genes in *Drosophila*. *Development (Cambridge)*. , v.134, p.381 - 392, 2007.

Capítulos de livros publicados

1. **BLANK, M.**, VIANNA, M. R.

Peixes como animais-modelo na pesquisa: cuidados básicos para manutenção do bem-estar do peixe-zebra (*Danio rerio*) In: *Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos*. 1 ed. Porto Alegre : EdIPUCRS, 2010, v.1, p. 1-421.

Produção técnica

Produtos tecnológicos

1. CAMPO, L. F., ROESLER, R., KAPCZINSKI, F., **BLANK, M.**, de LIMA, M. N.
Derivados de tianeptina, composições farmacêuticas, uso, e processo para sua produção., 2011

Demais trabalhos

1. Soares, M., BLANK, M., Mattos, R., Vianna, M.
An evolutionary perspective on myelin, 2006.

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. BLANK, M.

Participação em banca de Aline Werenicz. **Papel da inibição da fosfodiesterase-4 na amígdala basolateral durante a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.**, 2011
(Biomedicina) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre