

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**INTERAÇÃO FUNCIONAL ENTRE O BLOQUEIO DO RECEPTOR DO
PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA E A INIBIÇÃO DE HISTONAS
DESACETILASES NA FORMAÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA**

FERNANDA DOS SANTOS PETRY

Porto Alegre

Setembro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**INTERAÇÃO FUNCIONAL ENTRE O BLOQUEIO DO RECEPTOR DO
PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA E A INIBIÇÃO DE HISTONAS
DESACETILASES NA FORMAÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA**

FERNANDA DOS SANTOS PETRY

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre

Setembro de 2015

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Experimentação Animal e no Laboratório de Câncer e Neurobiologia do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; projetos 484185/2012-8, 303276/2013-4 e 400705/2014-1, concedidos a Rafael Roesler), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul (ICI-RS), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA; projeto 140067) e National Science Foundation (IOS 1121886).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Rafael Roesler, pela oportunidade de trabalho, orientação, aprendizado científico, confiança e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Câncer e Neurobiologia pela troca de experiências e pela convivência. Agradeço especialmente à Arethusa Dornelles, Martina Lichtenfels, Martina Blank, Fernanda Valiati e Caroline de Farias que contribuíram em diferentes etapas deste trabalho, desde o planejamento até a realização das cirurgias e dos experimentos.

À professora Marise Parent pelo interesse e disponibilidade sempre demonstrados, mesmo durante o curto período de convivência, e por sua importante contribuição neste trabalho.

À Unidade de Experimentação Animal do HCPA pela estrutura disponibilizada e a sua equipe pelo suporte sempre presente.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela formação acadêmica de excelência.

À minha família, especialmente aos meus pais, por todo apoio e incentivo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Aprendizado e memória.....	12
1.1.1. <i>Consolidação da memória</i>	13
1.1.2. <i>Extinção da memória</i>	14
1.1.3. <i>Esquiva inibitória</i>	15
1.2. Peptídeo liberador de gastrina e seu receptor	17
1.2.1. <i>Regulação da memória por GRPR</i>	19
1.2.2. <i>Mecanismos moleculares associados à modulação da memória por GRPR</i>	20
1.2.3. <i>GRPR e BDNF</i>	21
1.2.4. <i>Alterações na expressão e na sinalização por GRPR em desordens cerebrais</i> . 22	
1.3. Acetilação de histonas.....	23
1.3.1. <i>Histonas desacetilases</i>	26
1.3.2. <i>Inibidores de histonas desacetilases como facilitadores cognitivos</i>	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. RESULTADOS	30
<i>Histone deacetylase inhibition prevents the impairing effects of hippocampal gastrin-releasing peptide receptor antagonism on memory consolidation and extinction</i>	32

4. RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	55
4.1. Avaliação dos níveis hipocâmpais de BDNF.....	55
4.1.1. <i>Material e métodos</i>	55
4.1.2. <i>Resultados</i>	56
4.2. Avaliação dos níveis hipocâmpais de H3 acetilada	57
4.2.1. <i>Material e métodos</i>	57
4.2.2. <i>Resultados</i>	58
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CURRICULUM VITAE RESUMIDO	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (do inglês, <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid</i>)
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BRS-3	Receptor de bombesina subtipo 3 (do inglês, <i>bombesin receptor subtype-3</i>)
CaMKII	Proteína cinase II dependente de cálcio-calmodulina (do inglês, <i>calcium-calmodulin-dependent protein kinase II</i>)
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta a AMPC (do inglês, <i>cAMP response element-binding protein</i>)
D1R	Receptor de dopamina D1 (do inglês, <i>D1 receptor</i>)
EI	Esquiva inibitória
ERK	Proteína cinase regulada por sinal extracelular (do inglês, <i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>)
IA	<i>Inhibitory avoidance</i>
FGFR	Receptor do fator de crescimento de fibroblasto básico (do inglês, <i>basic fibroblast growth factor receptor</i>)
GR	Receptor de glicocorticoide (do inglês, <i>glucocorticoid receptor</i>)
GRP	Peptídeo liberador de gastrina (do inglês, <i>gastrin-releasing peptide</i>)
GRPR	Receptor do peptídeo liberador de gastrina (do inglês, <i>gastrin-releasing peptide receptor</i>)
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona desacetilase
HDACi	<i>Histone deacetylase inhibitor</i>
iHDAC	Inibidor de histona desacetilase
LTP	Potenciação de longa duração (do inglês, <i>long-term potentiation</i>)
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato (do inglês, <i>metabotropic glutamate receptor</i>)

MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
NaB	Butirato de sódio
NMB	Neuromedina B
NMC	Neuromedina C
NMBR	Receptor de neuromedina B (do inglês, <i>neuromedin B receptor</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartato
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase (do inglês, <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PKA	Proteína cinase A (do inglês, <i>protein kinase A</i>)
PKC	Proteína cinase C (do inglês, <i>protein kinase C</i>)
PLC	Fosfolipase C (do inglês, <i>phospholipase C</i>)
SAHA	Ácido suberoilânilida hidroxâmico (do inglês, <i>suberoylanilide hydroxamic acid</i>)
SAL	Salina
SNC	Sistema nervoso central
TSA	Tricostatina A
VPA	Ácido valpróico (do inglês, <i>valproic acid</i>)

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Representação do treino na tarefa de esQUIVA inibitória.....	16
Figura 2. Diferentes processos de reconsolidação e de extinção desencadeados após a evocação da memória aversiva	16
Figura 3. Representação da estrutura do GRPR e sua disposição transmembrana.....	18
Figura 4. Mecanismos de sinalização intracelular propostos para a regulação de GRPR na consolidação da memória aversiva em hipocampo dorsal	21
Figura 5. Estrutura do nucleossomo e representação de resíduos alvo de modificações pós-traducionais	24
Figura 6. Efeito dos inibidores de HDACs no remodelamento da cromatina e na transcrição	25

RESULTADOS

Figure 1. The HDACi NaB prevents the impairment of IA memory consolidation induced by GRPR antagonism in the dorsal hippocampus.....	51
Figure 2. The HDACi NaB prevents the impairment of IA memory extinction induced by GRPR antagonism in the dorsal hippocampus.....	52
Figure 3. Intrahippocampal infusions of the HDACi NaB followed by the GRPR antagonist RC-3095 increases BDNF levels in the hippocampus of rats trained in IA ..	53
Figure 4. Infusion placements into the dorsal hippocampus.....	54

RESULTADOS COMPLEMENTARES

Figura 1. Infusões intra-hipocampais de NaB e de RC-3095 aumentam os níveis de BDNF no hipocampo	57
Figura 2. Infusões intra-hipocampais de NaB e de RC-3095 não alteram os níveis de H3 acetilada no hipocampo.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações associadas a GRPR em pacientes com desordens do SNC.....	23
Tabela 2. Classes de inibidores de HDACs e respectivas seletividades de ação sobre HDACs	27

RESUMO

Neuropeptídeos são importantes moléculas sinalizadoras cerebrais que desempenham função na regulação de memórias motivadas emocionalmente, influenciando sua aquisição, consolidação, expressão e extinção. O peptídeo liberador de gastrina se liga seletivamente a seu receptor de membrana, o receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR), que atua como regulador molecular de funções cerebrais, como formação da memória, respostas emocionais e plasticidade sináptica. Evidências apontam para uma possível interação funcional entre GRPR e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina envolvida em processos comuns ao GRPR. A acetilação de histonas, tipo de modificação da cromatina indiretamente regulada pela inibição de histonas desacetilases (HDACs) e que resulta em aumento na transcrição gênica, também está associada à formação da memória no hipocampo. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi avaliar uma possível interação entre o bloqueio de GRPR e a regulação da cromatina pela inibição de HDACs na consolidação e na extinção da memória aversiva, bem como nos níveis hipocampais de BDNF e de acetilação da histona H3. Ratos Wistar machos receberam infusões bilaterais no hipocampo dorsal de salina ou do inibidor de HDACs butirato de sódio (NaB; 100 mM) e de salina ou do antagonista de GRPR RC-3095 (1µg/0,5µl), respectivamente, antes e imediatamente após o treino na tarefa de esquiva inibitória. Em um segundo experimento, as infusões das mesmas drogas foram realizadas antes e imediatamente após o teste de retenção que serviu como treino de extinção. Os efeitos prejudiciais sobre a consolidação e sobre a extinção da memória aversiva induzidos pelo RC-3095 foram prevenidos pela infusão de NaB. Além disso, observou-se aumento no BDNF hipocampal após infusões de NaB seguidas de RC-3095, embora nenhuma alteração tenha sido observada nos níveis de H3 acetilada após esses tratamentos. Esses resultados indicam que os efeitos prejudiciais induzidos pelo bloqueio de GRPR na formação e na extinção da memória aversiva podem ser prevenidos pela inibição de HDACs, e que este efeito protetor pode ser relacionado a níveis hipocampais aumentados de BDNF. Em conclusão, uma disfunção na via de sinalização por GRP/GRPR pode ser compensada por mecanismos epigenéticos para possibilitar processos relacionados à memória no hipocampo.

ABSTRACT

Neuropeptides are important brain signaling molecules that play a role in the regulation of emotionally-motivated memories, influencing their acquisition, consolidation, expression and extinction. Gastrin-releasing peptide selectively binds to its membrane receptor, the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), which acts as a molecular regulator of brain functions, including memory formation, emotional responses and synaptic plasticity. Findings suggest a possible functional interaction between GRPR and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin involved in common processes to GRPR. Histone acetylation, a type of chromatin modification indirectly regulated by the inhibition of histone deacetylases (HDACs) that results in an increase in gene transcription, has been also associated to memory formation in the hippocampus. Based on this, the objective of the present study was to evaluate a possible interaction between GRPR blockade and chromatin regulation by the inhibition of HDACs in the consolidation and extinction of aversive memory, as well as on hippocampal BDNF and acetylated histone H3 levels. Male Wistar rats received bilateral infusions into the dorsal hippocampus of saline or the HDAC inhibitor sodium butyrate (NaB; 100 mM) and saline or the GRPR antagonist RC-3095 (1 μ g/0.5- μ l), respectively, before and immediately after the training in inhibitory avoidance. In a second experiment, the infusions of the same drugs were given before and immediately after a retention test trial that served as extinction training. RC-3095-induced impairing effects on consolidation and extinction of aversive memory were prevented by the infusion of NaB. In addition, it was observed an increase in hippocampal BDNF after infusions of NaB followed by RC-3095, whereas no effect was observed in H3 acetylated levels after these treatments. The results suggest that impairing effects induced by GRPR blockade on formation and extinction of aversive memory can be prevented by HDAC inhibition, and that this protective effect could be related to increased hippocampal BDNF levels. In conclusion, a dysfunction in GRP/GRPR signaling pathway can be compensated by epigenetic mechanisms to allow processes related to memory in hippocampus.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aprendizado e memória

A habilidade de aprender, formar memórias e armazená-las por períodos variáveis é uma das funções cerebrais mais importantes para a adaptação e para a sobrevivência (Alberini & Kandel, 2015). O aprendizado é definido como o processo biológico de aquisição de novos conhecimentos ou informações, enquanto que a memória corresponde ao processo de retenção e reconstrução deste conhecimento ao longo do tempo. Sendo assim, pode-se afirmar que nós somos quem somos em grande parte em razão do que aprendemos, lembramos e também do que esquecemos (Kandel *et al.*, 2014).

De acordo com seu conteúdo, as memórias podem ser classificadas em declarativas ou explícitas e procedurais ou implícitas (Squire, 1992). A memória explícita (que corresponde à memória para fatos, eventos, pessoas, lugares e objetos) envolve a participação da consciência e necessita do lobo temporal medial e do hipocampo. Já a memória implícita (para habilidades motoras e perceptivas) não depende da consciência e envolve diferentes sistemas cerebrais, como o cerebelo, o estriado e a amígdala (Squire, 1992; Kandel, 2012; Kandel *et al.*, 2014).

Considerando o tempo durante o qual são retidas, pode-se, ainda, fazer a distinção entre memórias de curta e de longa duração (McGaugh, 1966; Izquierdo *et al.*, 1999). A retenção da informação por um breve período de tempo, de segundos a horas, sem a criação de alterações neurais que possibilitem a evocação a longo prazo caracteriza as memórias de curta duração. Já a ocorrência de alterações em vias neurais após o aprendizado que possibilitem o armazenamento das informações para a evocação dias, semanas, meses e anos mais tarde define as memórias de longa duração. Uma característica importante que distingue esses dois tipos de memória é que a formação de memórias de longa duração depende de uma fase temporalmente limitada de síntese de RNA e de proteínas (Alberini, 2009).

1.1.1. Consolidação da memória

A formação de memórias de longa duração não se dá de maneira imediata após o aprendizado. Inicialmente, essas memórias são lábeis, sendo suscetíveis à interferência por diversos fatores, como traumas, aprendizados adicionais, inativação neuronal, lesões cerebrais, inibição do processo de transcrição ou de fatores de transcrição específicos, inibição da tradução ou, ainda, bloqueio seletivo de determinadas vias moleculares. A partir do processo de consolidação, as memórias se tornam, então, estáveis e resistentes a interrupções (Alberini *et al.*, 2006).

Diferentes regiões cerebrais são progressivamente envolvidas durante a consolidação da memória, o que indica que este processo seja mantido por alterações temporais e espaciais, ocorrendo por um período extenso (Alberini, 2005). Dois níveis ou estágios diferentes de consolidação podem ser considerados: (1) a consolidação celular ou sináptica, caracterizada por eventos moleculares e celulares precoces que ocorrem logo após a aquisição da nova informação em regiões cerebrais específicas, como o hipocampo; (2) a consolidação sistêmica, mais lenta, que envolve a participação de regiões neocorticais (e suas interações com estruturas do lobo temporal medial), as quais reorganizam a informação recentemente aprendida para que se estabilize um traço mnemônico mais distribuído (Dudai & Morris, 2000; Medina *et al.*, 2008).

Muitos dos mecanismos moleculares básicos necessários para o aprendizado e para a consolidação da memória são relacionados à indução e à manutenção da potenciação de longa duração (LTP). Na área CA1 do hipocampo, as sinapses ativadas pelo aprendizado passam por uma facilitação duradoura desencadeada pela ativação de receptores glutamatérgicos dos tipos N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e metabotrópicos (mGluR), assim como pela ativação de vias de sinalização por proteínas cinases, que tem como consequência a síntese de proteínas, alterações na expressão gênica, reforço estrutural de sinapses ativadas e o desenvolvimento de novas conexões sinápticas. Mais especificamente, os eventos moleculares iniciais desencadeados pela ativação desses receptores excitatórios incluem a ativação das seguintes vias de sinalização: proteína cinase II dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII), fosfolipase C (PLC)/proteína cinase C (PKC), monofosfato cíclico de adenosina (AMPC)/proteína cinase A (PKA), proteína cinase ativada por mitógeno

(MAPK)/proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K). A fase tardia da LTP e a consolidação da memória dependem da ativação induzida por PKA da proteína de ligação ao elemento de resposta a AMPc (CREB), síntese de novo de proteínas e expressão de genes imediatos específicos, como c-fos, Arc e zif268, assim como síntese de neurotrofinas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Izquierdo *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2008; Roesler & McGaugh, 2010). Além desses eventos no hipocampo, diferentes alterações moleculares em outras estruturas cerebrais, como na amígdala basolateral, córtex parietal e entorrinal, são cruciais para o processo de consolidação (Izquierdo *et al.*, 2006).

Após ser estabilizada, uma memória pode tornar-se lábil novamente se reativada, por exemplo, a partir de sua evocação. O processo ativo de estabilização da memória após sua evocação é denominado de reconsolidação. Este processo, no entanto, não corresponde a uma nova consolidação, embora se assemelhe a sua função de armazenamento e a alguns mecanismos subjacentes relativos à síntese proteica (Tronson & Taylor, 2007).

1.1.2. Extinção da memória

Muitas memórias podem ser adquiridas por meio da associação de um estímulo a outro ou a uma resposta. A partir da observação de que a apresentação de comida (estímulo incondicionado) a um cachorro provocava uma resposta natural de salivação (resposta incondicionada), Pavlov (1927) descreveu que a apresentação de um estímulo neutro, como o som de um sino, junto à apresentação da comida, levaria à associação entre estes dois estímulos. Dessa forma, a apresentação apenas do som do sino (estímulo condicionado) levaria à resposta de salivação (resposta condicionada). No condicionamento clássico ou Pavloviano, então, ocorre o desenvolvimento de uma resposta condicionada a um estímulo originalmente neutro. Entretanto, a apresentação repetida do estímulo condicionado sem o seu reforço, o estímulo incondicionado, leva à extinção da resposta condicionada correspondente (Sweatt, 2010).

O processo de extinção não consiste em uma forma de esquecimento ou na atenuação da memória previamente formada (a qual pode ser recuperada espontaneamente), mas sim em um novo aprendizado resultante de uma nova associação: o

estímulo condicionado agora associado à ausência do incondicionado (Cammarota *et al.*, 2004; Myskiw *et al.*, 2014).

A extinção da memória, assim como outros aprendizados, ocorre em três fases: aquisição, consolidação e evocação. A aquisição corresponde ao aprendizado inicial da nova associação. Subsequente a esta fase, ocorre a consolidação, em que a nova memória é estabilizada a partir de diversos processos moleculares. Finalmente, a apresentação do estímulo condicionado desencadeia a evocação da nova memória formada, a qual é percebida pelos baixos níveis da resposta condicionada anterior (Quirk & Mueller, 2008).

O processo de extinção tem importante participação no tratamento de distúrbios relacionados a memórias de medo, como fobias, pânico, ansiedade generalizada e, principalmente, transtorno do estresse pós-traumático, sendo a base da chamada terapia de exposição (Cammarota *et al.*, 2004; Myskiw *et al.*, 2014).

1.1.3. Esquiva inibitória

A tarefa de esquiva inibitória (EI) envolve a formação de uma memória motivada emocionalmente de caráter aversivo. Durante a sessão de treino, o animal aprende a associar sua descida da plataforma para a grade com o estímulo aversivo de um leve choque nas patas, estabelecendo, assim, uma resposta condicionada ao aprender a evitar o choque (Figura 1). Quando exposto novamente ao mesmo contexto, o animal tende a permanecer mais tempo sobre a plataforma, inibindo seu comportamento natural de explorar além deste local, sem afetar seu comportamento exploratório enquanto na plataforma (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2006). A retenção da memória é medida em sessões de teste por meio do tempo gasto pelo animal na plataforma até descer para a grade.

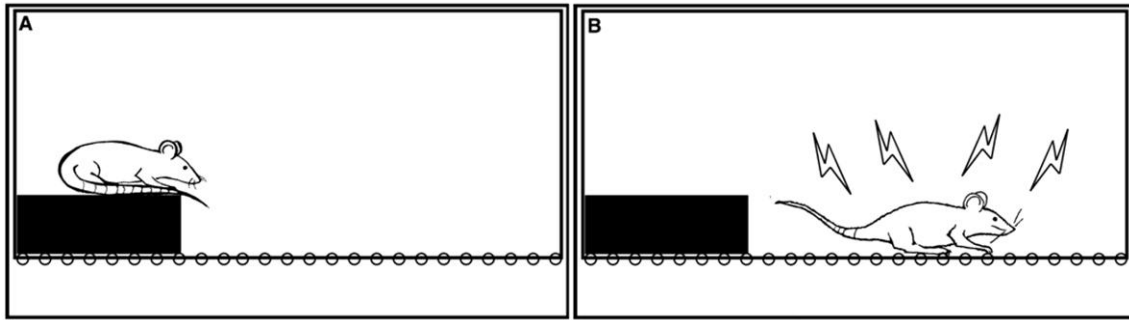


Figura 1. Representação do treino na tarefa de esquivamento inibitório. (A) O animal é colocado sobre a plataforma. (B) No momento em que desce para a grade, o animal recebe leves choques nas patas (Adaptado de Bekinschtein *et al.*, 2008).

A evocação da memória de medo, durante a sessão de teste, pode desencadear diferentes processos de reconsolidação e de extinção. No primeiro caso, a reexposição do animal ao contexto em que a memória foi formada, pode fazer com que ela se torne lábil novamente, sendo necessário reconsolidá-la (Figura 2a). Alternativamente, a evocação da memória sem o seu reforço, ou seja, a exposição do animal ao contexto na ausência do estímulo aversivo do choque pode desencadear a extinção da memória de medo (Figura 2b) (Cammarota *et al.*, 2004; Radulovic & Tronson, 2011). A consolidação da extinção da memória pode ser observada a partir de sucessivos testes.

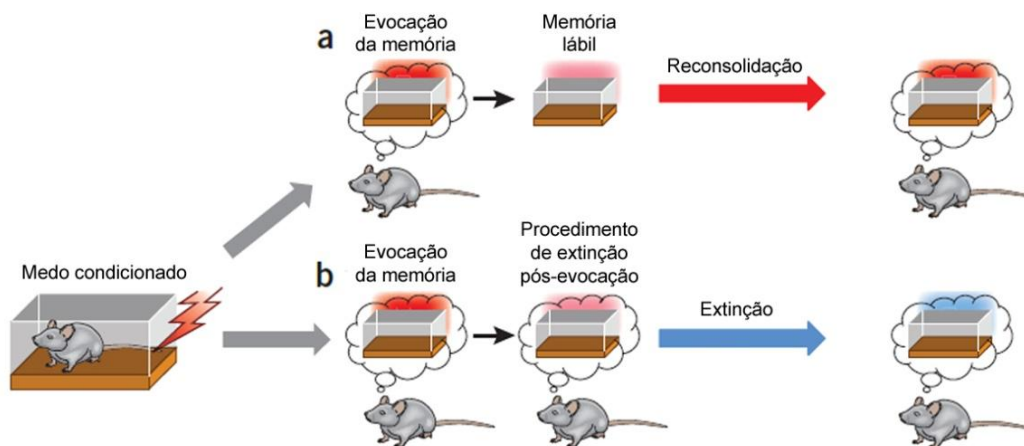


Figura 2. Diferentes processos de reconsolidação e de extinção desencadeados após a evocação da memória aversiva. (a) A reexposição do animal ao contexto em que a memória foi formada torna essa memória lábil novamente e ela seguirá o processo de reconsolidação. (b) Quando um procedimento de extinção se segue à evocação da memória, a memória formada durante a extinção (em azul) se sobrepõe à memória de medo original (em vermelho) (Adaptado de Radulovic & Tronson, 2011).

A tarefa de EI depende crucialmente da integridade da região CA1 do hipocampo, bem como de seqüências de alterações moleculares em outras regiões cerebrais. Como grande vantagem desse modelo, tem-se que o aprendizado dessa associação se dá de maneira muito rápida. Normalmente, uma sessão é suficiente para estabelecer uma memória de longa duração (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2006).

1.2. Peptídeo liberador de gastrina e seu receptor

A bombesina é um tetradecapeptídeo isolado originalmente em 1970 da pele do sapo *Bombina bombina* (Erspamer *et al.*, 1970). Em mamíferos, dois peptídeos similares à bombesina foram identificados: o peptídeo liberador de gastrina (GRP) e a neuromedina B (NMB) (McDonald *et al.*, 1979; Minamino *et al.*, 1983). Posteriormente, foi isolado um peptídeo adicional, inicialmente denominado de neuromedina C (NMC), sendo este na verdade um decapeptídeo de GRP (GRP-10, GRP₁₈₋₂₇) (Minamino *et al.*, 1984).

Originalmente isolado de tecido gástrico suíno, o GRP é composto por 27 aminoácidos, sendo inicialmente sintetizado na forma de um precursor de 148 aminoácidos (PreproGRP), o qual é metabolizado pós-traducionalmente (Lebacqz-Verheyden *et al.*, 1988; Spindel *et al.*, 1984). Esse peptídeo apresenta os mesmos sete aminoácidos carboxi-terminais que a bombesina, exibindo atividade biológica similar ao peptídeo de anfíbios (Jensen *et al.*, 2008).

O GRP apresenta importantes efeitos fisiológicos, estando largamente distribuído no sistema nervoso central (SNC) – em altas concentrações no núcleo do trato solitário, amígdala e hipotálamo – e em tecidos periféricos, especialmente no trato gastrointestinal (Gonzalez *et al.*, 2008; Moody & Merali, 2004).

Três tipos de receptores para peptídeos da família da bombesina foram identificados em mamíferos: o receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR ou BB2), o receptor de neuromedina B (NMBR ou BB1) e o receptor de bombesina subtipo 3 (BRS-3 ou BB3). A bombesina e seu homólogo mamífero GRP ligam-se com alta afinidade a GRPR, enquanto que a NMB liga-se preferencialmente a NMBR. Até o momento, não foi identificado nenhum ligante para BRS-3 (Majumdar & Weber, 2011).

O GRPR, composto por 384 aminoácidos, pertence à superfamília de receptores acoplados à proteína G e exibe a estrutura característica de sete domínios transmembrana (Figura 3) (Jensen *et al.*, 2008).

No SNC, esse receptor é expresso em áreas como o hipocampo (principalmente hipocampo dorsal), amígdala (basolateral e núcleo central), hipotálamo, núcleo do trato solitário, áreas corticais, e tronco cerebral. A presença de GRPR é restrita aos corpos celulares neuronais e dendritos, não estando presente nos axônios ou células gliais. Este padrão de localização sugere que o GRPR desempenhe um papel específico como receptor pós-sináptico estando especificamente envolvido na regulação da transmissão sináptica (Kamichi *et al.*, 2005).

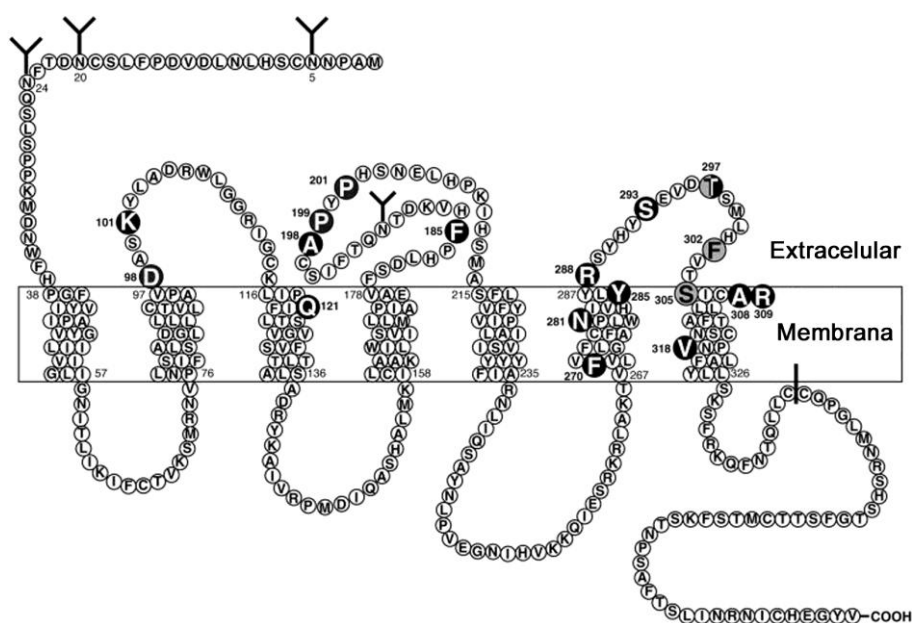


Figura 3. Representação da estrutura do GRPR e sua disposição transmembrana. Nos círculos pretos, estão indicados os aminoácidos chave para a interação de alta afinidade com GRP (Adaptado de Jensen *et al.*, 2008).

A sinalização celular mediada por GRP/GRPR, no SNC, está envolvida na regulação do ritmo circadiano, termorregulação, saciedade, neurogênese e desenvolvimento neuronal (Jensen *et al.*, 2008; Walton *et al.*, 2014; Weber, 2009). De maneira importante, ainda, GRPR modula aspectos associados à formação da memória, respostas emocionais, estresse, ansiedade e interação social (Roesler *et al.*, 2012; 2014a; Roesler & Schwartzmann, 2012).

1.2.1. Regulação da memória por GRPR

A participação do GRPR na formação da memória tem sido investigada em diversos estudos farmacológicos a partir da utilização de agonistas e de antagonistas deste receptor em animais submetidos a diferentes tarefas comportamentais.

Os efeitos do bloqueio farmacológico desse receptor na codificação e na consolidação da memória tem sido campo de interesse em diversos estudos. A aquisição e a fase precoce de consolidação da memória aversiva (EI) são prejudicadas a partir da administração do antagonista seletivo de GRPR, [D-Tpi⁶, Leu¹³ psi (CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesina (6–14) (RC-3095). Interessantemente, este efeito não é observado para tarefas com menor conteúdo emocional, como o reconhecimento de objetos, o que sugere que esse receptor esteja preferencialmente envolvido na regulação de memórias com conteúdo emocional (Roesler *et al.*, 2004a). Além disso, efeitos similares desse antagonista sobre a consolidação da memória aversiva foram observados a partir de injeções sistêmicas, intra-hipocâmpais ou intra-amigdalares imediatamente após o treino nessa mesma tarefa (Dantas *et al.*, 2006; Preissler *et al.*, 2007; Roesler *et al.*, 2003; 2004b). De maneira oposta, a administração intra-hipocâmpal de bombesina, em doses intermediárias, após o treino na tarefa de EI facilita a formação desta memória (Roesler *et al.*, 2006a).

GRPR pode, ainda, regular a extinção, a reconsolidação e a expressão da memória aversiva. O bloqueio deste receptor logo após a sessão de treino de extinção na tarefa de EI leva ao prejuízo do processo de extinção da memória aversiva anteriormente formada (Luft *et al.*, 2006). Além disso, observou-se o prejuízo transitório do processo de reconsolidação como consequência do antagonismo desse receptor logo após a evocação da memória (Luft *et al.*, 2008). A ativação e o bloqueio da via de sinalização por GRPR podem ter diferentes efeitos em relação à expressão de respostas de medo condicionado. A administração de GRP, e a consequente ativação de sua via de sinalização, antes da evocação da memória tem como resultado a atenuação da expressão do medo aprendido, enquanto que o bloqueio desta via demonstra efeito oposto, aumentando esta resposta (Merali *et al.*, 2011).

A participação desse receptor na modulação da memória aversiva, bem como na plasticidade sináptica, tem sido também investigada em estudos genéticos a partir da utilização de animais *knock-out* para GRPR. No entanto, este modelo não permite analisar o efeito da ablação do gene deste receptor nas diferentes fases da memória, além do fato de

que, possivelmente, esses animais apresentem super expressão de vias compensatórias e também alterações de comportamento resultantes do desenvolvimento anormal do SNC (Roesler *et al.*, 2012).

1.2.2. Mecanismos moleculares associados à modulação da memória por GRPR

O GRPR está diretamente acoplado à proteína G_q e sua ativação é primariamente associada ao aumento intracelular de cálcio (Ca^{2+}) e à ativação da via PLC/PKC (Hellmich *et al.*, 1999; Stangelberger *et al.*, 2005). Em vários tecidos, a resposta celular desencadeada pela ativação desse receptor depende também das vias ERK/MAPK e da PI3K (Chen & Kroog, 2004; Roesler *et al.*, 2009; Stangelberger *et al.*, 2005). Além disso, a via GRP/GRPR pode, ainda, influenciar a expressão de genes imediatos (como c-fos e c-jun) e interagir com sinalizações desencadeadas por outros neurotransmissores, hormônios e receptores neuronais envolvidos no processo de consolidação da memória (Chatzistamou *et al.*, 2000; Roesler *et al.*, 2012).

Inicialmente, a ativação de GRPR na membrana pós-sináptica leva ao aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} e à consequente estimulação das vias PLC/PKC e ERK/MAPK. Sabe-se que a facilitação da formação da memória no hipocampo desencadeada pela ativação desse receptor pode interagir com a sinalização por AMPc/PKA. Como a sinalização através de G_q não está acoplada diretamente à via adenilato ciclase (AC)/AMPc/PKA, sugere-se que aumentos na concentração de Ca^{2+} associados à ativação de GRPR possam ativar ACs responsivas a este íon, consequentemente ativando PKA. Além disso, o estímulo à consolidação da memória desencadeado pela ativação de GRPR no hipocampo pode ser potencializado pela ativação do receptor dopaminérgico D1/D5 (D1R). Este receptor está acoplado à proteína G_s e à ativação da AC. É possível que a sinalização por AMPc induzida pela ativação de D1R seja potencializada pela estimulação de tipos de AC responsivas à concentração desse íon, sendo este um possível mecanismo para a interação entre GRPR e a via AMPc/PKA (Figura 4) (Roesler *et al.*, 2006a).

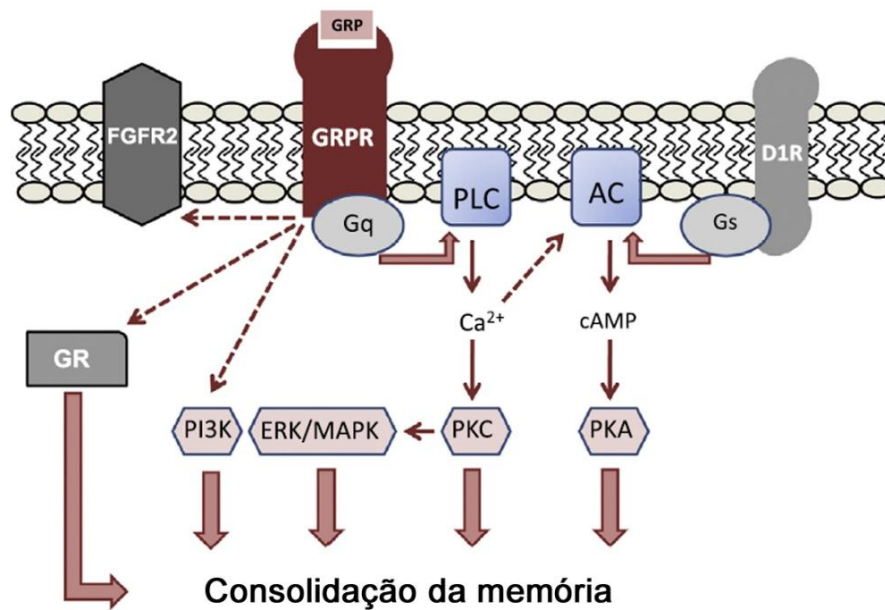


Figura 4. Mecanismos de sinalização intracelular propostos para a regulação de GRPR na consolidação da memória aversiva em hipocampo dorsal. A modulação da memória exercida pelo GRPR no hipocampo está relacionada às vias da PKC, ERK/MAPK, PI3K e PKA e é potencializada pela ativação da via D1R/AMPC/PKA. O sistema GRP/GRPR pode, ainda, interagir com vias de receptores de hormônios de estresse, como os receptores de glicocorticoides (GRs) e com o receptor do fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFR2) (Adaptado de Roesler *et al.*, 2014a).

1.2.3. GRPR e BDNF

Membro da família das neurotrofinas, o BDNF está importantemente relacionado ao desenvolvimento cerebral, mais especificamente à regulação da sobrevivência e da diferenciação de populações neuronais. A sinalização desencadeada por BDNF e seu receptor TrkB está, ainda, envolvida em diversas funções cerebrais: desenvolvimento de neuritos, migração celular, desenvolvimento dendrítico e de espinhos dependentes de glutamato e, ainda, formação, estabilização e potencialização de sinapses (Bekinschtein *et al.*, 2008; Yoshii & Constantine-Paton, 2010).

O BDNF, que em cérebro de mamíferos está largamente distribuído no hipocampo, tem papel crucial em processos relacionados ao aprendizado, à formação da memória e à plasticidade sináptica. Essa neurotrofina desempenha função na fase tardia da

LTP, sendo que o fator de transcrição CREB é um importante mediador das respostas neuronais do BDNF (Bekinschtein *et al.*, 2008).

Estudos demonstraram uma possível interação funcional entre os sistemas de GRPR e BDNF. Alterações comportamentais associadas ao antagonismo de GRPR foram relacionadas a aumentos nos níveis hipocâmpais de BDNF (Kauer-Sant'Anna *et al.*, 2007). Além disso, em células de câncer colorretal, observou-se o aumento na expressão e na secreção de BDNF como uma resposta compensatória ao bloqueio de GRPR (de Farias *et al.*, 2010).

1.2.4. Alterações na expressão e na sinalização por GRPR em desordens cerebrais

Considerando a alta expressão de GRPR em áreas cerebrais como o hipocampo e a amígdala basolateral e sua importante participação na regulação de aspectos do comportamento, é possível que a sinalização desregulada de GRPR contribua para a patogênese de doenças neurológicas e psiquiátricas (Roesler & Schwartsmann, 2012). Alterações nos níveis de peptídeos semelhantes à bombesina e na densidade ou função de GRPR foram observadas em pacientes com doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), neuropsiquiátricas (esquizofrenia e, possivelmente, patologias associadas à ansiedade), e do neurodesenvolvimento (transtornos do espectro do autismo) e, ainda, em tumores cerebrais (Tabela 1) (Bissette *et al.*, 1985; Flores *et al.*, 2010; Gerner *et al.*, 1985; Gibson *et al.*, 1997; Ishikawa-Brush *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2002; Merali *et al.*, 2006; Olincy *et al.*, 1999; Seidita *et al.*, 2008).

Essas evidências sugerem que o GRPR possa ser um novo alvo molecular para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para desordens neurológicas e psiquiátricas, particularmente aquelas que afetam a memória e respostas emocionais (Roesler *et al.*, 2006b; Roesler & Schwartsmann, 2012).

Tabela 1. Alterações associadas a GRPR em pacientes com desordens do SNC.

Desordem do SNC	Principais achados	Referência
Doença de Parkinson	Níveis reduzidos de peptídeos semelhantes à bombesina no núcleo caudado e globo pálido	Bissette <i>et al.</i> (1985)
Doença de Alzheimer	Densidade reduzida de receptores de bombesina e liberação de cálcio induzida pela bombesina aumentada em fibroblastos	Ito <i>et al.</i> (1994)
Doença de Alzheimer	Mobilização de cálcio induzida pela bombesina reduzida em fibroblastos	Gibson <i>et al.</i> (1997)
Autismo	Translocação X;8 no gene GRPR	Ishikawa-Brush <i>et al.</i> (1997)
Autismo	Mutações C6S e L181F no gene GRPR	Seidita <i>et al.</i> (2008)
Esquizofrenia	Bombesina detectável por radio-imunoensaio reduzida no fluido cerebrospinal	Gerner <i>et al.</i> (1985)
Esquizofrenia	Níveis urinários reduzidos de peptídeos semelhantes à bombesina	Olincy <i>et al.</i> (1999)
Tumores cerebrais	Superexpressão de GRPR em glioma	Flores <i>et al.</i> (2010)

Adaptado de Roesler & Schwartsmann, 2012.

1.3. Acetilação de histonas

A epigenética refere-se a modificações na estrutura da cromatina, as quais permitem a regulação da expressão gênica por mecanismos que não envolvem a alteração da sequência de DNA (Levenson & Sweatt, 2005; Mahgoub & Monteggia, 2014). Esses processos epigenéticos, como metilação do DNA e modificações pós-traducionais em histonas, ao modularem a acessibilidade de regiões específicas do genoma à maquinaria de transcrição, permitem que células genotipicamente idênticas sejam fenotipicamente distintas (Levenson & Sweatt, 2005; Penney & Tsai, 2014).

No núcleo celular, 147 pares de bases do DNA se encontram enrolados em torno de um octâmero de quatro proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4), formando a unidade básica da cromatina denominada de nucleossomo (Figura 5a e 5b). As histonas são compostas por um domínio globular central e por uma cauda N-terminal flexível que se projeta da superfície do nucleossomo e que apresenta múltiplos sítios para modificações pós-traducionais (como acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação, entre outras), as

quais modulam a estrutura global da cromatina (Figura 5c). Cada uma dessas modificações, catalisadas ou removidas bidirecionalmente por um conjunto específico de enzimas, é direcionada a resíduos específicos presentes na cauda das histonas (Day & Sweatt, 2011; Kouzarides, 2007; Levenson & Sweatt, 2005).

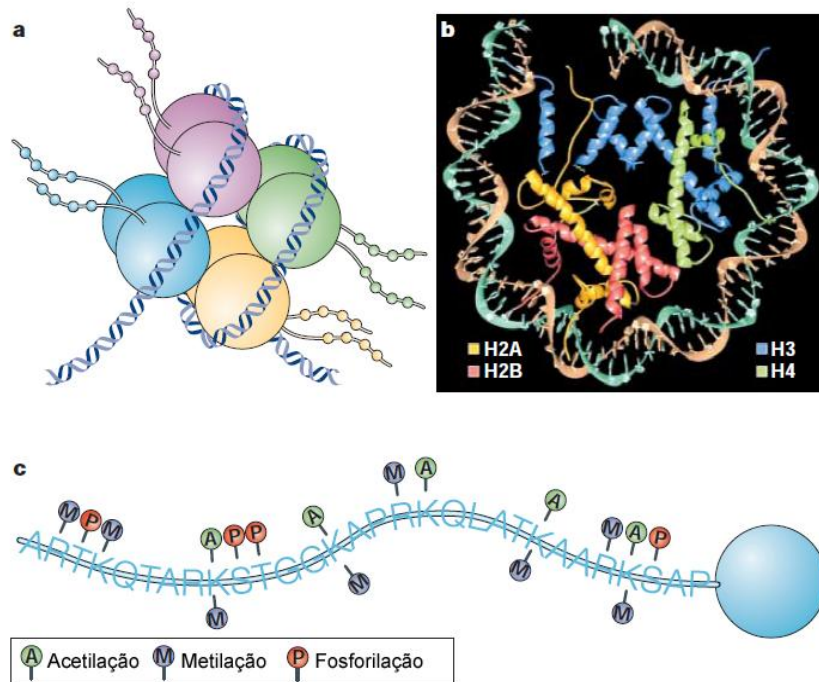


Figura 5. Estrutura do nucleossomo e representação de resíduos alvo de modificações pós-traducionais. (a) Estrutura do nucleossomo composto pelo octâmero de histonas (H2A, H2B, H3 e H4). As porções N-terminais das histonas se projetam do centro do nucleossomo. (b) Estrutura do nucleossomo mostrando a interação do DNA com as histonas. (c) Representação dos primeiros 30 aminoácidos na extremidade N-terminal da histona H3 humana e dos resíduos alvo de modificações, como acetilação, metilação e fosforilação (Adaptado de Levenson & Sweatt, 2005).

Entre as modificações epigenéticas, a acetilação tem importante participação em processos cognitivos, assim como em múltiplas desordens cognitivas (Gräff & Tsai, 2013a; Penney & Tsai, 2014). Mais especificamente, foi demonstrado que os períodos em que ocorrem alterações na acetilação de histonas durante processos de aprendizado e memória parecem ser rápidos. Em memórias relacionadas a medo, observou-se um aumento na acetilação da histona H3 na área CA1 do hipocampo 1 hora após a realização da tarefa comportamental, mas não após 24 horas (Levenson *et al.*, 2004).

No processo de acetilação, ocorre a transferência de um grupo acetila da acetil-coenzima A ao grupo ϵ -amino da cadeia lateral de um resíduo de lisina na cauda da histona. Essa adição, conseqüentemente, neutraliza a carga positiva da lisina, diminuindo a afinidade eletrostática entre histona e DNA (Levenson & Sweatt, 2005). Essa reação é dinâmica, sendo regulada por duas classes de enzimas funcionalmente antagônicas: histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs). HATs promovem o relaxamento do complexo DNA-histonas por meio da adição de grupos acetila a essas proteínas, permitindo um maior acesso de fatores de transcrição ao DNA, conseqüentemente, aumentando a expressão gênica. De maneira oposta, HDACs levam ao condensamento do complexo DNA-histonas, restringindo o acesso de fatores de transcrição ao DNA, assim, reprimindo a expressão gênica (Figura 6) (Mahgoub & Monteggia, 2014). Dessa forma, o aumento da transcrição nas células pode ser possível pela estimulação de HATs ou pela inibição da atividade de HDACs (Kazantsev & Thompson, 2008).

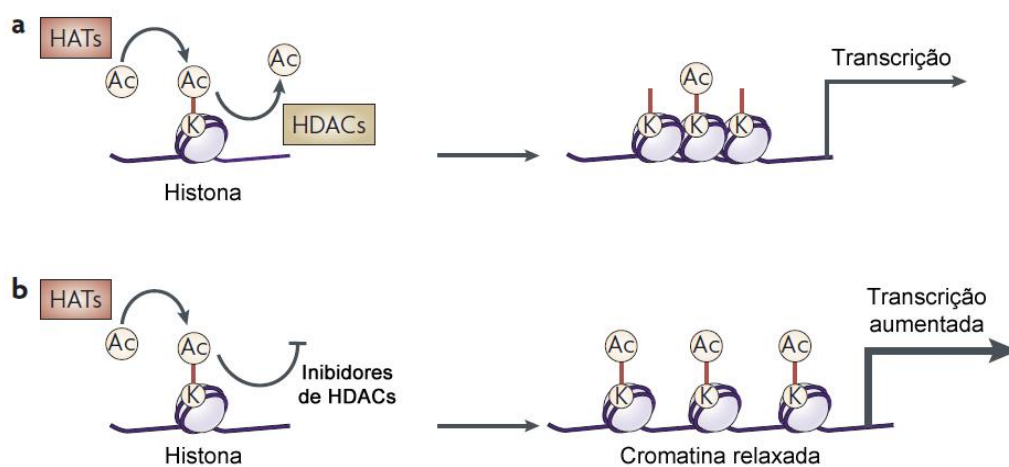


Figura 6. Efeito dos inibidores de HDACs no remodelamento da cromatina e na transcrição. (a) Níveis de acetilação nas histonas em resíduos específicos de lisina (K) são determinados pelas reações simultâneas de acetilação (Ac) e desacetilação, as quais são mediadas por histonas acetiltransferases (HATs) e por histonas desacetilases (HDACs). (b) Ao inibir a reação de desacetilação, os inibidores de HDACs alteram o equilíbrio dos níveis de acetilação das histonas, levando ao aumento na acetilação, à modificação da cromatina para uma conformação mais relaxada e ao aumento da transcrição (Adaptado de Kazantsev & Thompson, 2008).

1.3.1. Histonas desacetilases

As HDACs podem ser divididas em quatro classes de acordo com sua homologia de sequência, função enzimática, localização subcelular e padrão de expressão: classe I (HDAC1, 2, 3, 8), classe IIa (HDAC 4, 5, 7, 9), classe IIb (HDAC6, 10) e classe IV (HDAC11). Um grupo distinto de HDACs, denominadas sirtuínas, que atua por mecanismo diferente das demais, compõe a classe III de HDACs. A família de classe I é composta por HDACs de expressão ubíqua e que apresentam alta atividade enzimática, sendo localizadas predominantemente no núcleo. HDACs de classe IIa, que podem migrar do núcleo para o citoplasma, ao contrário, apresentam atividade de desacetilase relativamente baixa, podendo atuar em conjunto com outras HDACs, como as de classe I. Na classe IIb, a HDAC6 corresponde à principal desacetilase citoplasmática presente em células de mamíferos, enquanto que pouco se sabe sobre a função desempenhada pela HDAC10. Único membro da classe IV, a HDAC11 está presente principalmente no núcleo e sua função ainda não é bem conhecida (Gräff & Tsai, 2013b; Haberland *et al.*, 2009; Mahgoub & Monteggia, 2014).

No cérebro, todas as isoformas de HDACs das classes I, II e IV estão presentes em neurônios. As HDACs2-5 e HDAC11 estão presentes também em oligodendrócitos, enquanto que a expressão de todas HDACs em astrócitos é baixa. Especificamente em estruturas relacionadas a aprendizado e memória, como hipocampo, amígdala e áreas corticais, as HDACs de classe I são bastante abundantes e, por isso, são as mais estudadas nesses aspectos (Gräff & Tsai, 2013b).


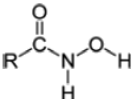
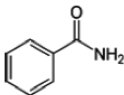
1.3.2. Inibidores de histonas desacetilases como facilitadores cognitivos

HDACs tem sido reconhecidas como alvos promissores para o desenvolvimento terapêutico. Inibidores de HDACs (iHDACs), pequenas moléculas capazes de inibir a função dessas enzimas, foram inicialmente associados ao tratamento de câncer e, mais recentemente, esse espectro de ação foi ampliado incluindo também doenças do SNC (Fischer *et al.*, 2010; Kazantsev & Thompson, 2008). Essas classes de drogas, ao

prevenirem a remoção de grupos acetila das caudas das histonas, resultam em uma hiperacetilação global dessas proteínas (Day & Sweatt, 2011).

Os iHDACs podem ser divididos com base em sua estrutura em quatro classes (Tabela 2). A primeira classe é composta pelos ácidos carboxílicos, butirato de sódio (NaB), ácido valpróico (VPA) e fenilbutirato, os quais desempenham inibição seletiva de HDACs de classe I com poucos efeitos sobre outras HDACs. A segunda classe, dos ácidos hidroxâmicos, é composta pela tricostatina A (TSA) e pelo ácido suberoilanilida hidroxâmico (SAHA). TSA e SAHA atuam como inibidores de ação mais global, afetando HDACs de classe I e II ao interagir diretamente com o domínio catalítico dessas enzimas, quelando o sítio ativo de zinco, necessário para a sua função de desacetilase. A terceira classe de iHDACs, os quais apresentam o grupo benzamida em sua estrutura química, inclui os membros MS-275 e RGFP136, que inibem HDACs de classe I com maior seletividade para HDAC1 e HDAC3, respectivamente. A quarta classe de iHDACs corresponde aos tetrapeptídeos cíclicos, a maioria deles sendo produtos naturais (Fischer *et al.*, 2010; Gräff & Tsai, 2013b).

Tabela 2. Classes de inibidores de HDACs e respectivas seletividades de ação sobre HDACs.

Classe estrutural	Seletividade	iHDAC
Ácidos carboxílicos 	Classe I	Butirato de sódio (NaB) Ácido valpróico (VPA) Fenilbutirato
Ácidos hidroxâmicos 	Classes I e II	Tricostatina A (TSA) Ácido suberoilanilida hidroxâmico (SAHA)
Grupo benzamida 	Classe I	MS-275 RGFP136

Adaptado de Gräff & Tsai, 2013b.

A utilização de iHDACs tem contribuído de maneira importante para a elucidação do papel da acetilação de histonas no aprendizado e memória. iHDACs apresentam efeito facilitador sobre a consolidação da memória relacionada a medo (Blank *et al.*, 2014;

Levenson *et al.*, 2004; Vecsey *et al.*, 2007), além de aumentarem a indução da LTP hipocampal (Levenson *et al.*, 2004). NaB e TSA mostraram-se potencializadores também no processo de extinção de memórias aversivas (Lattal *et al.*, 2007). Nesse contexto, parece existir uma relação entre alterações na acetilação de regiões promotoras específicas de genes associados a aprendizado e memória, como BDNF, zif268 e CREB (Bredy *et al.*, 2007; Koshibu *et al.*, 2009; Lubin & Sweatt, 2007).

Essas drogas apresentam, ainda, potencial terapêutico em doenças neurodegenerativas relacionadas a aprendizado e memória. iHDACs parecem reverter déficits relacionados à idade na acetilação de histonas, restaurando a habilidade de aprendizado de novas associações em animais (Peleg *et al.*, 2010). Mesmo após a indução de atrofia neuronal severa, iHDACs foram capazes de restaurar a capacidade de formação de memórias e ainda possibilitaram o acesso a memórias de longa duração previamente formadas (Fischer *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar possíveis interações funcionais entre o sistema de sinalização por GRPR e a regulação da cromatina por HDACs na formação e na extinção da memória aversiva.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Verificar a interação funcional entre os efeitos de micro-infusões intra-hipocampais do antagonista de GRPR, RC-3095, e do inibidor de histonas desacetilases NaB, sobre a consolidação da memória aversiva (EI) em ratos;

2.2.2. Verificar a interação funcional entre os efeitos de micro-infusões intra-hipocampais de RC-3095 e de NaB sobre a extinção da memória aversiva (EI) em ratos;

2.2.3. Avaliar os níveis de BDNF em hipocampo de ratos treinados ou não em EI, após micro-infusões de NaB e de RC-3095;

2.2.4. Avaliar possíveis alterações nos níveis de acetilação da histona H3 em hipocampo de ratos após micro-infusões de NaB e de RC-3095.

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de um artigo científico submetido para publicação na revista *Neurobiology of Learning and Memory*.

Assunto: Neurobiology of Learning and Memory: Submission Confirmation

De: NLM (ELS) (ees.ynlme.0.33384d.f4ee4011@eesmail.elsevier.com)

Data: Quarta-feira, 12 de Agosto de 2015 11:36

Title: Histone deacetylase inhibition prevents the impairing effects of hippocampal gastrin-releasing peptide receptor antagonism on memory consolidation and extinction

Corresponding Author: Dr. Rafael Roesler

Authors: Fernanda S Petry; Arethuzza S Dornelles; Martina Lichtenfels; Fernanda E Valiati; Caroline B de Farias; Gilberto Schwartzmann; Marise B Parent;

Article Type: Regular Article

Dear Dr. Roesler,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Neurobiology of Learning and Memory.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Neurobiology of Learning and Memory as an author:

<http://ees.elsevier.com/ynlme/>

Your username is: RRoesler-825

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/YNLME/automail_query.asp.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Neurobiology of Learning and Memory. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Ted Abel

Editor

Neurobiology of Learning and Memory

Elsevier

Email: nlm@elsevier.com

Histone deacetylase inhibition prevents the impairing effects of hippocampal
gastrin-releasing peptide receptor antagonism on memory consolidation and
extinction

Fernanda S. Petry ^{a,b}, Arethuzia S. Dornelles ^{a,b}, Martina Lichtenfels ^{a,b}, Fernanda E. Valiati ^{a,b}, Caroline Brunetto de Farias ^{a,c}, Gilberto Schwartzmann ^{a,d}, Marise B. Parent ^e, Rafael Roesler ^{a,b,*}

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

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

^c*Children's Cancer Institute, Porto Alegre, RS, Brazil*

^d*Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil*

^e*Neuroscience Institute and Department of Psychology, Georgia State University, Atlanta, Georgia, USA*

* Corresponding author: 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. Tel.: +5551 33083183; fax: +5551 33083121.

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

ABSTRACT

Hippocampal gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) regulate memory formation and extinction, and disturbances in GRPR signaling may contribute to cognitive impairment associated with neurodevelopmental disorders. Histone acetylation is an important epigenetic mechanism that regulates gene expression involved in memory formation, and histone deacetylase inhibitors (HDACis) rescue memory deficits in several models. The present study determined whether inhibiting histone deacetylation would prevent memory impairments produced by GRPR blockade in the hippocampus. Male Wistar rats were given an intrahippocampal infusion of saline (SAL) or the HDACi sodium butyrate (NaB) shortly before inhibitory avoidance (IA) training, followed by an infusion of either SAL or the selective GRPR antagonist RC-3095 immediately after training. In a second experiment, the infusions were administered before and after a retention test trial that served as extinction training. As expected, RC-3095 significantly impaired consolidation and extinction of IA memory. More importantly, pretraining administration of NaB, at a dose that had no effect when given alone, prevented the effects of RC-3095. In addition, the combination of NaB and RC-3095 increased hippocampal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). These findings indicate that HDAC inhibition can fully protect against memory impairment caused by GRPR inhibition, and provide the first evidence for a functional interaction between GRPR signaling and an epigenetic mechanism critical for memory.

Keywords:

Gastrin-releasing peptide receptor

Histone deacetylase

Epigenetics

Hippocampus

Memory consolidation

Memory extinction

1. Introduction

Gastrin-releasing peptide (GRP), a mammalian analog of the amphibian peptide bombesin, is a regulatory neuropeptide in the brain that acts by binding to the GRP receptor (GRPR, BB2), a member of the G protein-coupled receptor superfamily (Gonzalez, Moody, Igarashi, Ito, & Jensen, 2008; Jensen, , Spindel, & Benya, 2008). Upon activation, GRPRs enhance memory formation through stimulation of multiple protein kinase intracellular signaling pathways (Roesler et al., 2006; Roesler, Kent, Luft, Schwartzmann, & Merali, 2014a; Roesler, Kent, Schröder, Schwartzmann, & Merali, 2012). Dorsal hippocampal microinfusions of the GRPR agonist recombinant bombesin enhance the consolidation of memory for inhibitory avoidance (IA); this effect is prevented by inhibitors of protein kinase C (PKC), extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK), cAMP/protein kinase A (PKA), and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathways (Roesler et al., 2006; 2009). Conversely, systemic, intrahippocampal, or intraamygdala administration of the synthetic GRPR peptidergic antagonist, RC-3095, impairs IA memory (Roesler et al., 2003; 2004a; 2004b). In addition, pharmacological inhibition of the GRPR early in life produces long lasting behavioral alterations, including memory deficits (Presti-Torres et al., 2007). Indeed, we have proposed that GRPR signaling dysfunction contributes to the cognitive impairment associated with neurodevelopmental and neurodegenerative disorders (Merali et al., 2014; Roesler et al., 2014a; Roesler & Schwartzmann, 2012).

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors (HDACis) have been used as experimental drugs to rescue memory deficits in several rodent models. HDACs remove acetyl groups from histones, promoting chromatin condensation and repressing gene transcription (Haberland, Montgomery, & Olson, 2009; Kouzarides, 2007; Li, Carey, & Workman, 2007). Agents that preferentially inhibit class I HDACs, such as sodium butyrate (NaB), trichostatin A (TSA), suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), and valproic acid (VPA), relax chromatin structure, which allows for increased readout of genes associated with synaptic plasticity and memory formation (Bridi & Abel, 2013; Day & Sweatt, 2011; Gräff & Tsai, 2013a; Peixoto & Abel, 2013; Penney & Tsai, 2014). Pharmacological inhibition of HDACs facilitates long-term potentiation (LTP) in the CA1 area of the dorsal hippocampus (Vecsey et al., 2007), enhances the formation and extinction of memory for

fear-motivated tasks (Blank et al., 2014; Bredy & Barad, 2008; Lattal et al., 2007; Levenson et al., 2004; Stafford, Raybuck, Ryabinin, & Lattal, 2012; Vecsey et al., 2007), and attenuates memory impairments in aging and models of neurodegenerative disorders (Alarcón et al., 2004; Kilgore et al., 2010; Peleg et al., 2010; Reolon et al., 2011).

We hypothesize that GRPR blockade impairs memory by preventing GRPR-induced activation of gene transcription during learning that is mediated by protein kinase pathways downstream of the receptor. HDAC inhibition increases the expression of key genes involved in synaptic plasticity and memory, such as neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Bredy et al., 2007; Wu et al., 2008). In the present study, we determined whether inhibition of HDAC in dorsal hippocampus could compensate for disrupted GRPR function. The results show that administration of NaB into the rat dorsal hippocampus prior to learning prevents the impairing effects of intrahippocampal infusion of the GRPR antagonist RC-3095 on both IA memory formation and extinction. In addition, the combination of NaB with RC-3095 increased hippocampal BDNF levels, suggesting that up-regulation of BDNF might be involved in the protective effect of NaB against GRPR blockade.

2. Methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (220-350 g at time of surgery) were obtained from the institutional breeding facility (CREAL, ICBS, UFRGS) and maintained at the university hospital animal research facility (UEA, CPE-HCPA). Animals were housed four per cage in plastic cages with sawdust bedding, and maintained on a 12 h light/dark cycle at a room temperature of 22 ± 2 °C. The rats were allowed *ad libitum* access to standardized pellet food and water. All experiments took place during the light phase, between 8 AM and 5 PM. All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Guidelines 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 140067.

2.2. Surgery

Rats were implanted under anesthesia with isoflurane (vaporized in 100% oxygen, at a dose of 5% for induction and 2% for maintenance, in a fraction of 0.5 l/min) with bilateral 8-mm, 23-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the dorsal hippocampus, as described previously (Blank *et al.*, 2014). 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 & Watson (2007). Rats were allowed to recover at least 5 days after surgery before behavioral training.

2.3. Inhibitory avoidance (IA)

The single-trial step-down IA task was used as an established model of fear-motivated memory. The general procedures for IA behavioral training and retention tests were described in previous reports (Blank *et al.*, 2014; Roesler *et al.*, 2003; 2006). The IA apparatus was a 50 x 25 x 25-cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) with a floor composed 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 one wall.

On training trials, the 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, the rats were given a 0.4-mA, 3.0-s footshock and then removed from the apparatus immediately afterward. The first retention test trial was given 24 h after training by placing the rats on the platform and recording their latencies to step down. No footshock was presented during retention test trials. Step-down latencies on the retention test trial (maximum 180 s) were used as a measure of IA memory retention.

For IA extinction, rats were returned daily to the IA training context without footshock for 6 days as described previously (Luft *et al.*, 2006; Roesler *et al.*, 2014b). Rats that did not step down to the grid floor within 180 s during the first 24-h retention/extinction test trial were led gently by the experimenter to the grid floor. Rats were given a 0.3-mA reminder footshock at the end of the 5th test, followed by an additional retention test 24 h later (Roesler *et al.*, 2014b; Tronel & Alberini, 2007).

2.4. Drug infusions

General procedures for intrahippocampal infusions were described in previous reports (Roesler et al., 2003; Blank et al., 2014). At the time of infusion, a 27-gauge infusion needle was inserted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at the dorsal hippocampus. Drugs or saline (SAL) were 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 the memory consolidation experiment, rats were given a bilateral 0.5- μ l infusion of SAL (0.9% NaCl) or NaB (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 100 mM) dissolved in SAL into the hippocampus 10 minutes before IA training. A previous study showed that is maximal sub-effective dose that did not affect IA retention when administered alone (Blank et al., 2014). Immediately after training, the same rats were given a bilateral 0.5- μ l infusion of SAL or RC-3095 (1 μ g) (Zentaris AG, Frankfurt, Germany). In the memory extinction experiment, rats were given a bilateral 0.5- μ l infusion of SAL or NaB 10 min before the first retention test/extinction session and then a bilateral 0.5- μ l infusion of SAL or RC-3095 immediately afterward. Solutions were prepared freshly before each experiment. The RC-3095 dose was chosen on the basis of previous studies showing that it impaired IA memory consolidation and extinction when given into the dorsal hippocampus (Luft et al., 2006; Roesler et al., 2003; Dantas, Luft, Henriques, Schwartzmann, & Roesler, 2006).

2.5. Measurement of hippocampal BDNF levels

A separate group of rats was given one IA training trial as described above. The rats (n = 5-6 per group) were given intrahippocampal infusions of SAL or NaB 10 min before training and SAL or RC-3095 immediately after. Four h after the last infusion, animals were sacrificed by decapitation. Their brains were removed and the hippocampi were quickly dissected out, immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until BDNF measurement. The posttraining time for BDNF measurement was chosen on the basis of a previous study showing that hippocampal BDNF increased 4 h after learning (Goulart et al., 2010).

Hippocampal BDNF levels were measured as described previously (Kauer-Sant'Anna et al., 2007; Goulart et al., 2010), using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) commercial kits according to the manufacturer's instructions (ChemiKine™, CYT306, Millipore, USA). Briefly, samples were homogenized in phosphate-buffered solution (PBS) with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM ethyleneglycoltetraacetic acid (EGTA). Microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24 h with the samples diluted 1:2 in sample diluents and the standard curve ranged from 7.8 to 500 pg/ml of BDNF. The plates were then washed four times with wash buffer and a monoclonal anti-BDNF rabbit antibody (1:1000) was added to each well and incubated for 3 h at room temperature. After washing, a peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (horseradish peroxidase enzyme; 1:1000) was added to each well and incubated for 1 h at room temperature. After addition of streptavidin enzyme, substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine - TMB) and stop solution, the amount of BDNF was determined by absorbance at 450 nm in a spectrophotometer. Total protein was measured using the Bradford's method with bovine serum albumin as the standard.

2.6. *Histology*

For the behavioral experiments, a 0.5- μ l infusion of a 4% methylene blue solution was infused into the cannulae 24 to 48 h after the end of behavioral testing. 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 extent of the methylene blue dye was used as a proxy to estimate drug diffusion, as described previously (Roesler et al., 2003; 2006). Rats with incorrect cannula placements were excluded from the statistical analyses.

2.7. *Statistics*

Nonparametric tests were used to analyze retention test latencies because several rats reached the 180 s cut off. Training and retention test step-down latencies were analyzed using a Kruskal-Wallis test followed by two-tailed Mann-Whitney *U* tests. To test the

predictions that dorsal hippocampal infusions of RC-3095 would impair consolidation and extinction, and that NaB would attenuate these deficits, *a priori* comparisons between the control group and each drug-treated group were conducted on the first test given after the drug infusions (i.e., Test 1 for the consolidation experiment and Test 2 for the extinction experiment). Wilcoxon tests were also used to compare step-down latencies on different behavioral trials within each group. BDNF results were analyzed using one-way ANOVA followed by LSD post hoc tests. For all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. All data are presented as mean \pm S.E.M.

3. Results

3.1. Dorsal hippocampal infusions of an HDACi prevent GRPR antagonist-induced IA memory consolidation deficits

The first experiment tested the effects of intrahippocampal infusions of NaB and RC-3095 on consolidation of IA memory. Rats were given bilateral dorsal hippocampal infusions of SAL or NaB 10 min before IA training; and SAL or RC-3095 immediately afterward. The resulting experimental groups were SAL/SAL ($N = 18$); NaB/SAL ($N = 13$); SAL/RC-3095 ($N = 13$); and NaB/RC-3095 ($N = 14$). Retention was tested 24 h later.

The results showed that GRPR antagonism impaired memory consolidation and that the HDACi prevented this effect. Specifically, there was a significant effect of the drug infusions on latencies on the 24-h retention test ($H = 9.65$, $df = 3$, $p = 0.02$; Fig. 1). Post-training infusions of RC-3095 significantly decreased IA retention latencies when compared to the control group ($p = 0.027$). Pre-training infusion of NaB alone did not affect retention ($p = 0.32$ vs. SAL/SAL), but did prevent the RC-3095-induced memory impairment ($p = 0.61$ vs. SAL/SAL; $p = 0.01$ vs. SAL/RC-3095). The manipulations did not affect initial training trial latencies ($H = 1.05$, $df = 3$, $p = 0.79$).

Fig. 1 should be inserted here

3.2. Dorsal hippocampal infusions of an HDACi prevent GRPR antagonist-induced IA extinction deficits

The second experiment tested the effects of intrahippocampal infusions of NaB and RC-3095 on extinction of IA memory. Rats were given bilateral dorsal hippocampal infusions of SAL or NaB 10 min before the first extinction session (i.e., Test 1), and SAL or RC-3095 immediately afterward. The resulting groups were SAL/SAL ($N = 10$); NaB/SAL ($N = 10$); SAL/RC-3095 ($N = 8$); and NaB/RC-3095 ($N = 9$). All rats were tested for extinction 1 (Test 2), 2 (Test 3), 3 (Test 4) and 4 (Test 5) days after the first retention test/extinction session. Immediately after Test 5, rats were given a reminder footshock and retention was tested again 1 day later in the absence of footshock.

The results showed that GRPR antagonism delayed extinction and that HDACi prevented this effect. Specifically, there was a significant effect of the drug manipulations on the first test given after the infusions (i.e., Test 2; $H = 9.58$, $df = 3$, $p = 0.02$; Fig. 2), but not on training ($H = 3.03$, $df = 3$, $p = 0.39$) or any of the other extinction tests (Test 1, $H = 0.37$, $df = 3$, $p = 0.95$; Test 3, $H = 3.70$, $df = 3$, $p = 0.30$; Test 4, $H = 3.47$, $df = 3$, $p = 0.32$; Test 5, $H = 0.77$, $df = 3$, $p = 0.86$). On Test 2, the SAL/RC-3095 group had significantly higher latencies than the SAL/SAL group ($p = 0.04$). Intrahippocampal infusion of NaB prevented this effect on extinction ($p = 0.97$ vs. SAL/SAL; $p = 0.04$ vs. SAL/RC-3095), although this dose of NaB alone did not affect extinction ($p = 0.31$ vs. SAL/SAL).

A priori comparisons suggest that the HDACi may have accelerated extinction because step-down latencies in the SAL/SAL group did not significantly decrease until Test 3 (Test 1 vs. Test 3, $p = 0.04$), whereas the step-down latencies for the NaB/SAL group were significantly decreased by Test 2 (Test 1 vs. Test 2, $p = 0.03$). By contrast GRPR antagonism likely impaired extinction because latencies *increased* from Test 1 to Test 2 ($p = 0.03$) in SAL/RC-3095 rats, and their step-down latencies were not significantly decreased until the fourth test ($p = 0.01$ vs. Test 1). More importantly, NaB prevented this effect of the GRPR antagonist on extinction. The change in latencies across test days in the NaB/RC-3095 group was similar to that of control rats, with step-down latencies significantly decreased at Test 3 (vs. Test 1, $p = 0.05$). The effects of the manipulations were not permanent and the original memory for IA training was intact because all groups displayed similar increases in latencies when tested 24 h after the

reminder footshock. Together, these results indicate that RC-3095 produced an impairment of extinction on Test 2 that was completely prevented by NaB.

Fig. 2 should be inserted here

3.3. Intrahippocampal infusions of an HDACi and GRPR antagonist increase hippocampal BDNF levels in IA-trained rats

We then went on to examine whether intrahippocampal infusions of NaB and/or RC-3095 would increase hippocampal BDNF levels in a separate group of rats given IA training (SAL/SAL, $N = 5$; NaB/SAL, $N = 5$; SAL/RC-3095, $N = 6$; NaB/RC-3095, $N = 5$). The results showed that pharmacological manipulations affected hippocampal BDNF levels ($F = 3.37$, $df = 3$, $p = 0.04$; Fig. 3). More specifically, the combination of HDACi and GRPR antagonist increased BDNF levels compared to SAL/SAL controls ($p = 0.02$).

Fig. 3 should be inserted here

3.4. Histology

All 95 rats included in the final statistical analysis of IA had cannulae bilaterally placed immediately above the dorsal hippocampus. Fig. 4 shows schematic drawings of the diffusion of methylene blue within the dorsal hippocampus.

Fig. 4 should be inserted here

4. Discussion

We have shown previously that blocking hippocampal GRPRs with RC-3095 impairs the consolidation and extinction of IA memory (Dantas et al., 2006; Luft et al., 2006; Roesler et al., 2003), whereas bombesin-induced activation of hippocampal GRPRs enhances memory (Roesler et al., 2006; 2009). Here we found that hippocampal infusions of the HDACi NaB prevent the impairing effect of the selective GRPR antagonist RC-3095 on both the consolidation and extinction of memory for IA.

Administration of RC-3095 after Test 1 increased retention latencies between the first and second tests, suggesting a strengthening of memory retention. We have recently found that extinction and strengthening of memories may be competing processes that can be triggered during IA retrieval. Thus, under conditions in which extinction is impaired, recall increases latencies measured in a subsequent test (Pedroso et al., 2013; Roesler et al., 2014b). These findings support the interpretation that the increased latencies observed after RC-3095 reflect impaired extinction.

As with consolidation, prior administration of NaB completely prevented the effect of GRPR antagonism on extinction. This finding is consistent with previous *in vitro* studies using cancer cell lines showing that HDACis influence the effects of GRPR ligands (Abujamra, Almeida, Brunetto, Schwartzmann, & Roesler, 2009; Moody et al., 2006). Neuronal GRPR signaling likely regulates memory by engaging multiple intracellular signaling pathways that ultimately activate transcription factors and increase gene expression associated with synaptic plasticity (Roesler et al., 2006; 2014a; Roesler & Schwartzmann, 2012). HDAC inhibition activates the transcription of genes preferentially involved in synaptic plasticity and memory, including those stimulated by cAMP response element-binding protein (CREB), which are also up-regulated by learning and protein kinase signaling (Abel & Zukin, 2008; Barrett & Wood, 2008; Gräff & Tsai, 2013a; Penney & Tsai, 2014; Vecsey et al., 2007). Thus, GRPR activation and HDAC inhibition may interact through overlapping mechanisms involving increased expression of genes involved in plasticity and memory, allowing HDAC inhibition to compensate for memory deficits produced by GRPR inhibition.

One of the genes influenced by HDAC is BDNF (Bredy et al., 2007; Wu et al., 2008), which is important for memory formation (Minichiello et al., 2009). Conditioned

fear extinction increases both histone H4 acetylation around a BDNF gene promoter and BDNF mRNA expression, and the HDACi valproic acid potentiates some of these effects (Bredy et al., 2007). HDAC2 represses the *bdnf exon IV* promoter, thereby decreasing BDNF expression associated with termination of a late phase of memory consolidation (Bambah-Mukku, Travaglia, Chen, Pollonini, & Alberini, 2014). Previous *in vitro* experiments using human cancer cells have indicated that increases in BDNF mRNA expression, protein content, and secretion appear to be compensatory responses to RC-3095 exposure (de Farias et al., 2010). Here we found that, although neither RC-3095 nor NaB altered hippocampal BDNF levels when given alone, combining the two drugs resulted in a significant increase in BDNF. This effect might represent a mechanism involved in mediating the protective effect of NaB on memory retention and extinction in rats given RC-3095.

In summary, the present study provides the first evidence that GRPR signaling and histone acetylation may interact functionally to regulate hippocampal memory. The findings show that HDACis protect against memory loss caused by GRPR inhibition. HDACis have shown promise as cognitive enhancers in several experimental models of memory dysfunction associated with aging and brain disorders (Abel & Zukin, 2008; Coppedè, 2014; Gräff and Tsai, 2013b; Kazantsev & Thompson, 2008), and GRPR dysfunction may contribute to cognitive impairment in neurodevelopmental disease (Presti-Torres et al., 2007; Roesler et al., 2014a; Roesler & Schwartzmann, 2012). From a translational perspective, characterization of the relationship between GRPR signaling and epigenetic modifications may thus help revealing novel approaches to treating neurodegenerative and psychiatric disorders.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 484185/2012-8, 303276/2013-4, and 400705/2014-1 to R.R); the Children's Cancer Institute (ICI); the HCPA institutional research fund (FIPE/HCPA); and the National Science Foundation (IOS 1121886 to M.B.P.). 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., & Zukin, R.S. (2008). Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Current Opinion in Pharmacology*, 8, 57-64.
- Abujamra, A.L., Almeida, V.R., Brunetto, A.L., Schwartsmann, G., & Roesler, R. (2009). A gastrin-releasing peptide receptor antagonist stimulates Neuro2a neuroblastoma cell growth: prevention by a histone deacetylase inhibitor. *Cell Biology International*, 33, 899-903.
- Alarcón, J.M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E.R., et al. (2004). Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP \pm mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*, 42, 947-959.
- Bambah-Mukku, D., Travaglia, A., Chen, D.Y., Pollonini, G., & Alberini, C.M. (2014). A positive autoregulatory BDNF feedback loop via C/EBP β mediates hippocampal memory consolidation. *Journal of Neuroscience*, 34, 12547-12559.
- 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.
- Blank, M., Dornelles, A.S., Werenicz, A., Velho, L.A., Pinto, D.F., Fedi, A.C., et al. (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, T.W., & Barad, M. (2008). The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learning & Memory*, 15, 39-45.

- Bredy, T.W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y.E., & Barad, M. (2007) Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learning & Memory*, *14*, 268-276.
- Bridi, M. & Abel, T. (2013). Histone modifications in the nervous system and neuropsychiatric disorders. IN: Sweatt, J.D., Meaney, M.J., Nestler, E., & Akbarian, S. (Eds.), *Epigenetic Regulation in the Nervous System: Basic Mechanisms and Clinical Impact*, pp. 35-67 ; Academic Press.
- Coppedè, F. (2014). The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Genetics*, *5*, 220.
- Dantas, A.S., Luft, T., Henriques, J.A., Schwartzmann ,G., & Roesler, R. (2006). Opposite effects of low and high doses of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus: possible involvement of the GABAergic system. *Peptides*, *27*, 2307-2312.
- Day, J.J., Sweatt, J.D. (2011). Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron*, *70*, 813-829.
- de Farias, C.B., Rosemberg, D.B., Heinen, T.E., Koehler-Santos, P., Abujamra, A.L., Kapczinski, F., et al. (2010). BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology*, *79*, 430-439.
- Gräff, J., & Tsai, L.H. (2013a). Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*, 97-111.
- Gräff, J., & Tsai, L.H. (2013b). The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *53*, 311-330.
- Gonzalez, N., Moody, T.W., Igarashi, H., Ito, T., & Jensen R.T. (2008). Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*, *15*, 58-64.
- Goulart, B.K., de Lima, M.N.M., de Farias, C.B., Reolon, G.K., Almeida, V.R., Quevedo, J., et al. (2010). Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, *167*, 969-973.

- 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.
- Jensen, R.T., Battey, J.F., Spindel, E.R., & Benya, R.V. (2008). International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacological Reviews* *60*, 1-42.
- Kauer-Sant'Anna, M., Andrezza, A.C., Valvassori, S.S., Martins, M.R., Barbosa, L.M., Schwartsmann, G., et al. (2007). A gastrin-releasing peptide receptor antagonist blocks D-amphetamine-induced hyperlocomotion and increases hippocampal NGF and BDNF levels in rats. *Peptides*, *28*, 1447-1452.
- Kazantsev, A.G., & Thompson, L. M. (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, *7*, 854-868.
- Kilgore, M., Miller, C.A., Fass, D.M., Hennig, K.M., Haggarty, S.J., Sweatt J.D., et al. (2010). Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, *35*, 870-880.
- 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.
- 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.
- 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.
- Merali, Z., Presti-Torres, J., Mackay, J.C., Johnstone, J., Du, L., St-Jean, A., et al. (2014). Long-term behavioral effects of neonatal blockade of gastrin-releasing peptide receptors in rats: similarities to autism spectrum disorders. *Behavioural Brain Research*, *263*, 60-69.
- Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*, 850-860.
- Moody, T.W., Nakagawa, T., Kang, Y., Jakowlew, S., Chan, D., & Jensen, R.T. (2006). Bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonists increase the ability of histone deacetylase inhibitors to reduce lung cancer proliferation. *Journal of Molecular Neuroscience*, *28*, 231-238.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). San Diego: Academic Press.
- Peixoto, L., & Abel, T. (2013). The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology*, *38*, 62-76.
- Pedroso, T.R., Jobim, P.F., Carvalho, L.M., Christoff, R.R., Maurmann, N., Reolon, G.K., et al. (2013). Inhibition of protein synthesis or mTOR in the basolateral amygdala blocks retrieval-induced memory strengthening. *Journal of Neural Transmission*, *120*, 1525-1531.
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R.C., et al. (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science*, *328*, 753-756.
- Penney, J., & Tsai, L.H. (2014). Histone deacetylases in memory and cognition. *Science Signaling*, *7*, re12.
- Presti-Torres, J., de Lima, M.N., Scalco, F.S., Caldana, F., Garcia, V.A., Guimarães, M.R., et al. (2007). Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-

releasing peptide receptor blockade in rats: Implications for an animal model of neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*, *52*, 724-732.

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., Kent, P., Luft, T., Schwartzmann, G., & Merali, Z. (2014a). Gastrin-releasing peptide receptor signaling in the integration of stress and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *112*, 44-52.

Roesler, R., Kent, P., Schroder, N., Schwartzmann, G., & Merali, Z. (2012). Bombesin receptor regulation of emotional memory. *Reviews in the Neurosciences*, *23*, 571-586.

Roesler, R., Kopschina, M.I., Rosa, R.M., Henriques, J.A.P., Souza, D.O., Schwartzmann, G. (2004a). RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, *486*, 35-41.

Roesler, R., Lessa, D., Venturella, R., Vianna, M.R., Luft, T., Henriques, J.A.P., et al. (2004b). 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.S., 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., Meller, C.A., Kopschina, M.I., Souza, D.O., Henriques, J.A.P., & Schwartzmann, G. (2003). Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides*, *24*, 1069-1074.

Roesler, R., Reolon, G.K., Maurmann, N., Schwartzmann, G., Schroder, N., Amaral, O.B., et al. (2014b). A phosphodiesterase 4-controlled switch between memory extinction and strengthening in the hippocampus. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*, 91.

- Roesler, R., & Schwartzmann, G. (2012). Gastrin-releasing peptide receptors in the central nervous system: role in brain function and as a drug target. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 3, 159.
- Roesler, R., Valvassori, S.S., Castro, A.A., Luft, T., Schwartzmann, G., & Quevedo, J. (2009). Phosphoinositide 3-kinase is required for bombesin-induced enhancement of fear memory consolidation in the hippocampus. *Peptides*, 30, 1192-1196.
- 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.
- 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.
- Wu, X., Chen, P.S., Dallas, S., Wilson, B., Block, M.L., Wang, C.C., et al. (2008). Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 11, 1123-1134.

Legends for figures

Fig. 1. The HDACi NaB prevents the impairment of IA memory consolidation induced by GRPR antagonism in the dorsal hippocampus. Rats were given bilateral infusions of SAL or NaB (100 mM) 10 min before being trained in IA, and SAL or RC-3095 (1 µg/0.5 µl) into the dorsal hippocampus immediately after IA training; $N = 13-18$ animals per group. Retention was tested 24 h later. Data are mean \pm S.E.M. step-down latencies (s); $*p < 0.05$ compared to SAL/SAL control group.

Fig. 2. The HDACi NaB prevents the impairment of IA memory extinction induced by GRPR antagonism in the dorsal hippocampus. Rats were given bilateral infusions of SAL or NaB (100 mM) 10 min before the first extinction training session (Test 1), and SAL or RC-3095 (1 µg/0.5 µl) into the dorsal hippocampus immediately after Test 1; $N = 8-10$ animals per group. Data are mean \pm S.E.M. step-down latencies (s); $*p < 0.05$ compared to SAL/SAL controls.

Fig. 3. Intrahippocampal infusions of the HDACi NaB followed by the GRPR antagonist RC-3095 increases BDNF levels in the hippocampus of rats trained in IA. Rats were given bilateral infusions of SAL or NaB (100 mM) 10 min before being trained in IA, and SAL or RC-3095 (1 µg/0.5 µl) into the dorsal hippocampus immediately after IA training. Four h after IA training, rats were sacrificed and the hippocampal BDNF levels were measured with an ELISA assay; $N = 5-6$ animals per group. Data are mean \pm S.E.M. pg of BDNF/µg of protein; $*p < 0.05$ compared to the SAL/SAL and SAL/RC-3095 groups.

Fig. 4. Infusion placements into the dorsal hippocampus. Schematic diagrams of different coronal sections of the rat brain, adapted from the atlas of Paxinos & Watson (2007), depicting the diffusion of methylene blue in the dorsal hippocampus for rats included in the final statistical analysis.

Figure 1

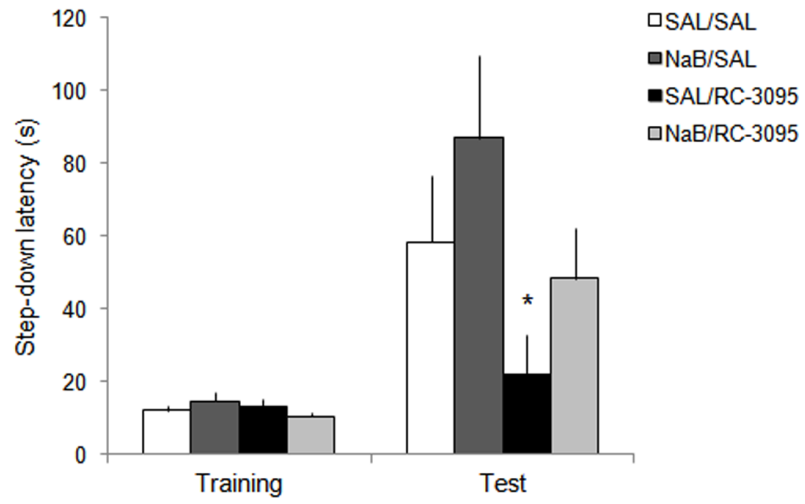


Figure 2

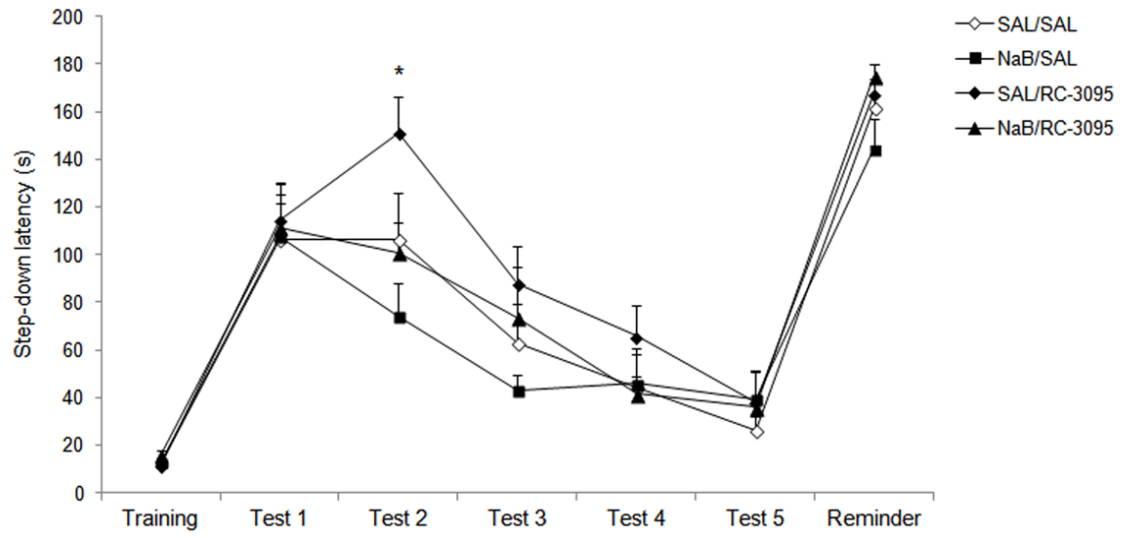


Figure 3

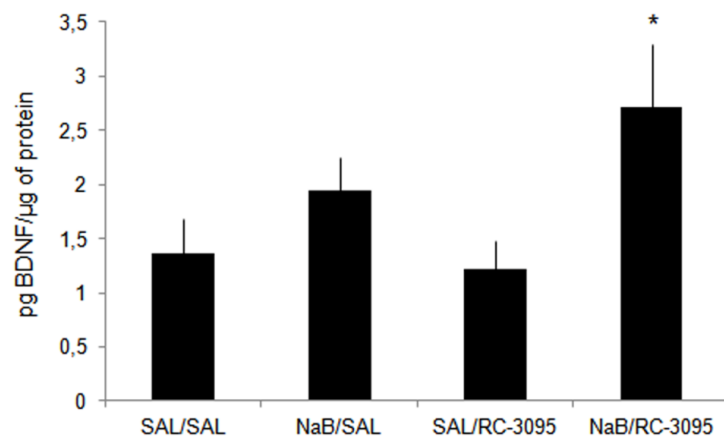
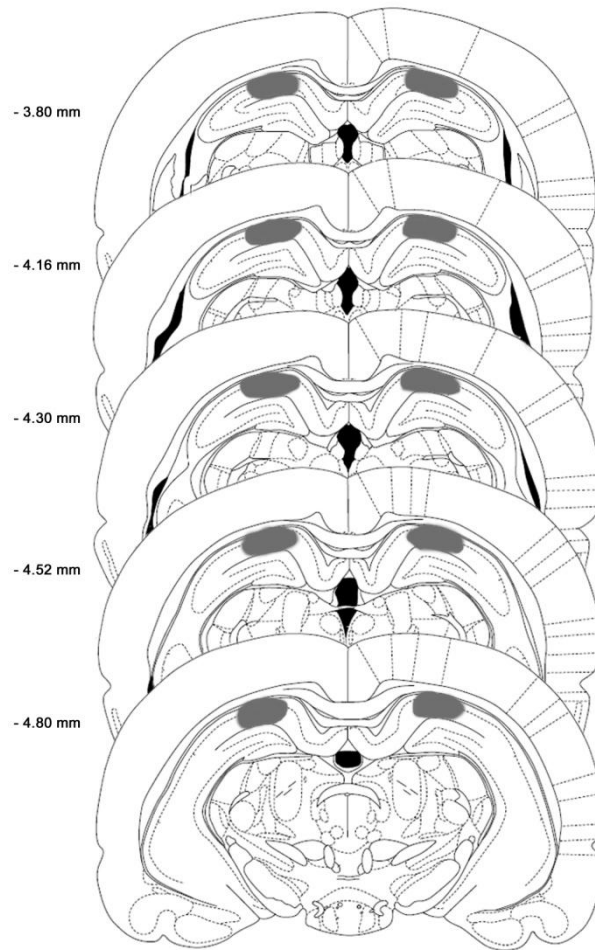


Figure 4



4. RESULTADOS COMPLEMENTARES

4.1. Avaliação dos níveis hipocampais de BDNF

4.1.1. Material e métodos

Animais foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de EI como descrito anteriormente. Outros dois grupos de ratos foram expostos por 180 s à caixa de EI sem receber choque ou apenas receberam o choque sem explorar a caixa de EI. Esses animais ($N = 5-6$ por grupo de tratamento) receberam infusões intra-hipocampais de SAL ou NaB e de SAL ou RC-3095, respectivamente 10 minutos antes e imediatamente após o treino, à exposição ao choque ou à exposição à caixa de EI. Um grupo adicional de ratos ($N = 5-6$ por grupo de tratamento) permaneceu na caixa moradia até receber as infusões das drogas. Quatro horas após a última infusão foi feita a eutanásia dos animais por decapitação. Seus cérebros foram removidos e os hipocampus rapidamente dissecados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a avaliação dos níveis de BDNF.

Os níveis hipocampais de BDNF foram avaliados como previamente descrito (Kauer-Sant'Anna *et al.*, 2007; Goulart *et al.*, 2010), utilizando kit comercial ELISA de acordo com as instruções do fabricante (ChemiKine TM, CYT306, Millipore, USA). As amostras foram homogeneizadas em PBS com PMSF (1 mM) e EGTA (1 mM). Uma placa de 96 poços de fundo plano foi coberta por 24 h com as amostras diluídas (1:2) e com a curva padrão variando de 7,8 a 500 pg/ml de BDNF. A placa foi, então, lavada por quatro vezes com tampão de lavagem e o anticorpo monoclonal anti-BDNF (diluído 1:1000) foi adicionado a cada poço e incubado por 3 h em temperatura ambiente. Após um novo procedimento de lavagem, o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluído 1:1000) foi adicionado a cada poço e incubado por 1 h em temperatura ambiente. Após a adição da enzima estreptavidina, de substrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina - TMB) e da solução de parada, a quantidade de BDNF foi determinada por absorbância a 450 nm. A curva padrão demonstra uma relação direta entre a densidade óptica e a concentração de BDNF. A quantidade de proteína total foi avaliada pelo método de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Os resultados foram avaliados utilizando ANOVA de uma via seguida por teste post hoc LSD. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M).

4.1.2. Resultados

Neste experimento, objetivou-se avaliar se infusões intra-hipocâmpais de NaB e/ou de RC-3095 poderiam alterar os níveis de BDNF em hipocampo de ratos treinados ou não na tarefa de EI. Na figura 1 estão representados os resultados para os diferentes grupos de animais.

Considerando todos os grupos (animais treinados na tarefa de EI, animais que somente receberam choques, animais que foram somente expostos à caixa de EI e animais que permaneceram na caixa moradia), foi observada uma diferença significativa entre os grupos de tratamento ($F = 2,18$, $df = 15$, $p = 0,02$). O teste LSD mostrou que animais que receberam infusões de NaB/RC-3095 em todos os quatro grupos tiveram níveis hipocâmpais de BDNF aumentados quando comparados a animais que receberam infusões de SAL/SAL e que foram treinados na EI ($p = 0,01$ quando comparado ao grupo NaB/RC-3095 treinado; $p = 0,03$ quando comparado ao grupo NaB/RC-3095 exposto somente ao choque; $p = 0,02$ quando comparado ao grupo NaB/RC-3095 exposto somente à caixa de EI; $p = 0,02$ quando comparado ao grupo NaB/RC-3095 caixa moradia). Além disso, todos os quatro grupos de animais NaB/RC-3095 mostraram níveis hipocâmpais de BDNF aumentados quando comparados a ratos treinados e que receberam SAL/RC-3095 ($p = 0,004$ quando comparado ao grupo NaB/RC-3095 treinado; $p = 0,01$ quando comparado ao grupo NaB/RC-3095 exposto somente ao choque; $p = 0,007$ quando comparado ao grupo NaB/RC-3095 exposto somente à caixa de EI; $p = 0,008$ quando comparado ao grupo NaB/RC-3095 caixa moradia). Os animais que receberam infusões de NaB/RC-3095 e que foram treinados na tarefa de EI mostraram níveis de BDNF aumentados em hipocampo não só quando comparados a ratos SAL/SAL treinados como mencionado anteriormente, mas também quando comparados ao grupo SAL/SAL choque ($p = 0,006$), ao grupo SAL/SAL somente exposto à caixa de EI ($p = 0,02$) e ao grupo SAL/SAL caixa moradia ($p = 0,04$).

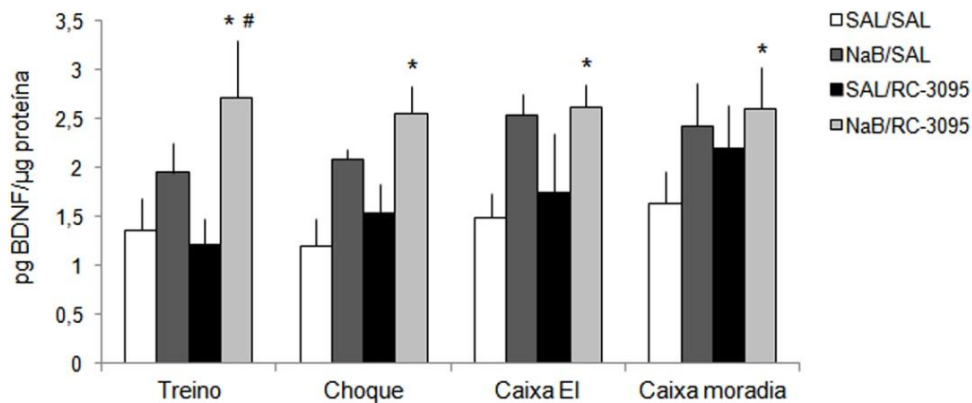


Figura 1. Infusões intra-hipocâmpais de NaB e de RC-3095 aumentam os níveis de BDNF no hipocampo. Animais receberam infusões bilaterais de SAL ou NaB (100 mM) e de SAL ou RC-3095 (1μg/0,5μl) no hipocampo dorsal, respectivamente, 10 min antes e imediatamente após serem treinados na tarefa de EI, receberem somente os choques ou serem somente expostos à caixa de EI. Um grupo adicional de animais recebeu as infusões das drogas e permaneceu na caixa moradia. 4 h após a última infusão, os animais foram eutanasiados e os níveis hipocâmpais de BDNF foram avaliados por ELISA. $N = 5-6$ animais por grupo. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. de pg de BDNF/μg de proteína; * $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL/SAL treino e SAL/RC-3095 treino; # $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL/SAL treino, SAL/SAL choque, SAL/SAL caixa EI e SAL/SAL caixa moradia.

4.2. Avaliação dos níveis hipocâmpais de H3 acetilada

4.2.1. Material e métodos

24 animais ($N = 6$ por grupo) receberam infusões intra-hipocâmpais de SAL ou NaB e, após 10 minutos, SAL ou RC-3095. Uma hora após a última infusão, os animais foram eutanasiados por decapitação. Seus cérebros foram removidos e os hipocampus rapidamente dissecados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a avaliação dos níveis de acetilação de H3.

Os níveis hipocâmpais de H3 acetilada foram avaliados com kit comercial de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (PathScan Acetylated Histone H3 Sandwich ELISA Kit #7232, Cell Signaling). As amostras foram homogeneizadas em solução de tampão de lise com 1 mM de PMSF. Os lisados foram, então, centrifugados por 10 min (14.000 rpm) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o supernadante foi removido para análise. As amostras diluídas (1:2) foram adicionadas a uma placa de 96 poços de fundo plano por 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As placas foram, então, lavadas por quatro vezes com tampão de lavagem e adicionou-se o anticorpo de detecção para lisina acetilada a cada poço por 1 h a 37 °C. Após o procedimento de lavagem, o anticorpo secundário conjugado à peroxidase foi adicionado a cada poço e incubado por 30 min a 37 °C. O procedimento de lavagem foi repetido e após a adição do substrato TMB por 10 min a 37 °C e da solução de parada, a quantidade de H3 acetilada foi determinada por absorbância a 450 nm. A quantidade de proteína total foi avaliada pelo método de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Os resultados foram avaliados utilizando ANOVA de uma via seguida por teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M).

4.2.2. Resultados

Neste experimento, objetivou-se avaliar se infusões intra-hipocâmpais do iHDAC NaB e/ou do antagonista de GRPR RC-3095 poderiam alterar os níveis de acetilação de H3 no hipocampo de ratos. Os resultados estão representados na figura 2. Não foi observada diferença significativa nos níveis de H3 acetilada entre os grupos ($F = 0,702$, $df = 3$, $p = 0,506$) 1 h após a última infusão.

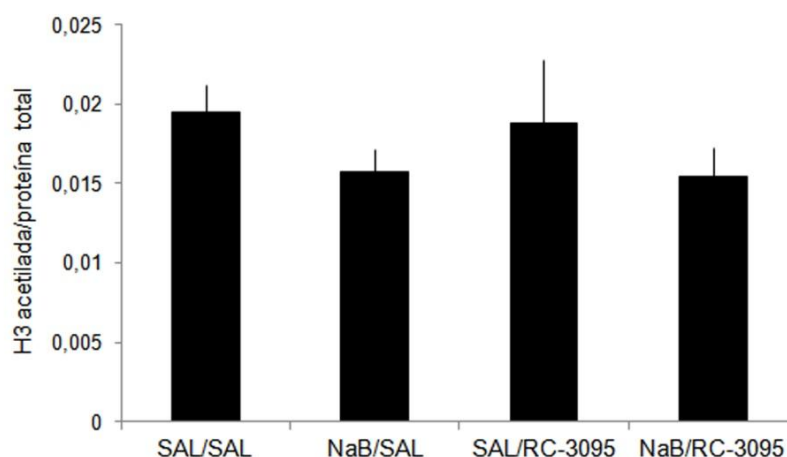


Figura 2. Infusões intra-hipocâmpais de NaB e de RC-3095 não alteram os níveis de H3 acetilada no hipocampo. Os animais receberam infusões bilaterais de salina (SAL) ou NaB (100 mM) 10 min antes das infusões de SAL ou RC-3095 (1 μ g/0,5 μ l) no hipocampo dorsal. 1 h após a última infusão, os animais foram eutanasiados e os níveis hipocâmpais de H3 acetilada foram avaliados por ELISA. $N = 6$ animais por grupo. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M de H3 acetilada/proteína total.

5. DISCUSSÃO

A formação de memórias motivadas emocionalmente é influenciada de maneira importante por mecanismos de sinalização desencadeados por diversos neuropeptídeos produzidos por neurônios e que atuam pela ativação específica de seus receptores de membrana. No SNC, a via de sinalização desencadeada pela ativação de GRPR tem sido relacionada a diversas funções cerebrais, especialmente àquelas relacionadas à formação de memórias emocionais. De maneira também importante, mecanismos epigenéticos, como a acetilação de histonas, têm sido associados à modulação da plasticidade sináptica, do aprendizado e da memória. Embora muitos estudos tenham sido feitos objetivando elucidar o papel exercido pelo antagonismo de GRPR e pela ação de diferentes inibidores de HDACs na formação da memória, até o presente momento não havia evidência de uma possível interação funcional entre esses dois sistemas especificamente em processos relacionados a memórias motivadas emocionalmente. Este trabalho teve como primeiros objetivos, avaliar se o iHDAC NaB poderia prevenir os efeitos induzidos pela administração hipocampal do antagonista de GRPR RC-3095 sobre a consolidação e a extinção da memória aversiva. A partir disso, objetivou-se esclarecer se os efeitos observados sobre a memória a partir da administração dessas drogas poderiam estar relacionados à alteração nos níveis hipocampais de BDNF e de acetilação da histona H3.

Os resultados aqui demonstrados indicaram que a consolidação da memória aversiva na tarefa de EI foi prejudicada pela infusão intra-hipocampal pós-treino de RC-3095 e que esse efeito foi prevenido pela infusão pré-treino de uma dose por si só inefetiva de NaB. Efeitos prejudiciais decorrentes do antagonismo de GRPR foram também observados para a extinção da memória aversiva, já que infusões intra-hipocampais de RC-3095 imediatamente após a primeira sessão de extinção resultaram em prejuízo no processo de extinção da memória previamente formada. Esse efeito também foi prevenido pela administração de NaB previamente à primeira sessão de extinção. Além disso, observou-se que infusões de NaB seguidas de RC-3095 provocaram um aumento nos níveis hipocampais de BDNF, embora esses tratamentos não tenham induzido alteração nos níveis de H3 acetilada.

Os primeiros resultados demonstrados neste trabalho, relativos à consolidação da memória, suportam a ideia de que o bloqueio hipocampal de GRPR após o aprendizado da

tarefa de EI prejudica a retenção desta memória, confirmando observações anteriores (Dantas *et al.*, 2006; Preissler *et al.*, 2007; Roesler *et al.*, 2003; Venturella *et al.*, 2005). Confirmou-se também a evidência de que NaB na concentração de 100 mM não exerce efeito sobre a consolidação da memória de EI (Blank *et al.*, 2014). A partir da constatação de que a infusão prévia de NaB foi capaz de prevenir os efeitos induzidos pelo RC-3095, pode-se concluir que a inibição de HDACs seja capaz de prevenir totalmente ou compensar os efeitos prejudiciais desencadeados pelo bloqueio de GRPR sobre a consolidação da memória aversiva.

O segundo experimento relatado nesta dissertação relaciona-se ao processo de extinção da memória de medo. Sabe-se que a evocação, sem o reforço, de uma memória aversiva previamente consolidada pode levar a sua extinção. Este processo envolve a formação de uma nova memória em associação à inibição da evocação da memória original. Justamente por tratar-se de um novo aprendizado, esse processo requer mecanismos hipocampais similares aos da fase de consolidação de memórias de longa duração. Demonstrou-se previamente que o bloqueio de GRPR dificulta a extinção de memórias relacionadas a medo após a reexposição de animais ao mesmo contexto na ausência do estímulo aversivo (Luft *et al.*, 2006). Neste trabalho, demonstrou-se que a administração de RC-3095 após a primeira sessão de extinção provocou o reforço da memória previamente formada, efeito este observado na sessão seguinte à administração da droga, ou seja, 24 horas após a primeira sessão de extinção. Esse aumento na retenção da memória foi evidenciado especificamente nesse momento e não se manteve nos testes subsequentes. Recentemente demonstrou-se que a evocação da memória de EI pode desencadear distintos processos de extinção e de reforço da memória (Roesler *et al.*, 2014b). Dessa maneira, o reforço da memória aversiva original, em uma condição que levaria ao processo de extinção, corrobora a ideia de que houve o bloqueio desse processo. Em relação à utilização do NaB, também foi observado um efeito protetor dessa droga frente aos efeitos induzidos pelo bloqueio do receptor no processo de extinção. Animais que receberam infusões de NaB e de RC-3095, respectivamente antes e imediatamente após a primeira sessão de extinção não apresentaram o reforço da memória original e se mostraram semelhantes aos animais controle no teste 24 horas após a administração das drogas.

De maneira importante, embora a concentração utilizada de NaB não tenha exercido efeito facilitador sobre a extinção quando feita a comparação com animais controle para cada um dos testes após a sessão de extinção, a administração desse iHDAC permitiu que os animais exibissem uma diminuição na latência de descida da plataforma já no segundo teste (seguinte à primeira sessão de extinção), enquanto que o grupo controle apresentou essa diminuição somente no terceiro teste. Animais que receberam infusões de SAL/RC-3095 somente mostraram diminuição significativa na latência de descida no quarto teste quando comparados ao primeiro, enquanto que o grupo que recebeu infusões de NaB previamente às de RC-3095 mostraram esse efeito já no terceiro teste, assim como os animais controle. Em conjunto, esses dados sugerem que a inibição de HDACs pode prevenir completamente o reforço da memória aversiva e, conseqüentemente, o prejuízo no processo de extinção causado pelo bloqueio de GRPR.

Alguns mecanismos podem ser cogitados para justificar a evidência de que a ativação de GRPR não é crucial para a formação e para a extinção da memória aversiva quando HDACs estão inibidas. A sinalização neuronal desencadeada pela ativação de GRPR conduz à ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular, as quais podem, por sua vez, ativar fatores de transcrição, aumentando, assim, a expressão de genes imediatos associados à formação de novas memórias (Roesler *et al.*, 2006a; 2014a; Roesler & Schwartsmann, 2012). De maneira similar, a indução de uma estrutura mais relaxada da cromatina a partir da inibição de HDACs, permite o acesso da maquinaria de transcrição a regiões do DNA, o que pode aumentar a transcrição de genes preferencialmente envolvidos na plasticidade sináptica e na formação da memória, como aqueles estimulados por CREB e que são também ativados como consequência do aprendizado e da sinalização por proteínas cinases (Abel & Zukin, 2008; Barrett & Wood, 2008; Gräff & Tsai, 2013a; Penney & Tsai, 2014; Vecsey *et al.*, 2007). Considerando, então, que a ativação de GRPR e que a inibição de HDACs levam a mecanismos que se sobrepõem, é possível que essa modulação epigenética esteja permitindo ou aumentando a expressão de genes necessários durante a consolidação e a extinção da memória, compensando assim o bloqueio da via de sinalização por GRPR. Além dessa possibilidade, deve-se considerar que iHDACs podem atuar também por mecanismos extra-epigenéticos. Trabalhos demonstraram que o NaB pode estimular as vias de AMPc/PKA, PKC e MAPK (Prasad & Sinha, 1976; Rivero & Adunyah, 1996; 1998). A estimulação dessas vias poderia, por sua vez, induzir a

fosforilação de CREB e outros fatores de transcrição, tendo como consequência o aumento da transcrição de RNA e da síntese de proteínas envolvidas na formação da memória.

O terceiro objetivo deste trabalho foi avaliar se os efeitos observados para NaB e RC-3095 sobre a formação da memória aversiva poderiam estar relacionados à alteração nos níveis hipocampais de BDNF, já que esta é uma neurotrofina importantemente envolvida em eventos relacionados à memória e à plasticidade sináptica. Em relação à utilização de iHDACs, foi demonstrado que o ácido valpróico pode facilitar a extinção da memória de medo aumentando a acetilação da histona H4 em torno de promotores do gene de BDNF (Bredy *et al.*, 2007). Por outro lado, aumentos na expressão do mRNA, no conteúdo e na secreção de BDNF foram relacionados a uma possível resposta compensatória após a exposição de células humanas de câncer ao RC-3095 (de Farias *et al.*, 2010). Além disso, demonstrou-se que animais em que foram administradas doses específicas sistêmicas de RC-3095 apresentaram níveis hipocampais de BDNF aumentados (Kauer-Sant'Anna *et al.*, 2007). Neste trabalho, animais que receberam infusões de NaB seguidas de RC-3095 apresentaram níveis aumentados de BDNF em hipocampo 4 horas após o treino e esta alteração não foi observada a partir da administração das mesmas drogas quando não combinadas. Além disso, o aumento no imunoconteúdo hipocampal de BDNF foi observado independentemente da condição dos animais serem treinados ou não na tarefa de EI, o que sugere que esse resultado seja um efeito das drogas, não estando vinculado à condição de treino, ou seja, ao aprendizado completo da tarefa comportamental. Considerando a importância dessa neurotrofina no SNC, pode-se sugerir, ao menos em parte, que a prevenção exercida pela inibição de HDACs sobre os efeitos prejudiciais desencadeados pelo antagonismo de GRPR na formação da memória possa estar relacionada ao aumento no conteúdo de BDNF. Dessa forma, quando a sinalização por GRPR está bloqueada, mas há a inibição de HDACs, o possível aumento nos níveis de BDNF poderia auxiliar na compensação do bloqueio desse receptor, possibilitando, assim, a formação da memória no hipocampo.

O quarto experimento realizado neste trabalho teve por objetivo avaliar se os efeitos exercidos pelo NaB estariam relacionados ao aumento na acetilação da histona H3. Embora estudos anteriores tenham relatado aumento na acetilação dessa histona após a administração de NaB (Itzhak *et al.*, 2012) ou de TSA (Vecsey *et al.*, 2007), resultados estes observados em hipocampo, a infusão de NaB no presente trabalho não provocou

alterações nos níveis de acetilação de H3, pelo menos 1 hora após a infusão dessa droga. Considerando que as modificações epigenéticas ocorrem de maneira transitória, a acetilação dessa histona pode ter ocorrido em tempo diferente do escolhido para a análise. Além disso, um aumento na acetilação de outras histonas, que não a H3, pode ter ocorrido.

Em conclusão, os resultados desta dissertação indicam que a via de sinalização por GRPR e o mecanismo epigenético de acetilação de histonas podem interagir funcionalmente na formação da memória aversiva, e sugerem que a inibição de HDACs pode prevenir o prejuízo da memória decorrente do bloqueio desse receptor. Além disso, o aumento nos níveis hipocâmpais de BDNF pode ser um mecanismo envolvido nesse efeito compensatório.

Do ponto de vista translacional, considerando que a via de sinalização de GRP/GRPR pode estar prejudicada em doenças psiquiátricas, como a esquizofrenia (Gerner *et al.*, 1985; Olincy *et al.*, 1999), em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (Gibson *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1994) e Parkinson (Bissette *et al.*, 1985) e desordens do neurodesenvolvimento, os resultados aqui relatados reforçam a ideia de que iHDACs possam ser considerados como potenciais terapias para a melhora cognitiva.

6. CONCLUSÕES

Os resultados desta dissertação indicam que a via de sinalização por GRPR e o mecanismo epigenético de acetilação de histonas podem interagir funcionalmente na formação e na extinção da memória aversiva, e sugerem que a inibição de HDACs pode prevenir o prejuízo da memória decorrente do bloqueio desse receptor e que o aumento nos níveis hipocámpais de BDNF pode ser um mecanismo envolvido nesse efeito compensatório.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, T. & ZUKIN, R. S. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(1): 57-64, 2008.

ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences*, 28(1): 51-56, 2005.

ALBERINI, C. M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, 89(1): 121-145, 2009.

ALBERINI, C. M. & KANDEL, E. R. The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1): 1-18, 2015.

ALBERINI, C. M.; MILEKIC, M. H. & TRONEL, S. Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(9): 999-1008, 2006.

BARRETT, R. M. & WOOD, M. A. Beyond transcription factors: the role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learning & Memory*, 15(7): 460-467, 2008.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. & MEDINA J. H. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist*, 14(2): 147-156, 2008.

BISSETTE, G.; NEMEROFF, C. B.; DECKER, M. W.; KIZER, J. S.; AGID, Y. & JAVOYAGID F. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinsons-disease. *Annals of Neurology*, 17(4): 324-328, 1985.

BLANK, M.; DORNELLES, A. S.; WERENICZ, A.; VELHO, L. A.; PINTO, D. F.; FEDI, A. C.; SCHRODER, N. & 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*, 111: 1-8, 2014.

BREDY, T. W.; WU, H.; CREGO, C.; ZELLHOEFER, J.; SUN, Y. E. & BARAD, M. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learning & Memory*, 14(4): 268-276, 2007.

CAMMAROTA, M.; BARROS, D. M.; VIANNA, M. R. M.; BEVILAQUA, L. R. M.; COITINHO, A.; SZAPIRO, G.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H. & IZQUIERDO I. The transition from memory retrieval to extinction. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76(3): 573-582, 2004.

CHATZISTAMOU, I.; SCHALLY, A. V.; SUN, B.; ARMATIS, P. & SZEPESHAZI, K. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c-jun and c-fos oncogene expression by bombesin antagonists. *British Journal of Cancer*, 83(7): 906-913, 2000.

CHEN, P. W. & KROOG, G. S. Alterations in receptor expression or agonist concentration change the pathways gastrin-releasing peptide receptor uses to regulate extracellular signal-regulated kinase. *Molecular Pharmacology*, 66(6): 1625-1634, 2004.

DANTAS, A. S.; LUFT, T.; HENRIQUES, J. A. P.; SCHWARTSMANN, G. & ROESLER, R. Opposite effects of low and high doses of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus: possible involvement of the gabaergic system. *Peptides*, 27(9): 2307-2312, 2006.

DAY, J. J. & SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron*, 70(5): 813-829, 2011.

DE FARIAS, C. B.; ROSEMBERG, D. B.; HEINEN, T. E.; KOEHLER-SANTOS, P.; ABUJAMRA, A. L.; KAPCZINSKI, F.; BRUNETTO, A. L.; ASHTON-PROLLA, P.; MEURER, L.; BOGO, M. R.; DAMIN, D. C.; SCHWARTSMANN, G. & ROESLER, R.

BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology*, 79(5-6): 430-439, 2010.

DUDAI, Y. & MORRIS, R. G. M. To consolidate or not to consolidate: what are the questions? In: Bolhuis, J. J. (ed.) *Brain, Perception, Memory. Advances in Cognitive Sciences*. Oxford: Oxford University Press, p. 149-162, 2000.

ERSPAMER, V.; ERPAMER, G. F. & INSELVINI, M. Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. *J Pharm Pharmacol*, 22(11): 875-6, 1970.

FISCHER, A.; SANANBENESI, F.; WANG, X. Y.; DOBBIN, M. & TSAI, L. H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, 447(7141): 178-U2, 2007.

FISCHER, A.; SANANBENESI, F.; MUNGENAST, A. & TSAI, L. H. Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(12): 605-617, 2010.

FLORES, D. G.; MEURER, L.; UBERTI, A. F.; MACEDO, B. R.; LENZ, G.; BRUNETTO, A. L.; SCHWARTSMANN, G. & ROESLER, R. Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. *Brain Research Bulletin*, 82(1-2): 95-98, 2010.

GERNER, R. H.; VANKAMMEN, D. P. & NINAN, P. T. Cerebrospinal-fluid cholecystinin, bombesin and somatostatin in schizophrenia and normals. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 9(1): 73-82, 1985.

GIBSON, G. E.; VESTLING, M.; ZHANG, H.; SZOLOS, S.; ALKON, D.; LANNFELT, L.; GANDY, S. & COWBURN, R. F. Abnormalities in Alzheimer's disease fibroblasts bearing the App670/671 mutation. *Neurobiology of Aging*, 18(6): 573-580, 1997.

GONZALEZ, N.; MOODY, T. W.; IGARASHI, H.; ITO, T. & JENSEN, R. T. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*, 15(1): 58-64, 2008.

GOULART, B. K.; DE LIMA, M. N. M.; DE FARIAS, C. B.; REOLON, G. K.; ALMEIDA, V. R.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; SCHRODER, N. & ROESLER, R. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, 167: 969-973, 2010.

GRÄFF, J. & TSAI, L. H. Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(2): 97-111, 2013a.

GRÄFF, J. & TSAI, L. H. The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53: 311-330, 2013b.

HABERLAND, M.; MONTGOMERY, R. L. & OLSON, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics*, 10(1): 32-42, 2009.

HELLMICH, M. R.; IVES, K. L.; UDUPI, V.; SOLOFF, M. S.; GREELEY, G. H.; CHRISTENSEN, B. N. & TOWNSEND, C. M. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34): 23901-23909, 1999.

ISHIKAWA-BRUSH, Y.; POWELL, J. F.; BOLTON, P.; MILLER, A. P.; FRANCIS, F.; WILLARD, H. F.; LEHRACH, H. & MONACO, A. P. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. *Human Molecular Genetics*, 6(8): 1241-1250, 1997.

ITO, E.; OKA, K.; ETCHEBERRIGARAY, R.; NELSON, T. J.; MCPHIE, D. L.; TOFELGREHL, B.; GIBSON, G. E. & ALKON, D. L. Internal Ca²⁺ mobilization is

altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2): 534-538, 1994.

ITZHAK, Y.; ANDERSON, K. L.; KELLEY, J. B. & PETKOV, M. 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(4): 409-417, 2012.

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 of Learning and Memory*, 68(3): 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, L. A. & BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 103(1): 1-11, 1999.

IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J. H. & BEVILAQUA, L. R. M. Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: a general view. *Neural Plasticity*, 11(3-4): 159-189, 2004.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R. M.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; MEDINA, J. H. & CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*, 29(9): 496-505, 2006.

JENSEN, R. T.; BATTEY, J. F.; SPINDEL, E. R. & BENYA, R. V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacological Reviews*, 60(1): 1-42, 2008.

KAMICHI, S.; WADA, E.; AOKI, S.; SEKIGUCHI, M.; KIMURA, I. & WADA, K. Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain. *Brain Research*, 1032(1-2): 162-170, 2005.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Molecular Brain*, 5: 1-12, 2012.

KANDEL, E. R.; DUDAI, Y. & MAYFORD, M. R. The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1): 163-186, 2014.

KAUER-SANT'ANNA, M.; ANDREAZZA, A. C.; VALVASSORI, S. S.; MARTINS, M. R.; BARBOSA, L. M.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R.; QUEVEDO, J. & KAPCZINSKI, F. A gastrin-releasing peptide receptor antagonist blocks D-amphetamine-induced hyperlocomotion and increases hippocampal NGF and BDNF levels in rats. *Peptides*, 28(7): 1447-1452, 2007.

KAZANTSEV, A. G. & THOMPSON, L. M. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(10): 854-868, 2008.

KIM, S.; HU, W. Q.; KELLY, D. R.; HELLMICH, M. R.; EVERS, B. M. & CHUNG, D. H. Gastrin-releasing peptide is a growth factor for human neuroblastomas. *Annals of Surgery*, 235(5): 621-629, 2002.

KOSHIBU, K.; GRAFF, J.; BEULLENS, M.; HEITZ, F. D.; BERCHTOLD, D.; RUSSIG, H.; FARINELLI, M.; BOLLEN, M. & MANSUY, I. M. Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *Journal of Neuroscience*, 29(41): 13079-13089, 2009.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4): 693-705, 2007.

LATTAL, K. M.; BARRETT, R. M. & WOOD, M. A. Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behavioral Neuroscience*, 121(5): 1125-1131, 2007.

- LEBACQ-VERHEYDEN, A. M.; KRYSTAL, G.; SARTOR, O.; WAY, J. & BATTEY, J. F. The rat Prepro gastrin releasing peptide gene is transcribed from two initiation sites in the brain. *Molecular Endocrinology*, 2(6): 556-63, 1988.
- LEVENSON, J. M.; O'RIORDAN, K. J.; BROWN, K. D.; TRINH, M. A.; MOLFESE, D. L. & SWEATT, J. D. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39): 40545-40559, 2004.
- LEVENSON, J. M. & SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2): 108-118, 2005.
- LUBIN, F. D. & SWEATT, J. D. The IkappaB kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. *Neuron*, 55(6): 942-957, 2007.
- LUFT, T.; FLORES, D. G.; VIANNA, M. R. M.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R. & IZQUIERDO, I. A role for hippocampal gastrin-releasing peptide receptors in extinction of aversive memory. *Neuroreport*, 17(9): 935-939, 2006.
- LUFT, T.; AMARAL, O. B.; SCHWARTSMANN, G. & ROESLER, R. Transient disruption of fear-related memory by post-retrieval inactivation of gastrin-releasing peptide or n-methyl-d-aspartate receptors in the hippocampus. *Current Neurovascular Research* 5(1): 21-27, 2008.
- MAHGOUB, M. & MONTEGGIA, L. M. A role for histone deacetylases in the cellular and behavioral mechanisms underlying learning and memory. *Learning & Memory*, 21(10): 564-568, 2014.
- MAJUMDAR, I. D. & WEBER, H. C. Biology of mammalian bombesin-like peptides and their receptors. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*, 18(1): 68-74, 2011.

MCDONALD, T. J.; JORNVALL, H.; NILSSON, G.; VAGNE, M.; GHATEI, M.; BLOOM, S. R. & MUTT, V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 90(1): 227-233, 1979.

MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153: 1351-1358, 1966.

MEDINA, J. H.; BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M. & IZQUIERDO, I. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural Brain Research*, 192(1): 61-69, 2008.

MERALI, Z.; KENT, P.; DU, L. S.; HRDINA, P.; PALKOVITS, M.; FALUDI, G.; POULTER, M. O.; BEDARD, T. & ANISMAN, H. Corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin B alterations in stress-relevant brain regions of suicides and control subjects. *Biological Psychiatry*, 59(7): 594-602, 2006.

MERALI, Z.; MOUNTNEY, C.; KENT, P. & ANISMAN, H. Effects of intracerebral ventricular administration of gastrin-releasing peptide and its receptor antagonist RC-3095 on learned fear responses in the rat. *Behavioural Brain Research*, 216(2): 519-524, 2011.

MINAMINO, N.; KANGAWA, K. & MATSUO, H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 114(2): 541-548, 1983.

MINAMINO, N.; KANGAWA, K. & MATSUO, H. Neuromedin C: a bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 119(1): 14-20, 1984.

MOODY, T. W. & MERALI, Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides*, 25(3): 511-520, 2004.

MYSKIW, J. C.; IZQUIERDO, I. & FURINI, C. R. G. Modulation of the extinction of fear learning. *Brain Research Bulletin*, 105: 61-69, 2014.

OLINCY, A.; LEONARD, S.; YOUNG, D. A.; SULLIVAN, B. & FREEDMAN, R. Decreased bombesin peptide response to cigarette smoking in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 20(1): 52-59, 1999.

PAVLOV, I. P. *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*, Oxford University Press, 1927.

PELEG, S.; SANANBENESI, F.; ZOVOILIS, A.; BURKHARDT, S.; BAHARI-JAVAN, S.; AGIS-BALBOA, R. C.; COTA, P.; WITTNAM, J. L.; GOGOL-DOERING, A.; OPITZ, L.; SALINAS-RIESTER, G.; DETTENHOFER, M.; KANG, H.; FARINELLI, L.; CHEN, W. & FISCHER, A. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science*, 328(5979): 753-756, 2010.

PENNEY, J. & TSAI, L. H. Histone deacetylases in memory and cognition. *Science Signaling*, 7(355): re12, 2014.

PRASAD, K. N. & SINHA, P. K. Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. *In Vitro*, 12(2): 125-32, 1976.

PREISLER, T.; LUFT, T.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; SCHWARTSMANN, G. & ROESLER, R. Basic fibroblast growth factor prevents the memory impairment induced by gastrin-releasing peptide receptor antagonism in area CA1 of the rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 32(8): 1381-1386, 2007.

QUIRK, G. J. & MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, 33(1): 56-72, 2008.

RADULOVIC, J. & TRONSON, N. C. Receptors in e(motion). *Nature Neuroscience*, 14(10): 1222-1224, 2011.

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*, 224(3): 796-801, 1996.

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*, 248(3): 664-668, 1998.

ROESLER, R.; MELLER, C. A.; KOPSCHINA, M. I.; SOUZA, D. O.; HENRIQUES, J. A. P. & SCHWARTSMANN, G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides*, 24(7): 1069-1074, 2003.

ROESLER, R.; KOPSCHINA, M. I.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; SOUZA, D. O. & SCHWARTSMANN, G. RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, 486(1): 35-41, 2004a.

ROESLER, R.; LESSA, D.; VENTURELLA, R.; VIANNA, M. R. M.; LUFT, T.; HENRIQUES, J. A. P.; IZQUIERDO, I. & SCHWARTSMANN, G. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, 19(4): 1041-1045, 2004b.

ROESLER, R.; LUFT, T.; OLIVEIRA, S. H. S.; FARIAS, C. B.; ALMEIDA, V. R.; QUEVEDO, J.; DAL PIZZOL, F.; SCHRODER, N.; IZQUIERDO, I. & SCHWARTSMANN, G. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 51(2): 350-357, 2006a.

ROESLER, R.; HENRIQUES, J. A. & SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurological Disorders Drug Targets*, 5(2): 197-204, 2006b.

ROESLER, R.; VALVASSORI, S. S.; CASTRO, A. A.; LUFT, T.; SCHWARTSMANN, G. & QUEVEDO, J. Phosphoinositide 3-kinase is required for bombesin-induced enhancement of fear memory consolidation in the hippocampus. *Peptides*, 30(6): 1192-1196, 2009.

ROESLER, R. & MCGAUGH, J. L. Memory Consolidation. In: Koob, G. F.; Le Moal, M. & Thompson, R. F. (eds.) *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*. Oxford: Academic Press, volume 2, p. 206-214, 2010.

ROESLER, R. & SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptors in the central nervous system: role in brain function and as a drug target. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 3, 159, 2012.

ROESLER, R.; KENT, P.; SCHRODER, N.; SCHWARTSMANN, G. & MERALI, Z. Bombesin receptor regulation of emotional memory. *Reviews in the Neurosciences*, 23(5-6): 571-586, 2012.

ROESLER, R.; KENT, P.; LUFT, T.; SCHWARTSMANN, G. & MERALI, Z. Gastrin-releasing peptide receptor signaling in the integration of stress and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112; 44-52, 2014a.

ROESLER, R.; REOLON, G. K.; MAURMANN, N.; SCHWARTSMANN, G.; SCHRODER, N.; AMARAL, O. B.; VALVASSORI, S. & QUEVEDO, J. A phosphodiesterase 4-controlled switch between memory extinction and strengthening in the hippocampus. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 91, 2014b.

SEIDITA, G.; MIRISOLA, M.; D'ANNA, R. P.; GALLO, A.; JENSEN, R. T.; MANTEY, S. A.; GONZALEZ, N.; FALCO, M.; ZINGALE, M.; ELIA, M.; CUCINA, L.; CHIAVETTA, V.; ROMANO, V. & CALI, F. Analysis of the gastrin-releasing peptide receptor gene in Italian patients with autism spectrum disorders. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics*, 147B(6): 807-813, 2008.

SPINDEL, E. R.; CHIN, W. W.; PRICE, J.; REES, L. H.; BESSER, G. M. & HABENER, J. F. Cloning and characterization of cdnas encoding human gastrin-releasing peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 81(18): 5699-5703, 1984.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, 99(2): 195-231, 1992.

STANGELBERGER, A.; SCHALLY, A. V.; VARGA, J. L.; ZARANDI, M.; CAI, R. Z.; BAKER, B.; HAMMANN, B. D.; ARMATIS, P. & KANASHIRO, C. A. Inhibition of human androgen-independent PC-3 and DU-145 prostate cancers by antagonists of bombesin and growth hormone releasing hormone is linked to PKC, MAPK and c-jun intracellular signalling. *European Journal of Cancer*, 41(17): 2735-2744, 2005.

SWEATT, J. D. *Mechanisms of Memory*. 2 ed., 2010.

TRONSON, N. C. & TAYLOR, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(4): 262-275, 2007.

VECSEY, C. G.; HAWK, J. D.; LATTAL, K. M.; STEIN, J. M.; FABIAN, S. A.; ATTNER, M. A.; CABRERA, S. M.; MCDONOUGH, C. B.; BRINDLE, P. K.; ABEL, T. & WOOD, M. A. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *The Journal of Neuroscience*, 27(23): 6128-6140, 2007.

VENTURELLA, R.; LESSA, D.; LUFT, T.; ROOZENDAAL, B.; SCHWARTSMANN, G. & ROESLER, R. Dexamethasone reverses the memory impairment induced by antagonism of hippocampal gastrin-releasing peptide receptors. *Peptides*, 26(5): 821-825, 2005.

WALTON, N. M.; DE KONING, A.; XIE, X. Y.; SHIN, R.; CHEN, Q.; MIYAKE, S.; TAJINDA, K.; GROSS, A. K.; KOGAN, J. H.; HEUSNER, C. L.; TAMURA, K. &

MATSUMOTO, M. Gastrin-releasing peptide contributes to the regulation of adult hippocampal neurogenesis and neuronal development. *Stem Cells*, 32(9): 2454-2466, 2014.

WEBER, H. C. Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*, 16(1): 66-71, 2009.

YOSHII, A. & CONSTANTINE-PATON, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Developmental Neurobiology*, 70(5): 304-322, 2010.

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Fernanda dos Santos Petry

Nome em citações bibliográficas: PETRY, F. S.; PETRY, FERNANDA DOS SANTOS; PETRY, F., PETRY, FERNANDA S.

Endereço profissional: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Laboratório de Câncer e Neurobiologia

Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar, Centro de Pesquisa Experimental

Santana – Porto Alegre

90035-903, RS – Brasil

Telefone profissional: (51) 3359 7616

E-mail: fernanda.petry@ufrgs.br

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2008 - 2012 Graduação em Biomedicina

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3. ESTÁGIOS

08/2009 - 04/2010 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Estágio voluntário realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática.

Projeto:

- “Estudos das ações dos hormônios da família das Stanniocalcinas sobre o ciclo celular e neuroproteção: uma abordagem através da bioinformática e da biologia molecular”.

Orientadora: Dra. Vanessa Schein

05/2010 - 12/2012 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Bolsista CNPq no Laboratório de Bioquímica e Biologia Celular de Lipídios.

Projetos:

- “Gangliosídeos como potencial parâmetro bioquímico em modelos de neurodegeneração e de neuroproteção”;
- “Expressão de gangliosídeos e de proteínas específicas em *rafts* lipídicos de células neurais obtidas a partir de um modelo *in vivo* da Doença de Alzheimer: parâmetros para o estudo de drogas neuroprotetoras”.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade

01/2012 - 12/2012 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Estágio em pesquisa na área de Bioquímica (700h) e trabalho de conclusão de curso realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Celular de Lipídios.

Título: “Toxicidade do peptídeo A β ₂₅₋₃₅ em linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y): padronização do modelo e avaliação da atividade neuroprotetora de isoflavonas da soja”.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade

07/2012 - 12/2012 Serviço de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Estágio curricular na área de Imagenologia (700h).

Responsável: Ilza Vasques de Moraes.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2012 Destaque do XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2011 Destaque do XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2011 Menção honrosa na apresentação de pôster da III Mostra da Bioquímica, Departamento de Bioquímica Prof. Tuiskon Dick, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. FIGUEIREDO, L. S.; DORNELLES, A. S.; **PETRY, F. S.**; FALAVIGNA, L.; DARGÉL, V. A.; KÖBE, L. M.; AGUZZOLI, C.; ROESLER, R.; SCHRÖDER, N. Two waves of proteasome-dependent protein degradation in the hippocampus are required for recognition memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 120: 1-6, 2015.

2. KREUTZ, F.; SCHERER, E. B.; FERREIRA, A. G. K.; **PETRY, F. S.**; PEREIRA, C. L.; SANTANA, F.; SOUZA WYSE, A. T.; SALBEGO, C. G.; TRINDADE, V. M. T. Alterations on Na⁺,K⁺ATPase and Acetylcholinesterase Activities Induced by Amyloid- β Peptide in Rat Brain and GM1 Ganglioside Neuroprotective Action. *Neurochemical Research*, 38: 2342-2350, 2013.

3. KREUTZ, F.; **PETRY, F. S.**; CAMASSOLA, M.; SCHEIN, V.; GUMA, F. C. R.; NARDI, N. B.; TRINDADE, V. M. T. Alterations of membrane lipids and in gene expression of ganglioside metabolism in different brain structures in a mouse model of mucopolysaccharidosis type I (MPS I). *Gene (Amsterdam)*, 527: 109-114, 2013.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. **PETRY, F. S.**; DORNELLES, A. S.; LICHTENFELS, M.; VALIATI, F. E.; ROESLER, R. Interactions between gastrin-releasing peptide receptor and histone acetylation in consolidation and extinction of emotional memory. In: World Congress on Brain, Behavior and Emotions, 2015, Porto Alegre.

2. LICHTENFELS, M.; DORNELLES, A. S.; **PETRY, F. S.**; BLANK, M.; FARIAS, C. B.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G. Memory impairment caused by tamoxifen is not associated with hippocampal BDNF levels in rats. In: World Congress on Brain, Behavior and Emotions, 2015, Porto Alegre.

3. **PETRY, F. S.**; TRINDADE, V. M. T. Padronização e comparação de técnicas de extração de *rafts* de membrana e avaliação da distribuição da proteína precursora

amilóide e da beta-secretase nos microdomínios lipídicos. In: XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2012, Porto Alegre.

4. KREUTZ, F.; CAMASSOLA, M.; **PETRY, F.**; CHAGASTELLES, P.; BREIER, A. C.; SCHEIN, V.; GUMA, F. C. R.; NARDI, N. B.; TRINDADE, V. M. T. Changes in the membrane lipid content/profile and gene expression of ganglioside metabolism enzymes in different brain structures of a murine model of mucopolysaccharidosis I (MPS I). In: XXIV Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2012, Porto Alegre.

5. **PETRY, F. S.**; KREUTZ, F.; CAMASSOLA, M.; BREIER, A. C.; CHAGASTELLES, P.; SCHEIN, V.; GUMA, F. C. R.; NARDI, N. B.; TRINDADE, V. M. T. Changes in the membrane lipid content/profile and gene expression of ganglioside metabolism enzymes in different brain structures of a murine model of mucopolysaccharidosis I (MPS I). In: 32ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre.

6. **PETRY, F. S.**; KREUTZ, F.; CAMASSOLA, M.; BREIER, A. C.; CHAGASTELLES, P.; SCHEIN, V.; GUMA, F. C. R.; NARDI, N. B.; TRINDADE, V. M. T. Alterações no conteúdo, no perfil e na expressão gênica de enzimas do metabolismo de gangliosídios de estruturas cerebrais de um modelo murino de mucopolissacaridose tipo I (MPS I). In: III Mostra da Bioquímica, 2011, Porto Alegre.

7. **PETRY, F. S.**; TRINDADE, V. M. T. Alterações no conteúdo, no perfil e na expressão gênica de enzimas do metabolismo de gangliosídios de estruturas cerebrais de um modelo murino de mucopolissacaridose tipo I (MPS I). In: XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2011, Porto Alegre.

8. **PETRY, F. S.**; KREUTZ, F.; FROZZA, R. L.; BREIER, A. C.; PETTENUZZO, L. F.; NETTO, C. A.; SALBEGO, C. G.; TRINDADE, V. M. T. Efeito do peptídeo beta-amilóide sobre a biossíntese de gangliosídios e avaliação da atividade neuroprotetora do GM1. In: II Mostra de Pesquisa do Departamento de Bioquímica Prof. Tuiskon Dick, 2010, Porto Alegre.

9. **PETRY, F. S.**; TRINDADE, V. M. T. Efeito do peptídeo beta-amilóide sobre a biossíntese de gangliosídeos e avaliação da atividade neuroprotetora do GM1. In: XXII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2010, Porto Alegre.