

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**PAPEL DAS HISTONAS DEACETILASES NA AMÍGDALA BASOLATERAL NA
MODULAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL**

FERNANDA ENDLER VALIATI

Orientador: Prof. Rafael Roesler

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**PAPEL DAS HISTONAS DEACETILASES NA AMÍGDALA BASOLATERAL NA
MODULAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL**

FERNANDA ENDLER VALIATI

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Endler Valiati, Fernanda

PAPEL DAS HISTONAS DEACETILASES NA AMÍGDALA
BASOLATERAL NA MODULAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL /
Fernanda Endler Valiati. -- 2015.

63 f.

Orientador: Rafael Roesler.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Epigenética. 2. Inibidor de histonas
deacetilases. 3. Amígdala. 4. Memória. 5. BDNF. I.
Roesler, Rafael, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BANCA EXAMINADORA

ELKE BROMBERG

FERNANDO BENETTI

GILBERTO SCHWARTSMANN

MARINO M. BIANCHIN

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, por me proporcionar uma educação de qualidade.

Aos meus pais, Lúcia Endler e Rolnei Valiati, e seus companheiros, Paulo Siqueira e Cátia Dorigoni, por terem sido fundamentais na construção do meu caráter, por toda amizade e carinho, pelo apoio e incentivo que me motiva a seguir e lutar pelos meus sonhos, pelo exemplo e valores que sigo todos os dias e acima de tudo, pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, Luciano, por entrar na minha vida e me ensinar que dividir e compartilhar é muito melhor do que estar sozinho e todo suporte emocional nos momentos em que mais precisei.

À toda minha família, que sempre esteve presente, tanto nos momentos bons como nos momentos difíceis.

Ao meu tio Antônio Marcus Endler (*in memoriam*), por ter sido a minha maior inspiração e um dos meus melhores exemplos de vida e de luta.

À minha amiga e irmã do coração, Luciana Minei, por todo carinho e amizade que perdurarão para sempre.

À todos os meus amigos e amigas, que me apoiaram nesta trajetória, que compartilharam comigo momentos inesquecíveis e pela amizade eterna que construímos.

Ao meu orientador, Rafael Roesler, pela oportunidade de ingresso no mestrado, que foi fundamental para o meu crescimento profissional e pessoal. Por sempre se mostrar disponível e pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa de excelência.

À todos os amigos do grupo de pesquisa e aos colegas do Laboratório de Câncer e Neurobiologia, em especial ao Mailton Vasconcelos, pela disposição em me ensinar, por me ajudarem na realização deste trabalho e pela amizade todos os dias.

Ao Hospital de Clínicas e a Unidade de Experimentação Animal por conceder o espaço e disponibilizar todo suporte para que este trabalho fosse realizado.

Aos demais amigos, colegas, funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela disposição em colaborar para o andamento das pesquisas e demais processos educacionais.

À Capes pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

Meu carinho e gratidão!

*“Opte por aquilo que faz o seu coração vibrar...
Apesar de todas as consequências.”*

(Osho)

RESUMO

Introdução: A formação da memória envolve mudanças na expressão de genes neuronais. Remodelações epigenéticas da cromatina e modificações pós-traducionais reversíveis no DNA ou nas proteínas histonas representam mecanismos centrais na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento do cérebro e a aprendizagem inicial ou recuperação da memória. Desequilíbrios nos níveis de acetilação de histonas estão associados à uma ampla variedade de desordens cerebrais. Histonas deacetilases (HDACs) desempenham um papel fundamental na homeostase da acetilação de histonas e na regulação de atividades celulares fundamentais como a transcrição, tornando-as um foco de estudo. Evidências mostram que a administração de inibidores de histonas deacetilases (HDACis) restauram a memória associada à regulação da expressão gênica e melhora a memória em ratos. Estudos em modelos animais têm mostrado que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas em várias áreas do sistema nervoso central, entre as quais se destacam o hipocampo e a amígdala basolateral (BLA). Neste contexto, fármacos experimentais, como a tricostatina A (TSA), que atuam sobre mecanismos epigenéticos, têm sido recentemente propostos como potenciais terapias para o tratamento de disfunção cognitiva e memória associados a doenças neurológicas e psiquiátricas. **Objetivo:** Neste trabalho objetivamos compreender e elucidar o papel da acetilação de histonas em processos envolvidos na modulação da memória utilizando o fármaco TSA e se baseia na hipótese de que a atividade de HDACs é essencial para a modulação das respostas de aprendizado na tarefa de esQUIVA inibitória (IA). **Métodos:** Ratos *Wistar* foram canulados bilateralmente na amígdala. Os efeitos das micro-infusões intra-amigdalares de TSA foram observados na consolidação e na extinção da memória após o treino na tarefa de esQUIVA inibitória e nos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na BLA e no hipocampo referentes à consolidação

da memória. **Resultados:** Os resultados demonstraram que a infusão intra-amigdalar de TSA 1.5 h, 3 h e 6 h após o treino na tarefa de esquivas inibitória resulta na melhora da memória de longa duração (LTM). TSA acelerou a extinção da memória quando infundido imediatamente pós-teste. Além disso, aumentou os níveis de BDNF no hipocampo. **Conclusão:** Estes resultados indicam que eventos epigenéticos possuem um papel importante no aprendizado e na memória através da atividade de HDACs.

PALAVRAS-CHAVE

Epigenética; histonas deacetilases; amígdala; TSA; memória; BDNF

ABSTRACT

Introduction: Memory formation involves changes in the expression of neuronal genes. Epigenetic remodeling of chromatin and reversible post-translational modifications in the DNA or in the histone proteins represent central mechanisms in the regulation of gene expression during brain development and early learning or memory retrieval. Imbalances in the levels of histone acetylation are associated with a wide variety of brain disorders. Histone deacetylases (HDACs) play a key role in homeostasis of histone acetylation and regulation of fundamental cellular activities, such as transcription, making them a focus of study. Evidence shows that the administration of histone deacetylase inhibitors (HDACis) restores the memory associated with the regulation of gene expression and improves memory in rats. Studies in animal models have shown that memory formation involves a series of biochemical changes in several areas of the central nervous system, which the hippocampus and basolateral amygdala (BLA) are the most highlighted. In this context, experimental drugs, such as trichostatin A (TSA), that act on epigenetic mechanisms, have recently been proposed as potential therapies for the treatment of memory and cognitive dysfunction associated with psychiatric and neurological disorders. **Objective:** In this work we aimed to understand and elucidate the role of histone acetylation in processes involved in memory modulation using the drug TSA and is based on the hypothesis that HDACs activity is essential for the modulation of learning answers in the inhibitory avoidance (IA) task. **Methods:** *Wistar* rats were cannulated bilaterally in the amygdala. The effects of TSA micro-infusions into the BLA were observed in the consolidation and extinction of memory after training in the inhibitory avoidance task and the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the BLA and hippocampus related to memory consolidation. **Results:** The results demonstrated that the TSA infusion into BLA 1.5 h, 3 h and 6 h posttraining in the inhibitory avoidance task results

in improved long-term memory (LTM). TSA accelerated the extinction of memory when infused immediately post-test. In addition, increased levels of BDNF in the hippocampus.

Conclusion: These results indicate that epigenetic events play an important role in learning and memory by HDAC activity.

KEYWORDS

Epigenetics; histones deacetylases; amygdala; TSA; memory; BDNF

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Níveis de acetilação de histonas catalisadas pela atuação de histonas acetiltransferases (HATs) e de histonas deacetilases (HDACs).....	20
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratégias de busca de referências bibliográficas para revisão da literatura das bases que fundamentam o objetivo deste estudo.....	18
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

- BLA – Amígdala basolateral (*basolateral amygdala*)
- BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*)
- cAMP – Monofosfato de adenosine cídica (*cyclic adenylyl monophosphate*)
- CBP – Proteína ligante de CREB (*CREB-binding protein*)
- CREB – Proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP (*cAMP response element-binding protein*)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- EGTA – Ethyleneglycoltetraacetic acid
- H – Histona (*histone*)
- HAT – Histonas acetiltransferases (*histone acetyltransferase*)
- HDAC – Histona deacetilase (*histone deacetylase*)
- HDACi – Inibidor de histona deacetilase (*histone deacetylase inhibitor*)
- IA – Esquiva inibitória (*inhibitory avoidance*)
- i.p. – Intraperitoneal
- LTM – Memória de longa duração (*long-term memory*)
- LTP – Potenciação de longa duração (*long-term potentiation*)
- mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (*messenger ribonucleic acid*)
- NaB – Butirato de sódio (*sodium butyrate*)
- NGFI-B – *Nerve growth factor inducible-B*
- Nor-1 – *Neuron-derived orphan receptor-1*
- PBS – *Phosphate-buffered solution*
- PKA – Proteína cinase A (*protein kinase A*)
- PMSF – *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
- SAHA – Ácido hidroxâmico suberoilânido (*suberoylanilide hydroxamic acid*)

SNC – Sistema nervoso central

TMB – *Tetramethylbenzidine*

TSA – Tricostatina A (*trichostatin A*)

VEH – Veículo (*vehicle*)

INDICE

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES.....	18
2.2 CROMATINA E MECANISMOS EPIGENÉTICOS	19
2.3 HISTONAS DEACETILASES	20
2.4 INIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASES	21
2.5 BDNF	23
2.6 MEMÓRIA.....	24
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVOS PRIMÁRIOS	27
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	27
5. REFERÊNCIAS	28
6. ARTIGO	32
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	63

1. INTRODUÇÃO

Em termos psicológicos, a memória descreve os processos que são utilizados pelo cérebro para o armazenamento a longo prazo das informações (Levenson & Sweatt 2005). Do ponto de vista genético é sabido que a transcrição e a tradução são importantes para a formação da memória a longo prazo (Flood et al., 1975). Atualmente, estudos mostraram que essa formação é um processo complexo que envolve muitas vias de sinalização e regulação de vários genes (Roberson & Sweatt, 1999). Descobertas sobre mecanismos moleculares de diferenciação e desenvolvimento celular têm sido vinculadas a definição de uma nova subdisciplina da genética conhecida como epigenética (Levenson & Sweatt 2005).

A epigenética refere-se a um conjunto de modificações pós-traducionais de DNA e de proteínas, que produzem alterações duradouras na estrutura da cromatina como consequência direta, e alterações duradouras nos padrões de expressão gênica como uma consequência indireta, sendo ambas influenciadas pelo ambiente. A área da epigenética vem conduzindo a novas descobertas, onde os neurocientistas começaram a investigar os possíveis papéis dos mecanismos epigenéticos no comportamento, na fisiologia e na neuropatologia (Levenson & Sweatt 2005). Surpreendentemente, dados relevantes nessa área mostram que a remodelação epigenética da cromatina e modificações do DNA representam mecanismos centrais para a regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento do cérebro e na formação da memória, além de apresentarem um importante papel na plasticidade sináptica e cognição (Abel & Zukin 2009).

Descobertas recentes mostram que modificações epigenéticas estão intimamente ligadas à etiologia de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. Uma matriz de modificações pós-traducionais das histonas servem como marcas epigenéticas e incluem acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação e sumoilação (Jenuwein & Allis 2001).

Desregulações presentes nessas marcas estão relacionadas à distúrbios de plasticidade sináptica e de cognição, incluindo doenças neurodegenerativas como Huntington, Parkinson, Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica e Isquemia; à transtornos do humor como depressão e ansiedade; e à desordens do desenvolvimento neurológico como Síndrome de Rubinstein-Taybi, Síndrome de Rett e Síndrome do X Frágil (Chuang et al. 2009; Abel & Zukin 2009).

A remodelação epigenética é fundamental para a diferenciação celular, o desenvolvimento e o comportamento, incluindo a aprendizagem e a memória (Kouzarides 2007; Wood et al. 2006). O epigenoma é responsável pela atividade sináptica e fornece uma ligação entre a experiência, a predisposição genética e as alterações na função neural (Abel & Zukin 2009). Com isso, grandes pesquisadores começaram a reconhecer a importância dos mecanismos epigenéticos nas funções neurológicas e nos distúrbios cerebrais, passando a estudar os mecanismos moleculares subjacentes à atividade de remodelação do epigenoma e sua influência em condições fisiológicas normais e patológicas (Mikaelsson & Miller 2011).

Nesse contexto, fármacos experimentais que atuam sobre mecanismos epigenéticos, têm sido recentemente propostos como potenciais terapias para o tratamento de disfunção cognitiva e memória associados a doenças neurológicas e psiquiátricas (Mikaelsson & Miller 2011). Para isso, o uso de modelos animais de função cognitiva é útil não só para a compreensão do modo como o cérebro armazena informações, mas também para a identificação de novas estratégias terapêuticas (Bugalho et al. 2006).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura teve por objetivo reunir informações relacionadas à epigenética, HDACs, o fármaco inibidor de histonas deacetilases TSA e a sua relação com a memória e suas possíveis interações na BLA. As estratégias de busca envolveram as seguintes bases de dados: biblioteca da UFRGS e PubMed, com buscas pelos termos “epigenetic”, “chromatin”, “memory”, “histone deacetylase inhibitors”, “basolateral amygdala”, “hippocampus” and “BDNF”.

Tabela 1. Estratégias de busca de referências bibliográficas para revisão da literatura das bases que fundamentam o objetivo deste estudo.

Termos	Resultados da pesquisa PubMed	Artigos utilizados
“Epigenetic”	43844	4
“Epigenetic” and “Memory”	1446	3
“Epigenetic” and “Memory” and “Basolateral amygdala”	27	2
“Memory” and “Basolateral amygdala”	862	10
“Memory” and “Hippocampus”	26088	8
“Memory” and “BDNF”	1861	1
“Memory” and “Histone deacetylase”	395	6
“Memory” and “Chromatin”	991	3
“Memory” and “Basolateral amygdala” and “Hippocampus”	2322	3
“Memory”	228296	10
“Basolateral amygdala” and “Hippocampus”	917	2
“Histone deacetylase inhibitors”	12316	8
“Histone deacetylase inhibitors” and “Basolateral amygdala” and/or “Hippocampus”	178	2
“BDNF”	16424	1
“BDNF” and “Histone deacetylase”	181	2

2.2 CROMATINA E MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Grande parte da pesquisa epigenética está convergindo para o estudo de modificações covalentes e não covalentes de DNA e a acetilação ou a desacetilação de proteínas histonas e os mecanismos pelos quais essas modificações influenciam na estrutura geral da cromatina (Goldberg et al. 2007). O estado da cromatina, e conseqüentemente o acesso ao código genético é, principalmente, regulado por modificações pós-traducionais reversíveis no DNA ou nas proteínas histonas que levam a uma estrutura de empacotamento da cromatina, podendo esta ficar mais aberta ou fechada, influenciando no reconhecimento das marcas por fatores de transcrição e complexos protéicos (Schneider et al. 2011). Estudos mostram que esses fatores epigenéticos influenciam no acesso da cromatina à maquinaria transcricional e desempenham um papel crucial na ativação dos genes controlando a expressão gênica (Abel & Zukin 2009; Mikaelsson & Miller 2011).

As modificações de histonas regulam a expressão gênica através de três mecanismos. O primeiro regula a estrutura da cromatina, fazendo o loci gênico ficar mais ou menos acessível a maquinaria transcricional; o segundo desempenha papel de sinalização por integrar respostas a múltiplas cascatas bioquímicas e recrutar ou repelir a maquinaria transcricional e complexos de remodelação da cromatina; e o terceiro seriam as mudanças epigenéticas na expressão gênica mediadas pelas modificações das histonas que causam alterações na função neural e no comportamento por longos períodos de tempo em resposta a experiência transitória ou insulto neural (Kouzarides 2007; Berger 2007; Jenuwein & Allis 2001). Este último acarretou em múltiplos estudos que visam investigar e compreender o envolvimento de mecanismos epigenéticos na aprendizagem e na memória (Mikaelsson & Miller 2011). A arquitetura da cromatina e os processos a ela associados sofrem alterações em decorrência da interação entre histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas deacetilases (HDACs) que alteram os níveis de acetilação de histonas (Figura 1).

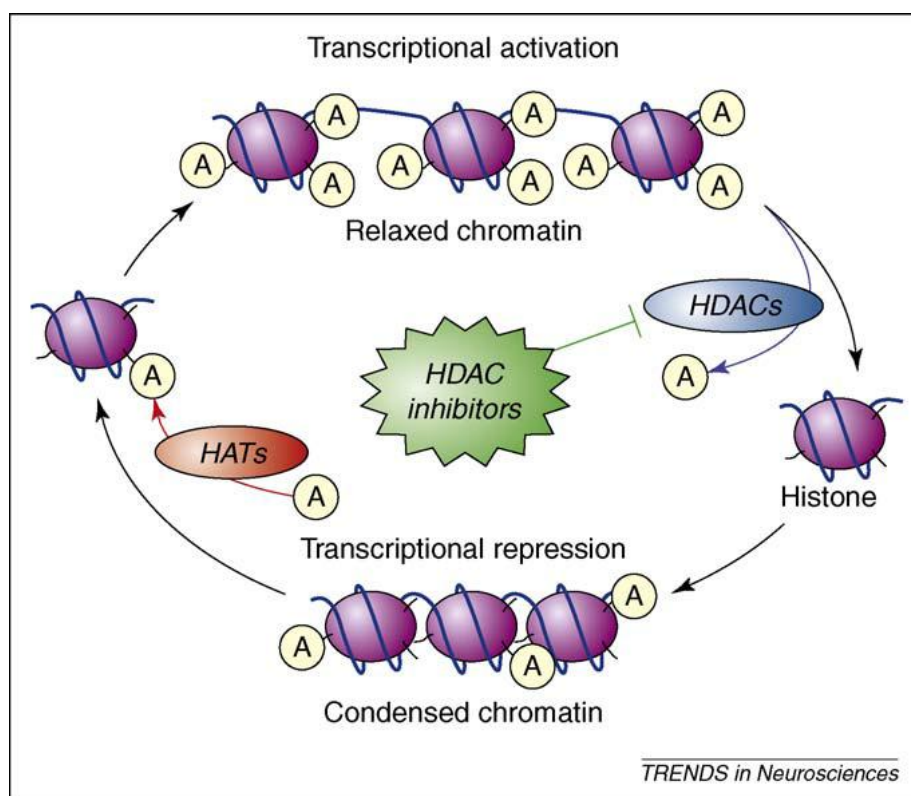


Figura 1. Níveis de acetilação de histonas catalisadas pela atuação de histonas acetiltransferases (HATs) e de histonas deacetilases (HDACs). A inibição de HDACs resulta em um aumento dos níveis de acetilação das histonas e confere uma conformação da cromatina mais relaxada que favorece a ativação transcricional. Quando HDACs estão ativas, a cromatina se apresenta mais condensada resultando em uma repressão da transcrição.

Fonte: *Chuang et al., 2009, p. 592.*

2.3 HISTONAS DEACETILASES

Uma ampla variedade de desordens cerebrais estão associadas a desequilíbrios nos níveis de acetilação de proteínas e disfunções transcricionais. As HDACs desempenham um papel fundamental na homeostase da acetilação de histonas e outras proteínas, bem como na regulação de atividades celulares fundamentais como a transcrição (Chuang et al. 2009). As HDACs removem grupos acetila a partir de resíduos de lisina/arginina da cauda amino-terminal do núcleo de histonas e outras proteínas, revertendo assim os efeitos das HAT, que atuam na acetilação das histonas. Em geral, o aumento da acetilação proteica na cauda das

histonas resulta em uma conformação de cromatina mais aberta e relaxada, facilitando a interação com fatores de transcrição com promotores gene específicos e, assim, ativando a expressão gênica. HDACs, normalmente, induzem a compactação da cromatina por meio da desacetilação das histonas e funcionam como um componente repressor do complexo transcricional através do silenciamento da expressão gênica (Kouzarides 2007; Lee & Workman 2007; Berger 2007). Desequilíbrio entre a atividade das HATs e HDACs pode conduzir a manifestação de doenças (Chuang et al. 2009).

Em humanos, as HDACs podem ser divididas em quatro principais classes, sendo que as classes I e II tem sido mais investigadas por seu papel no sistema nervoso central (Carey & La Thangue 2006). A primeira demonstração do envolvimento epigenético na formação de memórias ocorreu em 2004 onde a acetilação da histona H3 apresentou-se significativamente aumentada após o aprendizado (Levenson et al. 2004). Estes dados indicam que há marcação epigenética do genoma durante a consolidação da memória sugerindo a ocorrência de um código de modificações de histonas para a formação da memória, onde tipos específicos de memórias estão associados com padrões específicos de modificação de histonas (Levenson & Sweatt 2005). Ao contrário das HATs, HDACs possuem uma diversidade estrutural e funcional, tornando-as um foco de estudo por estarem envolvidas em diversos processos patológicos e, conseqüentemente, serem alvos terapêuticos promissores (Abel & Zukin 2009).

2.4 INIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASES

Estudos mostram que os inibidores de histonas deacetilases (HDACis) podem melhorar os déficits na plasticidade sináptica, na cognição, no comportamento, na memória, na aprendizagem e no estresse relacionados a uma ampla gama de distúrbios neurológicos e psiquiátricos (Abel & Zukin 2009). Desenvolvimentos recentes na utilização destes inibidores para combater doenças neurodegenerativas em modelos celulares e em modelo animal

demonstraram que eles tem propriedades neuroprotetoras, neurotróficas e anti-inflamatórias (Chuang et al. 2009).

Nos últimos anos houve o desenvolvimento de novos HDACis, tanto derivados sintéticos quanto oriundos de recursos naturais. Esses inibidores podem ser classificados em quatro principais famílias químicas: (I) os ácidos graxos de cadeia curta como o butirato de sódio (NaB), o ácido valpróico e o fenilbutirato; (II) os ácidos hidroxâmicos como a tricostatina A (TSA) e o ácido hidroxâmico suberoilânida (SAHA); (III) as epóxi cetonas como a trapoxina; e (IV) as benzamidas. Destes, os mais amplamente estudados são o NaB, o fenilbutirato, o SAHA e a TSA. Sabe-se que os butiratos apresentam como vantagem conseguir atravessar a barreira hematoencefálica e, por isso, são um bom alvo terapêutico (Carey & La Thangue 2006).

Estudos relatam que inibidores das classes I e II se apresentam como novas abordagens terapêuticas para tratar de distúrbios neurodegenerativos, depressão e ansiedade, além de outros déficits cognitivos que acompanham muitas desordens envolvidas no sistema nervoso (Carey & La Thangue 2006; Abel & Zukin 2009). Pesquisas mostraram que a administração sistêmica ou intra-cerebral de HDACis, como o NaB, a TSA e o ácido valpróico, em ratos e em camundongos aumentou o aprendizado em diversas tarefas e recuperou a amnésia experimental. A utilização destes inibidores permite que a acetilação permaneça por um tempo mais longo (Bredy & Barad 2008; Fischer et al. 2007; Korzus et al. 2004; Levenson et al. 2004; Stefanko et al. 2009; Vecsey et al. 2007). A administração sistêmica de NaB melhorou a memória de condicionamento contextual aversivo e a infusão de TSA na amígdala melhorou a memória aversiva (Levenson et al. 2004; Yeh et al. 2004).

Nesse sentido, HDACis que agem em todo o cérebro podem ser úteis na melhoria dos déficits neurocomportamentais. Evidências recentes revelam que esses HDACis têm efeitos específicos sobre a expressão gênica, aumentando a expressão de um conjunto selecionado de

genes-alvo e reduzindo a expressão de outros (Vecsey et al. 2007; Fass et al. 2003). Estes efeitos específicos no gene podem ser regulados por fatores de transcrição que reconhecem um promotor específico e conferem especificidade do gene alvo e, assim, a sensibilidade à inibição de HDAC (Vecsey et al. 2007). Desse modo, os HDACis podem inverter seletivamente a expressão de apenas o subconjunto de genes cuja expressão está alterada em um determinado distúrbio (Abel & Zukin 2009).

HDACis representam, portanto, um caminho promissor para a intervenção terapêutica para múltiplos problemas cognitivos associados à neurodegeneração, estresse crônico e distúrbios do desenvolvimento neurológico e psiquiátrico (Abel & Zukin 2009). Há indícios de que o tratamento combinado de um HDACi com outro fármaco neuroprotetor pode ter efeito aditivo ou sinérgico e, por isso, as abordagens combinatórias devem ser prosseguidas (Chuang et al. 2009). Estes agentes são potenciais medicamentos que serão destinados a modelar as modificações epigenéticas na tentativa de reverter distúrbios cerebrais que, anteriormente, se pensavam ser irreversíveis (Abel & Zukin 2009).

2.5 BDNF

Estudos do envelhecimento indicam uma associação entre os níveis séricos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), volume hipocampal e funções cognitivas. O BDNF é crucial para a manutenção da memória de longa duração. O papel do BDNF no condicionamento do medo está bem definido e na amígdala do rato há um aumento dos níveis de BDNF e da transcrição gênica. A inibição de HDAC aumenta a expressão de genes envolvidos na formação da memória e é um alvo potencial que induz aprendizagem por regulação epigenética. É sabido que o TSA aumenta os níveis de BDNF em astrócitos de um modo tempo dependente (BAMBAH-MUKKU et al., 2014; BREDY et al., 2007; WU et al., 2008).

2.6 MEMÓRIA

Uma questão ainda não totalmente compreendida no estudo neurobiológico da memória é a caracterização das condições que levam à perda de memória já estabelecidas (Lattal & Wood 2013). Evidências indicam que a modificação da cromatina é um mecanismo epigenético chave na regulação da transcrição de genes durante a estabilização de memórias de longo prazo e alterações na acetilação de histonas tem sido associadas com déficits de memória em modelos de doenças neurológicas (Silva et al. 2012; Reolon et al. 2011). Outros estudos mostram que manipulações comportamentais e farmacológicas durante o tempo de recuperação da memória podem resultar em uma perda permanente de comportamentos aprendidos anteriormente (Lattal & Wood 2013).

A formação da memória envolve mudanças na expressão de genes neuronais. Traços novos de memória se tornam estáveis durante um processo conhecido como consolidação, sendo a expressão gênica fundamental para a formação da memória de longo prazo, o que requer a síntese de uma série de proteínas e de mRNAs (Pedroso et al. 2013; Jobim et al. 2012). Sabe-se que mecanismos epigenéticos durante a aprendizagem inicial ou recuperação da memória podem levar a memória persistente. Processos envolvidos na recuperação da memória induzem a plasticidade celular, onde um traço de memória anteriormente consolidado pode sofrer uma nova fase de estabilização proteína dependente e resultar em uma reconsolidação da memória original ou levar a extinção, onde um novo aprendizado durante um teste de recuperação cria uma memória adicional que reflete as mudanças das condições ambientais (Lattal & Wood 2013).

Extinção e reconsolidação são processos complexos que consistem da interação entre mecanismos moleculares, celulares e sistêmicos. O que a epigenética coloca em pauta, na tentativa de distinguir esses processos, é o fato de que distintos eventos moleculares levam a alterações moleculares persistentes (Quirk et al. 2010; Torregrossa & Taylor 2013). Estas

características tem definido se a manipulação dada altera para extinção (quando a persistência não ocorre) ou para reconsolidação (quando ocorre a persistência) (Lattal & Wood 2013). Estes dois processos são frequentemente tratados como exclusivos entre si, com manipulações sendo pensadas para afetar somente um ou o outro, dependendo das condições de comportamento (por exemplo, a duração da recuperação) e de como moléculas de sinalização são afetados pela manipulação. Porém, a peça-chave da evidência comportamental usada para distinguir esses mecanismos é a constatação de que a perda de um comportamento induzido por extinção é muitas vezes temporária, revertendo com tempo, com mudanças no contexto ou com tratamentos (Maren 2011).

Nesse sentido, estudos em modelos animais têm mostrado que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas em várias áreas do sistema nervoso central (SNC), entre as quais se destaca o hipocampo e a amígdala basolateral (BLA). Atualmente, sabe-se que a estimulação da BLA aumenta a ativação cortical e, em alguns estudos, há evidências que a BLA possui outras funções corticais, como o aumento de plasticidade sináptica na região cortical (Dringenberg & Vanderwolf, 1996; Hans C Dringenberg, Kuo, & Tomaszek, 2004). No entanto, o meio pelo qual a BLA modula a memória e as estruturas alvo, como o córtex e o hipocampo, é desconhecido (Weinberger 2004).

Tendo roedores como os animais de escolha para estudos comportamentais e testes cognitivos por mais de um século, algumas tarefas comportamentais tornaram-se clássicas nos estudos dos distintos tipos de memória (McGaugh & Izquierdo 2000). Dentre estas, a esQUIVA INIBITÓRIA (IA) tem sido a mais utilizada e considerada aquela que oferece maiores vantagens para estudos de memórias de variadas durações (Izquierdo et al. 1999). A recuperação da memória por IA, um paradigma de medo condicionado em que roedores aprendem a evitar uma área dentro de uma câmara de formação previamente associada a um choque nas patas, pode levar a uma reconsolidação ou a uma extinção da memória. No caso da extinção, a

resposta ao medo declina com uma exposição repetida à câmara, na ausência da apresentação de choques nas patas. Por outro lado, quando a IA leva a reconsolidação, a reativação da memória do medo torna-se sensível ao rompimento por inibição da síntese de proteína (Pedroso et al. 2013).

Os fatores que controlam a transição entre reconsolidação e extinção quando a memória é reativada incluem a intensidade do treinamento, a duração da sessão de recuperação, e se a memória é recente ou mais antiga (Inda, Muravieva, & Alberini, 2011; Lee, Milton, & Everitt, 2006). Além disso, em IA e outros tipos de medo condicionado, reativação e reconsolidação podem estar associados com o fortalecimento do traço de memória (Inda et al. 2011; Lee & Workman 2007; Roesler & Quevedo 2009).

Nesse contexto, evidências mostram que a administração de HDACi restauram a memória associada a regulação da expressão gênica e melhora a memória em ratos idosos. Estudos demonstraram que o NaB é um HDACi que melhora a formação e extinção da memória quando administrado sistemicamente antes do treino em ratos e em camundongos, e melhora os défices de memória em modelos de doenças neurodegenerativas e de lesão cerebral aguda (Lattal et al. 2007; Levenson et al. 2004; Dash et al. 2009). Outros resultados foram demonstrados em neurônios corticais onde o tratamento com TSA e NaB mostrou efeitos de neuroproteção, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* de desordens cerebrais (Chuang et al. 2009; Lee et al. 2003). A utilização destes inibidores permite a acetilação mais duradoura. A administração sistêmica de NaB melhora a memória de condicionamento contextual aversivo e a infusão de TSA na amígdala melhora a memória aversiva (Levenson et al. 2004; Yeh et al. 2004). Portanto, visto e analisando estes estudos, as drogas têm como alvo os mecanismos epigenéticos, representando terapias viáveis para o tratamento de diversas doenças que afetam a cognição.

3. JUSTIFICATIVA

Remodelações epigenéticas da cromatina e modificações do DNA representam mecanismos centrais na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento do cérebro e na formação da memória. Estudos mostram que modificações epigenéticas estão envolvidas em desordens de plasticidade sináptica e cognição apresentadas em múltiplas patologias já conhecidas (Abel & Zukin 2009). Dessa forma, é importante a compreensão do papel dessas modificações na modulação da memória para melhor elucidar como esses mecanismos moleculares atuam em processos como a consolidação e extinção da memória, através de métodos de estudo como, por exemplo, o da tarefa de esQUIVA inibitória.

Evidências mostram que inibidores de histonas deacetilases podem melhorar déficits na plasticidade sináptica, cognição e estresse relacionados a uma série de doenças neurológicas e psiquiátricas (Chuang et al. 2009). Portanto, o estudo com a utilização destes inibidores pode auxiliar para o desenvolvimento de terapias para os transtornos cognitivos associados à memória, bem como a diversas patologias associadas a ela.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Compreender e elucidar o papel das modificações epigenéticas em processos envolvidos na modulação da memória como a consolidação e a extinção por meio da tarefa de esquiva inibitória utilizando terapias experimentais como fármacos inibidores de histonas deacetilases.

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Investigar o efeito da micro-infusão intra-amigdalar de tricostatina A sobre a consolidação da memória na tarefa de esquiva inibitória imediatamente, 1.5h, 3h e 6h após o treino.

Investigar o efeito da micro-infusão intra-amigdalar de tricostatina A sobre a extinção da memória na tarefa de esquiva inibitória imediatamente pós-teste.

Avaliar os efeitos da administração intra-amigdalar de tricostatina A sobre os níveis de BDNF na amígdala de ratos treinados em esquiva inibitória.

Avaliar os efeitos da administração intra-amigdalar de tricostatina A sobre os níveis de BDNF no hipocampo de ratos treinados em esquiva inibitória.

5. REFERÊNCIAS

- Abel, T. & Zukin, R.S., 2009. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol*, v. 8(1), p.57–64.
- Bambah-mukku, D. et al., 2014. A positive autoregulatory BDNF feedback loop via C/EBP β mediates hippocampal memory consolidation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 34, n. 37, p. 12547–59.
- Berger, S.L., 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, v. 447(7143), p.407–12.
- Bredy, T. W. et al., 2007. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.), v. 14, p. 268–276.
- Bredy, T.W. & Barad, M., 2008. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.), 15(1), p.39–45.
- Bugalho, P., Correa, B. & Viana-baptista, M., 2006. Papel do cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais: Bases científicas e modelos de estudo. *Acta Med Port*, v. 19, p. 257-268.
- Carey, N. & La Thangue, N.B., 2006. Histone deacetylase inhibitors: gathering pace. *Current opinion in pharmacology*, v. 6(4), p. 369–75.
- Chuang, D.-M. et al., 2009. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends in neurosciences*, v. 32(11), p. 591–601.
- Dash, P.K., Orsi, S. a & Moore, a N., 2009. Histone deactylase inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. *Neuroscience*, v. 163(1), p.1–8.
- Dringenberg, H.C., Kuo, M.-C. & Tomaszek, S., 2004. Stabilization of thalamo-cortical long-term potentiation by the amygdala: cholinergic and transcription-dependent mechanisms. *The European journal of neuroscience*, v. 20(2), p .557–65.
- Dringenberg, H.C. & Vanderwolf, C.H., 1996. Cholinergic activation of the electrocorticogram: an amygdaloid activating system. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale*, v. 108(2), p. 285–96.

- Fass, D.M., Butler, J.E.F. & Goodman, R.H., 2003. Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes. *The Journal of biological chemistry*, v. 278(44), p. 43014–9.
- Fischer, A. et al., 2007. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, v. 447(7141), p. 178–82.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D. & Bernstein, E., 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, v. 128(4), p. 635–8.
- Inda, M.C., Muravieva, E. V & Alberini, C.M., 2011. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 31(5), p. 1635–43.
- Izquierdo, I. et al., 1999. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural brain research*, v. 103(1), p. 1–11.
- Jenuwein, T. & Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, v. 293(5532), p. 1074–80.
- Jobim, P.F.C. et al., 2012. Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of learning and memory*, v. 97(1), p. 105–12.
- Korzus, E., Rosenfeld, M.G. & Mayford, M., 2004. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*, v. 42(6), p. 961–72.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, v. 128(4), p.693–705.
- Lattal & Wood, M.A.& K.M., 2013. Epigenetics and persistent memory: implications for reconsolidation and silent extinction beyond the zero. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 16(2), p. 124–129.
- Lattal, K.M., Barrett, R.M. & Wood, M. a, 2007. Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behavioral neuroscience*, v. 121(5), p. 1125–31.
- Lee, J. et al., 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, v. 304, p. 8839-843.

- Lee, J.L.C., Milton, A.L. & Everitt, B.J., 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 26(39), p. 10051–6.
- Lee, K.K. & Workman, J.L., 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 8(4), p. 284–95.
- Levenson, J.M. et al., 2004. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry*, v. 279(39), p. 40545–59.
- Levenson, J.M. & Sweatt, J.D., 2005. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 6(2), p.108–18.
- Maren, S., 2011. Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron*, v. 70(5), p. 830–45.
- McGaugh, J.L. & Izquierdo, I., 2000. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends in pharmacological sciences*, v. 21(6), p. 208–10.
- Mikaelsson, M. a & Miller, C. a, 2011. The path to epigenetic treatment of memory disorders. *Neurobiology of learning and memory*, v. 96(1), p. 13–8.
- Pedroso, T.R. et al., 2013. Inhibition of protein synthesis or mTOR in the basolateral amygdala blocks retrieval-induced memory strengthening. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, v. 120(11), p. 1525–31.
- Quirk, G.J. et al., 2010. Erasing fear memories with extinction training. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 30(45), p. 14993–7.
- Reolon, G.K. et al., 2011. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behavioural brain research*, v. 221(1), p. 329–32.
- Roberson, E.D. & Sweatt, J.D., 1999. A Biochemical Blueprint for Long-Term Memory. *Learning and memory*, v. 6, p.381–388.
- Roesler, R. & Quevedo, J., 2009. Retrieval mediated by hippocampal extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase is required for memory strengthening. *Neuroscience*, v. 160(4), p. 711–5.
- Schneider, T.D. et al., 2011. Stage-specific histone modification profiles reveal global transitions in the *Xenopus* embryonic epigenome. *PloS one*, v. 6(7), p. 22548.

- Silva, P.F. Da et al., 2012. Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. *Neuroscience*, v. 200, p.42–9.
- Stefanko, D.P. et al., 2009. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106(23), p. 9447–52.
- Torregrossa, M.M. & Taylor, J.R., 2013. Learning to forget: manipulating extinction and reconsolidation processes to treat addiction. *Psychopharmacology*, v. 226(4), p. 659–72.
- Vecsey, C.G. et al., 2007. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 27(23), p. 6128–40.
- Weinberger, N.M., 2004. Specific long-term memory traces in primary auditory cortex. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 5(4), p. 279–90.
- Wood, M. a, Hawk, J.D. & Abel, T., 2006. Combinatorial chromatin modifications and memory storage: a code for memory?. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, v. 13(3), p. 241–4.
- Yeh, S.-H., Lin, C.-H. & Gean, P.-W., 2004. Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory. *Molecular pharmacology*, v. 65(5), p. 1286–92.
- WU, X. et al. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 11, n. 11, p. 1123–1134, 2008.

6. ARTIGO

Administration of a histone deacetylase inhibitor into the basolateral amygdala enhances memory consolidation and extinction and increases hippocampal BDNF levels

Autores: Fernanda Endler Valiati, Mailton Vasconcelos, Martina Lichtenfels, Fernanda dos Santos Petry, Caroline Brunetto de Farias, Rafael Roesler.

Periódico: Neuroscience.

Status: Manuscrito em preparação

Administration of a histone deacetylase inhibitor into the basolateral amygdala enhances memory consolidation and extinction and increases hippocampal BDNF levels

Fernanda Endler Valiati^{a,b}, Mailton Vasconcelos^d, Martina Lichtenfels^{a,b}, Fernanda dos Santos Petry^{a,b}, Caroline Brunetto de Farias^{a,c}, Rafael Roesler^{a,b,*}

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

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

c Children's Cancer Institute, 90420-140 Porto Alegre, RS, Brazil

d Department of Psychology, Faculty of Psychology, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

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

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

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers CNPq; grant numbers 484185/2012-8 and 303276/2013-4 to R.R.); Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); the HCPA institutional research fund (FIPE/HCPA; number 140429); and the Children's Cancer Institute (ICI);

Ethical standards

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 140429.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

ABSTRACT

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors (HDACis) increase histone acetylation and enhance both memory and synaptic plasticity. The basolateral nucleus of the amygdala (BLA) is a brain area crucially involved in enabling hormones and drugs to influence memory formation. We investigated the effects of BLA administration of an HDACi trichostatin A (TSA) on memory consolidation and extinction for inhibitory avoidance (IA). TSA enhanced memory consolidation and showed significant results in which infusions given 1.5 h, 3 h and 6 h after training, whereas no effect was observed when it was infused immediately posttraining. In a second experiment, the infusions were administered after a retention test trial that served as extinction training. TSA significantly facilitates extinction of IA memory. In addition, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is crucial for synaptic plasticity and for the maintenance of long-term memory. Previous studies shown that intrahippocampal administration of TSA enhances long-term contextual fear memory. Therefore, we examined the BDNF levels of TSA administration on BLA in both areas, BLA and hippocampus. TSA increase hippocampal BDNF levels in IA-trained rats but not in amygdala. These results indicate that TSA can increase IA memory consolidation and extinction when given into the BLA and demonstrated that the activity of the hippocampus influences on memory formation in this conditions.

Keywords:

Histone deacetylase

Trichostatin A

Memory

Amygdala

Hippocampus

BDNF

1. INTRODUCTION

Epigenetic chromatin remodeling, post-translational modifications of DNA and nuclear proteins represent central mechanisms for regulation of gene expression. These modifications alter chromatin structure and make specific regions of the genome more or less accessible to the transcriptional machinery. Epigenetic remodeling is crucial to cellular differentiation, development and behavior. Also, there is increasing evidence that the regulation of chromatin structure through DNA methylation and histone acetylation might mediate longlasting behavioural changes in the context of learning and memory (ABEL & ZUKIN, 2009; GRÄFF & TSAI, 2013; LEVENSON et al., 2004). Histone acetylation is one of the types of epigenetic phenomena that occur in the brain and have been linked to memory formation (BARRETT & WOOD, 2008; GRÄFF & TSAI, 2013; JIANG et al., 2008; LEVENSON & SWEATT, 2005).

Histone deacetylase (HDAC) proteins, which regulate the level of histone acetylation, are responsible for the deacetylation of N-terminal lysine residues in histones, as the core histones H2A, H2B, H3 and H4. Deacetylation of histones is associated with a relatively compact and inaccessible chromatin state, which generally correlates with lower gene transcription (CAREY & LA THANGUE, 2006; JENUWEIN & ALLIS, 2001) The use of histone deacetylase inhibitors (HDACis) increase histone acetylation and enhance both memory and synaptic plasticity. They are the most widely investigated pharmacological approach to produce memory enhancement through epigenetics modulations (BHALLA, 2005; VECSEY et al., 2007). One of the HDACis most used in memory experiments is the hydroxamic acid trichostatin A (TSA). They contain a functional group that interacts with the critical zinc atom at the base of the catalytic pocket of the class I and II HDACs. TSA inhibit both classes (BHALLA, 2005).

The same processes that lead to the formation of long-term behavioural memories

(LTM) also lead to epigenetic marking of the genome (LEVENSON & SWEATT, 2005). Acetylation of histone H3 is significantly increased after an animal undergoes contextual fear conditioning. TSA facilitates long-term potentiation (LTP) in the CA1 hippocampal area and in amygdala slices (MONSEY et al., 2011; VECSEY et al., 2007). The amygdala are involved in the processing of anxiety, alertness, or aversiveness. In inhibitory avoidance (IA), in a highly emotional task (conditioned fear), the amygdala plays a major role and the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) is required to mediate drug influences on memory consolidation (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; MCGAUGH; CAHILL & ROOZENDAAL, 1996; MCGAUGH, 2002; MCINTYRE; MCGAUGH & WILLIAMS, 2012). Also, a biochemical sequence of events necessary for memory formation of inhibitory avoidance behavior occurs in the rat hippocampus (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Intrahippocampal administration of TSA immediately after training enhances long-term contextual fear memory (BLANK et al., 2014; VECSEY et al., 2007).

The biochemical events are regulated early after training by hormonal and neurohumoral mechanisms related to alertness, anxiety, and stress, and 3–6 h after training by pathways related to mood and affect. The early modulation is mediated extrinsically by the amygdala, which handle emotional components of memories and are direct or indirect sites of action for several hormones and neurotransmitters (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Selective lesions, functional inactivation, or pharmacological inhibition of the BLA block the effects of systemically administered drugs and hormones on memory (QUIRARTE; ROOZENDAAL & MCGAUGH, 1997; ROESLER; ROOZENDAAL & MCGAUGH, 2002; ROOZENDAAL & MCGAUGH, 1997). Many hormones and neurotransmitters regulate transcription via the transcription factor CREB, that has been implicated in a large number of physiological processes, including learning and memory. TSA has been shown to enhance activation of CREB reporter genes by cyclic adenylyl monophosphate (cAMP), which

activates protein kinase A (PKA). Thus, the regulation of transcription by CREB occurs mediating HATs activation and mediating HDACs repression (KANDEL, 2012; VECSEY et al., 2007).

Treatment with the HDACis, as TSA, ameliorated deficits in synaptic plasticity and cognition in several of the CREB-binding protein (CBP) mutant mouse models. Evidences showed that HDACis are only effective if some CREB or CBP function remains. Thus, CREB and CPB appear to recruit HATs to the promoters of specific genes whose expression is altered by HDACis to give rise to amelioration of the behavioral and synaptic deficits (ABEL & ZUKIN, 2009). Also, it is known that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is crucial for the maintenance of LTM and CREB is required for BDNF transcription. The role of BDNF in fear conditioning is well defined and within the amygdala of the rat lead to an increase in BDNF protein and gene transcripts. TSA increased BDNF transcripts in astrocytes in a time-dependent manner. Thus, HDAC inhibition increases the expression of key genes involved in memory formation and it was a potential target of learning-induced epigenetic regulation of gene expression (BAMBAH-MUKKU et al., 2014; BREDY et al., 2007; WU et al., 2008).

The effects of HDACis on memory have been increasingly investigated and previous study of our group examine the effects on memory enhancement induced by administration of TSA in the dorsal hippocampus. While the epigenetic mechanisms have been extensively studied in the hippocampus, relatively little is known about their function in amygdala-dependent learning and memory. The present study aimed verified the effects of administering TSA into the BLA on the consolidation and extinction of memory for IA, and examine the effects on BDNF levels in both regions, BLA and hippocampus.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

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 140429.

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 14-mm, 23-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the BLA, as described previously (JOBIM et al., 2012; ROESLER et al., 2004). Coordinates (anteroposterior, -2.8 mm from bregma; mediolateral, ± 4.8 mm from bregma; ventral, -7.5 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)

Single-trial step-down IA task was used as an established model of fear-motivated conditioning memory, where the animals learn to associate a location in the training apparatus

(a grid floor) with an aversive stimulus (footshock). The general procedures for IA behavioral training and retention tests were described in previous reports (JOBIM et al., 2012; ROESLER et al., 2004; ROESLER et al., 2006). The IA training 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, rats were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with a digital chronometer. Immediately after stepping down on the grid, rats received a 0.4-mA, 3.0-s footshock and then removed from the apparatus immediately afterwards. 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 300 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 (ROESLER et al., 2014). Rats that did not step down to the grid floor within 300 s during the first 24 h retention/extinction test trial were gently led by 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., 2014; TRONEL & ALBERINI, 2007).

2.4. Drug infusions

The general procedures for BLA infusions were described in previous reports (ROESLER et al., 2004). At the time of infusion, a 27-gauge infusion needle was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at the BLA. Drug or vehicle was infused during a 30-s period. The infusion

needle was left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the needle tip.

In the experiment to examine the memory consolidation, rats received a bilateral 0.5- μ l infusion of TSA (Sigma-Aldrich; 22mM) dissolved in 50% ethanol in saline (vehicle, VEH; Vecsey et al., 2007) into the BLA in different times before IA training. Control animals received VEH in the same condition. In the memory extinction experiment, rats received a bilateral 0.5- μ l infusion of TSA (22mM) or VEH immediately after the first test trial. The TSA dose was chosen on the basis of previous studies of our group showing that it enhanced IA memory consolidation when given into the dorsal hippocampus (BLANK et al., 2014). We decided to see the effects in BLA. Drug solutions were prepared freshly before each experiment.

2.5. Measurement of hippocampal BDNF levels

A separate group of rats was given one IA training trial as described above. The rats were given BLA infusions of TSA (22mM) or VEH immediately after the first test trial. Four hours after the last infusion, animals were sacrificed by decapitation. Their brains were removed and the BLA and hippocampus 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). BLA and hippocampal BDNF levels were measured as described previously (GOULART et al., 2010; Kauer-Sant'Anna, 2007), using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) commercial kits according to the manufacturer's instructions (ChemiKine TM, 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 BLA. The extension of the methylene blue dye was taken as indicative of diffusion of the drugs previously given each rat, as previously described (ROESLER et al., 2004; ROESLER et al., 2006]. Also, part of these brains were immediately collected and preserved in 10 % formalin for at least 72 h. Thereafter, for the cryopreservation process, the brains were immersed in 30 % sucrose solution for a period of 72 h. After that, the brains were frozen in liquid nitrogen with the aid of isopentane. Finally, they were cut with a cryostat and stained with hematoxylin. 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 300 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. BDNF results were analyzed using T-Test for independent samples. For all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. All data are shown as mean + SEM.

3. RESULTS

3.1. Time course of consolidation enhancement by BLA administration of TSA

The first experiment tested the effects of posttraining BLA administration of TSA on consolidation of IA memory. Rats were given IA training followed by a bilateral infusion of VEH or TSA (22 mM) into the BLA in different times after training. Based on the results showing that the dose (22 mM) of TSA produced a significant effect in the dorsal hippocampus [referenciar artigo Tina], rats were treated with only this dose choice. The resulting experimental groups were 1) VEH ($n = 10$) or TSA ($n = 9$) immediately after training; 2) VEH ($n = 13$) or TSA ($n = 13$) 1.5h after training; 3) VEH ($n = 14$) or TSA ($n = 14$) 3h after training; and 4) VEH ($n = 13$) or TSA ($n = 13$) 6h after training. All rats were tested for retention 24 h later after training.

Results are shown in Fig. 1. There were significant differences between the VEH groups and groups given TSA (22 mM) in test on infusions 1.5h, 3h and 6h posttraining, but not immediately after training. TSA was infused immediately after training and no significant effect of TSA was observed. In contrast, an infusions given 1.5 h, 3h and 6h posttraining, had a significantly effect on memory retention ($p < 0.008$; $p < 0.05$; $p < 0.004$; respectively). Finally, the results indicate that TSA administration (1.5 h, 3 h and 6h posttraining) resulted in significant enhancement of IA memory retention.

Fig. 1 should be inserted here

3.2. BLA infusions of an TSA induced enhancement of IA memory extinction

The second experiment tested the effects of BLA infusions of VEH and TSA on extinction of IA memory. Rats were given bilateral BLA infusions of VEH ($n = 11$) or TSA ($n = 12$) immediately after the first extinction session (Test 1). 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.

There was a decline in retention levels across test trials, and both groups displayed similarly high latencies when tested after a reminder shock (Fig. 2). There were significant differences between rats given VEH and TSA in Test 2 ($p < 0.001$), Test 4 ($p < 0.001$) and Reminder ($p < 0.01$), but not in other behavioral trials. The results indicate that TSA administration resulted in significant enhancement of IA memory extinction that lasted for 3 days.

Fig. 2 should be inserted here

3.3. BLA infusions of an TSA increase hippocampal BDNF levels in IA-trained rats but not in amygdala

We then went on to examine whether BLA infusions of TSA or VEH would increase BLA and hippocampal BDNF levels in a separate group of rats given IA training (VEH, $n = 12$; TSA, $n = 10$). The results showed that pharmacological manipulations affected hippocampal BDNF levels ($F = 10.442$, $df = 20$, $p = 0.04$; Fig. 3), but no significant effect of TSA in BDNF levels was observed in amygdala.

Fig. 3 should be inserted here

3.4. Histology

All animals (144 rats) included in the final analysis of IA had cannula bilaterally placed in the intended sites. Fig. 4 shows schematic drawings of the diffusion of methylene blue, which indicates infusion placements and spread of drug infusions, within the BLA.

Fig. 4 should be inserted here

4. DISCUSSION

The novel findings reported here can be summarized as follows: (1) administration of the HDACi TSA into the BLA 1.5 h, 3 h and 6 h posttraining enhanced retention of memory

for IA, but not when the drug administered immediately after training; (2) TSA given immediately after Test 1 in the second experiment, facilitated the extinction of memory for IA; and (3) BLA infusions of TSA increase hippocampal BDNF levels in IA-trained rats but not in amygdala.

We have shown previously that intrahippocampal administration of TSA enhances long-term contextual fear memory and the inactivation of the BLA blocked the memory enhancing effect of TSA in the hippocampus (BLANK et al., 2014). The BLA has a general and critical role that influence memory formation in the brain and is required to enable the influence of endogenous hormones, as well as of systemic or localized administration of drugs, on memory consolidation (MCGAUGH et al., 1996; MCGAUGH, 2002; MCINTYRE et al., 2012). Therefore, we decided to test the effects of the TSA administration direct in the BLA. The results are consistent with previous findings in the hippocampus and TSA enhances long-term contextual fear memory on consolidation.

The biochemical events triggered by inhibitory avoidance learning, involve the late intervention of cAMP/PKA/CREB signaling pathway. The cAMP levels slowly increase beginning 60 min after step-down inhibitory avoidance training. PKA activity increases 3 to 6 h after training. Also, PKA-mediated CREB-P activation modulates protein synthesis and gene activation for persistence of synaptic plasticity and memory beyond 3 or 4 h. Besides, LTP memory is enhanced by the intrahippocampal administration of the 8-Br analog of cAMP or by stimulators of adenylyl cyclase 3 or 6 h after training (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Additionally, the TSA has been shown to enhance activation of CREB reporter genes by cAMP (FASS; BUTLER & GOODMAN, 2003). Probably these biochemical cascades influence the time course of memory enhancement by administration of TSA, only presenting significant results when the drug was infused starting 1.5 h to 6 h posttraining.

Previous *in vitro* studies using cell culture, showed that TSA increases the

transcription of the gene *c-FOS* (FASS; BUTLER & GOODMAN, 2003). *c-FOS* is related a synaptic tag, a short-lasting molecular event that sets the stage for the development of a later, protein dependent phase of LTP. C-fos increases have been reported after LTP. CREB-P induces synthesis of the transcription factor c-fos, that increase levels 3–6 h after training in CA1 hippocampus (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). The inhibition of the HDAC activity is required for cAMP activation of CREB target genes. Several studies have implicated *Nr4a1* (also known as NGFI-B [nerve growth factor inducible-B] and *nur77*) and *Nr4a2* as CREB target genes. TSA-induced enhancement of *Nr4a1* and *Nr4a2* expression after fear conditioning during memory consolidation. However, TSA blocks transcription of *Nr4a3* (also known as *Nor-1* [neuron-derived orphan receptor-1] and *Tec*) and ICER (FASS; BUTLER & GOODMAN, 2003; VECSEY et al., 2007). These data suggest that the facilitation of BLA memory and LTP by TSA administration, results in a selective and transient increase in the expression of genes related to synaptic plasticity, memory formation and contextual fear.

Histone acetylation increases following neuronal activity, that sustain gene expression changes are important for LTM and synaptic plasticity (GRÄFF & TSAI, 2013). These mechanism remodels chromatin structure, thereby modulating transcription. Specificity of gene regulation is achieved by the recruitment of HATs. They interact with a large number of transcription factors and integrate the activity of multiple signaling cascades. Acetylation of core histones is catalyzed by transcriptional coactivators such as CBP which required HAT activity. Instead HDACs reverse the effects of the HATs. Being that class 1 (HDACs 1, 2, 3 and 8) and class 2 (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 and 10) HDACs receiving the most attention in the nervous system (ABEL & ZUKIN, 2009; HABERLAND; MONTGOMERY & OLSON, 2009; KORZUS & MICHAEL G. ROSENFELD, 2004). HDACs of this two classes represent novel therapeutic approaches to treat neurodegenerative and psychiatric disorders

(CHUANG et al., 2009; MIKAELSSON & MILLER, 2011).

In brain regions involved in memory formation, such as the amygdala and hippocampus, class I and IV HDACs are more highly expressed than class II HDACs. HDAC2 and HDAC3 have been shown to negatively regulate learning and memory, whereas HDAC1 increases after contextual fear conditioning and facilitates memory extinction (BAHARI-JAVAN et al., 2012; GRÄFF & TSAI, 2013; MORRIS et al., 2013). Evidences has shown that HDACis can enhance memory formation or extinction by increasing the acetylation of H3, resulting in enhanced expression of genes related to memory and synaptic plasticity. Also, fear conditioning leads to a significant increase in the acetylation of histone H3 in the lateral amygdala (LA) and hippocampus. Intra-LA infusion of the TSA 1 h following auditory fear conditioning significantly enhances fear memory consolidation and LTM. Changes in histone acetylation are involved on memory consolidation, exctionton and likely in other different learning epigenetic signatures in the brain (GRÄFF & TSAI, 2013; LEVENSON et al., 2004; MONSEY et al., 2011). In our second experiment, when the TSA was infused post-test 1, a significant effect was observed on memory extinction compared to controls. This is in agreement with previous reposrts that showed that the administration of HDACis after retrieval can accelerate extinction of different types of conditioning (FUJITA et al., 2012; ITZHAK et al., 2012; LATTAL et al., 2007).

The hippocampus and amygdala participate the formation and expression of memory for a step-down inhibitory avoidance task in rats (IZQUIERDO et al., 1997). The elevated levels of neurotransmitters may alter the expression of specific target genes. The BDNF products act to alter neural function and behavior (ABEL & ZUKIN, 2009). BDNF is one of the genes influenced by HDAC, which is important for memory formation (BREDY et al., 2007; MINICHELLO, 2009; WU et al., 2008). Here we found that TSA administration immediately posttraining on the BLA increases significantly the levels of BDNF only on

hippocampus, indicating that TSA can activate biochemical cascades in other regions of the brain even infused in the amygdala. Non effect was observed in the BLA. These data are consistent with the non significantly results obtained when the TSA were infused immediately posttraining on memory consolidation experiment. Using inhibitory avoidance (IA) in rats, studies showed that at training, learning induced requirement of BDNF accompanied by the induction of a persistent activation of cAMP response CREB. CREB is required for BDNF transcription and BDNF is known to mediate CREB activation, which possibly explains the data found (BAMBAH-MUKKU et al., 2014).

5. CONCLUSION

In summary, our results indicate that the TSA administered into the BLA enhances the memory consolidation and extinction of IA. Also, the BDNF levels indicate that the TSA infused into the BLA enabling BDNF enhancement by manipulation of epigenetic mechanisms in another brain area, such as hippocampus.

REFERENCES

1. ABEL, T.; ZUKIN, R. S. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, n. 1, p. 57–64, 2009.
2. BAHARI-JAVAN, S. et al. HDAC1 Regulates Fear Extinction in Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 15, p. 5062–5073, 2012.
3. BAMBAAH-MUKKU, D. et al. A positive autoregulatory BDNF feedback loop via C/EBP β mediates hippocampal memory consolidation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 37, p. 12547–59, 2014.
4. BARRETT, R. M.; WOOD, M. A. Beyond transcription factors: the role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 15, n. 7, p. 460–467, 2008.
5. BHALLA, K. N. Epigenetic and Chromatin Modifiers As Targeted Therapy of Hematologic Malignancies. **J Clin Oncol**, v. 23, p. 3971–3993, 2005.
6. BLANK, M. et al. Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. **Neurobiology of learning and memory**, v. 111, p. 1–8, 2014.
7. BREDY, T. W. et al. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, p. 268–276, 2007.
8. CAREY, N.; LA THANGUE, N. B.; THANGUE, L. Histone deacetylase inhibitors: gathering pace. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 369–375, 2006.
9. CHUANG, D.-M. et al. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 11, 2009.
10. FASS, D. M.; BUTLER, J. E. F.; GOODMAN, R. H. Deacetylase activity is required

- for cAMP activation of a subset of CREB target genes. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 44, p. 43014–9, 31, 2003.
11. FUJITA, Y., et al. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, facilitates fear extinction and enhances expression of the hippocampal NR2B-containing NMDA receptor gene. **Journal of Psychiatric Research**, 46, 635–643, 2012.
 12. GOULART BK, et al. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. **Neuroscience**; v.167, p. 969-73, 2010 .
 13. GRÄFF, J.; TSAI, L.-H. Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, 2013.
 14. 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**, v. 10, n. 1, p. 32–42, 2009.
 15. 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, 409–417, 2012.
 16. IZQUIERDO, I. et al. Sequential Role of Hippocampus and Amygdala, Entorhinal Cortex and Parietal Cortex in Formation and Retrieval of Memory for Inhibitory Avoidance in Rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, p. 786–793, 1997.
 17. 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**, v. 68, p. 285–316, 1997.
 18. JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1074–80, 2001.

19. JIANG, Y. et al. Epigenetics in the Nervous System. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 46, p. 11753–11759, 2008.
20. JOBIM, P. F. et al. Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, p. 105–112, 2012.
21. KANDEL, E. R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. **Molecular Brain**, v. 5, n. 1, p. 14, 2012.
22. KAUER-SANT'ANNA M et al. A gastrin-releasing peptide receptor antagonist blocks D-amphetamine-induced hyperlocomotion and increases hippocampal NGF and BDNF levels in rats. **Peptides**; v. 28, p. 1447-52, 2007.
23. KORZUS, E.; MICHAEL G. ROSENFELD. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. **Neuron**, v. 42, p. 961–972, 2004.
24. LATTAL, K. M., BARRETT, R. M., & WOOD, M. A. Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, p. 1125–1131, 2007.
25. LEVENSON, J. M. et al. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40545–40559, 2004.
26. LEVENSON, J. M.; SWEATT, J. D. EPIGENETIC MECHANISMS IN MEMORY FORMATION. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, 2005.
27. MCGAUGH, J. L. Memory consolidation and the amygdala: A systems perspective. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 9, p. 456–461, 2002.
28. MCGAUGH, J. L.; CAHILL, L.; ROOZENDAAL, B. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13508–13514,

- 1996.
29. MCINTYRE, C. K.; MCGAUGH, J. L.; WILLIAMS, C. L. Interacting brain systems modulate memory consolidation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1750–1762, 2012.
 30. MIKAELSSON, M. A; MILLER, C. A. The path to epigenetic treatment of memory disorders. **Neurobiology of learning and memory**, v. 96, n. 1, p. 13–8, 2011.
 31. MINICHELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 12, p. 850–860, 2009.
 32. MONSEY, M. S. et al. Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19958, 2011a.
 33. MONSEY, M. S. et al. Epigenetic Alterations Are Critical for Fear Memory Consolidation and Synaptic Plasticity in the Lateral Amygdala, 2011b.
 34. MORRIS, M. J. et al. Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 15, p. 6401–11, 2013.
 35. PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th ed.; San Diego: **Academic Press**, 2007.
 36. QUIRARTE, G. L.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 25, p. 14048–14053, 1997.
 37. ROESLER, R.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training. **The European journal of neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 905–10,

- 2002.
38. ROESLER, R., et al. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 1041–1045, 2004.
 39. ROESLER, R. et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 51, p. 350–357, 2006.
 40. ROESLER R et al. A phosphodiesterase 4-controlled switch between memory extinction and strengthening in the hippocampus. **Front Behav Neurosci**; v. 8, p. 91, 2014.
 41. ROOZENDAAL, B.; ~ G A U G H ~, J. L. M. Basolateral Amygdala Lesions Block the Memory- enhancing Effect of Glucocorticoid Administration in the Dorsal Hippocampus of Rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, p. 76–83, 1997.
 42. TRONEL S, Alberini CM. Persistent disruption of a traumatic memory by postretrieval inactivation of glucocorticoid receptors in the amygdala. **Biol Psychiatry**; v. 62, p. 33-9, 2007.
 43. VECSEY, C. G. et al. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 23, p. 6128–40, 2007.
 44. WU, X. et al. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1123–1134, 2008.

LEGENDS FOR FIGURES

Figura 2. Time course of consolidation enhancement for IA by BLA administration of TSA. (A) Rats were given IA training followed by aninfusion of VEH or TSA (22 mM) into the BLA immediately after training. Retention was tested 1 day after training. (B) Rats were trained and tested as described above, but infusion of VEH or TSA (22 mM) was given 1.5 h after training. (C) Rats were trained and tested as above, but infusion of VEH or TSA (22 mM) was given 3 h after training; (D) VEH or TSA (22 mM) was infused 6 h after training. Data are mean + S.E.M. retention test latencies to step-down (s); * $p < 0.05$ compared to VEH-treated rats.

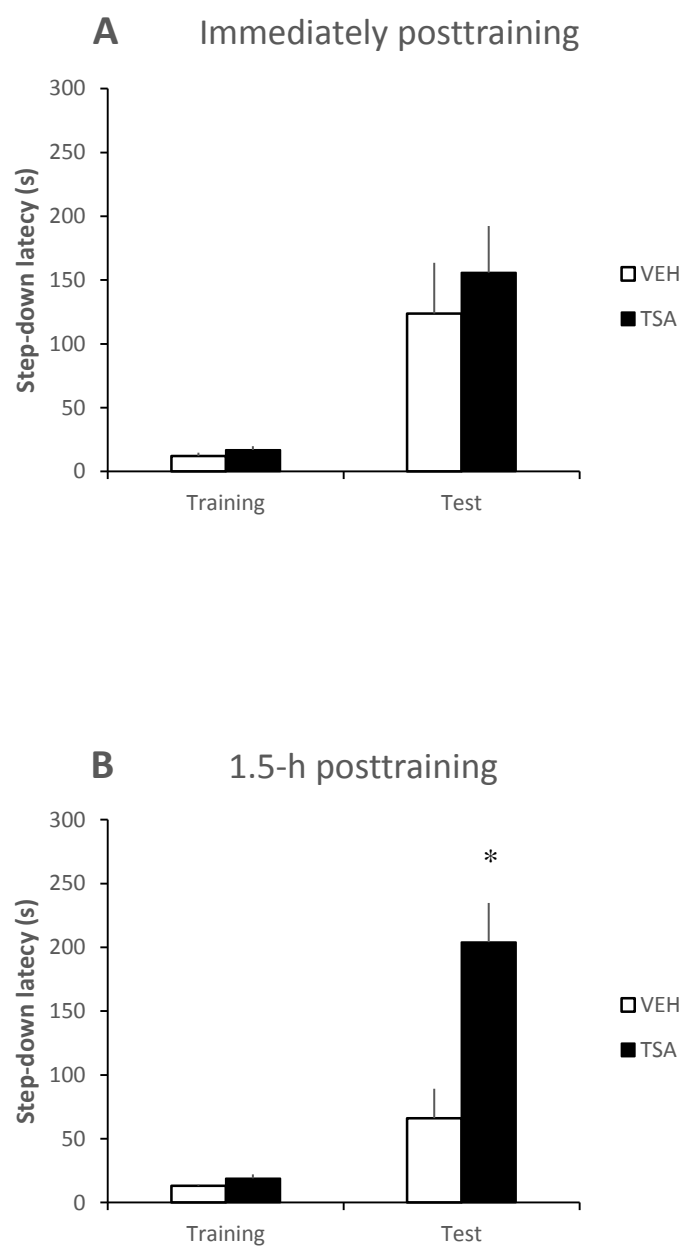
Fig. 2. Administration of TSA into the BLA enhances long-term retention of IA memory. Rats were given bilateral infusions of VEH or TSA (22 mM) immediately before the first extinction training session (Test 1). All rats were tested for retention 1 (Test 2), 2 (Test 3), 3 (Test 4), and 4 (Test 5) days after Test 1. Immediately after Test 5, rats were given a reminder footshock and tested again 1 day later. Data are mean + S.E.M. retention test latencies to step-down (s); * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to VEH-treated rats.

Fig. 3. BLA infusions of theTSA increases BDNF levels in the hippocampus of rats trained in IA. Rats were given bilateral infusions of VEH or TSA (22 mM) immediately after IA training on BLA. Four h after IA training, rats were sacrificed and the BLA and hippocampal BDNF levels were measured with an ELISA assay. Data are mean + SEM. pg of BDNF/mL of protein; * $p < 0.05$ compared to VEH-treated rats.

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

FIGURES

Fig. 1.



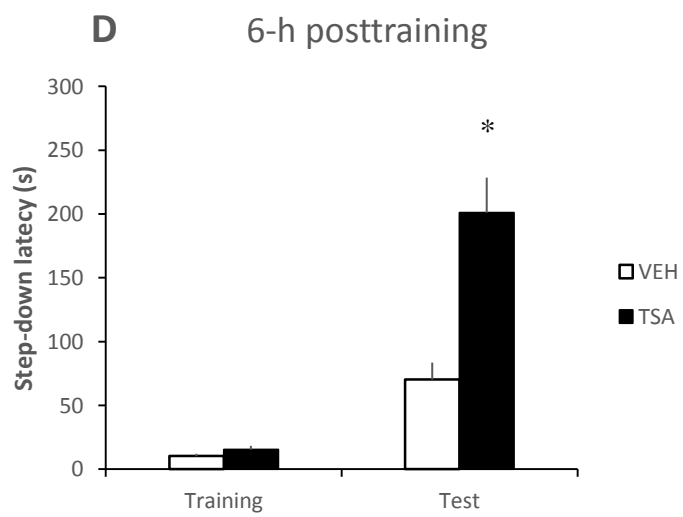
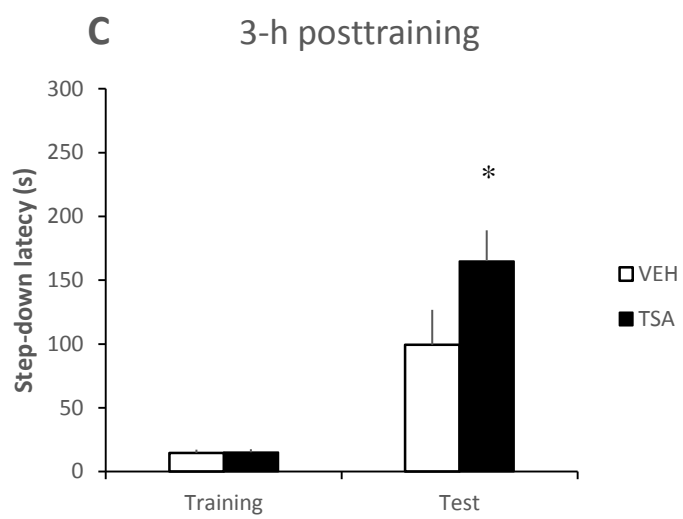


Fig. 2.

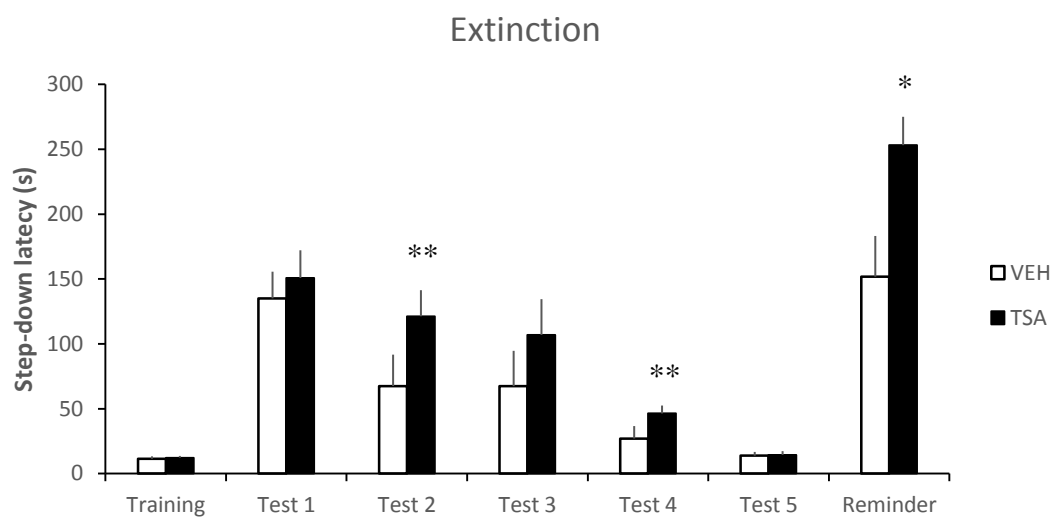


Fig. 3.

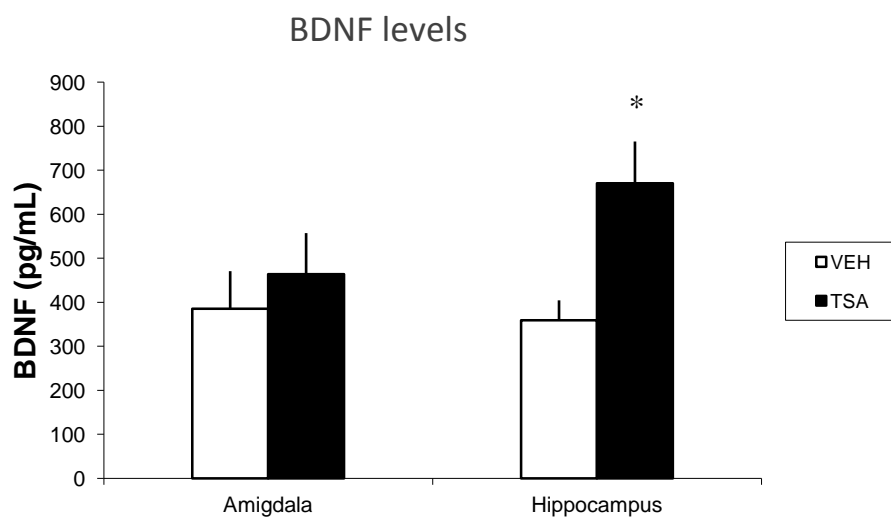


Fig. 4.



7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que o TSA possui efeitos melhoradores de LTM quando administrados na BLA de ratos jovens. Durante a consolidação, TSA apresentou efeitos positivos de melhoramento da memória, quando administrado 1.5 h, 3 h e 6 h após o treino, que condizem com vias cruciais para ativação da expressão gênica durante a consolidação da memória na amígdala. No segundo experimento, foi observado que o TSA possui efeitos significativos nos Teste 2, Teste 4 e Reminder facilitando a extinção da memória. Além disso, quando analisados os efeitos da administração intra-amigdalár sobre os níveis de BDNF na BLA e no hipocampo, foram observados aumentos significativos apenas no hipocampo, o que indica que administração de TSA na BLA permite o aumento do BDNF pela manipulação de mecanismos epigenéticos em outras áreas do cérebro. Os resultados demonstram a importância da relação entre os mecanismos epigenéticos, como a acetilação de histonas, e os efeitos desencadeados pelo TSA na formação da memória.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A identificação de modificações epigenéticas envolvidas na formação da memória, na plasticidade sináptica e na cognição, representa um papel importante na regulação da expressão gênica e inspirou a busca por alvos terapêuticos que interferissem nesse processo. Evidências mostram que inibidores de histonas deacetilases podem melhorar diversas complicações relacionadas a uma série de doenças neurológicas e psiquiátricas (Chuang et al. 2009). O estudo sugere que o TSA pode ser um grande potencial terapêutico para transtornos cognitivos associados à memória. Dessa forma, é de grande importância elucidar e compreender mais a fundo por quais mecanismos moleculares e rotas bioquímicas e biológicas ele atua. Nossos resultados indicam que, na BLA, o TSA tem efeito tanto na consolidação quanto na extinção da memória aversiva, bem como, altera os níveis de BDNF no hipocampo. Estes dados demonstram a importância de entender as interações desse fármaco com o sistema nervoso, já que a perturbação de sua atividade parece estar envolvida em diversas doenças.