

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

MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAS NA CROMATINA E FORMAÇÃO DA
MEMÓRIA: MODULAÇÃO POR INIBIÇÃO DE HISTONAS DESACETILASES

GUSTAVO KELLERMANN REOLON

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

Orientador: Dr. Rafael Roesler

Co-orientador: Dr. Marcelo Wood

Porto Alegre

Abril, 2011

INSTITUIÇÕES

Este trabalho foi desenvolvido nos seguintes laboratórios:

-Laboratório de Neurofarmacologia e Biologia de Tumores Neurais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

-Laboratório de Pesquisa em Câncer, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

-Laboratório do Dr. Marcelo Wood, *Department of Neurobiology and Behavior, Center for the Neurobiology of Learning and Memory, University of California, Irvine;*

-Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Faculdade de Biociências, Departamento de Ciências Fisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

FONTES FINANCEIRAS

Este trabalho obteve os seguintes apoios financeiros:

-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), edital 303703/2009-1 para o Dr. Rafael Roesler, edital 305905/2009-0 para a Dra. Nadja Schröder e bolsa de doutorado para Gustavo Kellermann Reolon;

- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Pesquisa Translacional em Medicina para o Dr. Rafael Roesler e para a Dra. Nadja Schröder;
- Whitehall Foundation* para o Dr. Marcelo A. Wood;
- *National Institutes of Mental Health*, R01MH081004 para o Dr. Marcelo A. Wood;
- *Predoctoral Training Program in Cellular and Molecular Neuroscience*, bolsa para Ruth M. Barrett - Investigador Principal Arthur D. Lander - T32 NS007444–7 e
- Prêmio para Pós-Graduando Estrangeiro do Centro para a Neurobiologia do Aprendizado e Memória [(CNLM) Foreign Graduate Student Award] e Prêmio para Pesquisador Visitante Renée Harwick (Renée Harwick Visiting Scholars Award) para Gustavo Kellermann Reolon.

AFILIAÇÃO DO CO-ORIENTADOR

O Dr. Marcelo Wood é afiliado ao *Department of Neurobiology and Behavior, Center for the Neurobiology of Learning and Memory, University of California, Irvine.*

Dedico esta tese à Carlos, Rejane e Mariana pelo apoio incondicional. Tenho muito orgulho de serem minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Rafael Roesler, por todas as oportunidades e os ensinamentos. À sua capacidade de acreditar e auxiliar no meu desenvolvimento científico. Pela sua paciência nos momentos difíceis. Pela amizade e companheirismo durante todos estes anos, as quais guardo com grande estima.

Ao meu co-orientador, professor Marcelo Wood, pelas oportunidades, reflexões e lições que me proporcionou. Embora aprendidas em curto período, espero que estas importantes informações tenham evocação duradoura. Além disso, pela amizade e companheirismo que fizeram o ambiente de trabalho muito estimulante.

Ao Dario Figueroa, pelo crucial auxílio experimental, amizade companheirismo e grandes discussões filosóficas.

À Melissa Malvaez, pela ajuda em um momento experimental crítico e pela amizade.

À Natasha Maurmann, pela grande amizade e companheirismo. À sua contagiante força de vontade que me incentivaram durante os anos da pós-graduação.

Ao Paulo Jobim, pelas frutíferas indagações, pela grande força de vontade e pela amizade e companheirismo.

Ao Thiago Pedroso, pela amizade.

À Aline Werenicz, pelo grande suporte experimental, pela determinação em melhorar nosso laboratório e nossa pesquisa e pela amizade e companheirismo.

À Raissa, pela amizade e importante força de vontade.

Aos amigos do laboratório de biologia do câncer, que sempre me incentivaram com seu auxílio e amizade.

À Nadja Schröder, pelo auxílio e amizade durante estes anos.

Ao Guido Lenz, pelo exemplo de pesquisador ao qual almejo ser, pela grande amizade e valiosas conversas.

À Célia Cardoso, pela sagacidade inspiradora.

À Silvia e ao Luciano, pelo importante auxílio durante estes anos e pela amizade que rendeu memoráveis momentos divertidos.

À banca, pelo aceite, mesmo com tão pouco tempo para correção.

À Mariana, minha irmã, a qual sempre foi uma pessoa que tive muito orgulho.

À Rejane, minha mãe, pela garra e força de vontade demonstrada e todos os ensinamentos.

Ao Carlos, meu pai, por todo o suporte, ajuda e ensinamentos.

À Renée Harwick, por acreditar que a ciência é um investimento importante e assim possibilitar o avanço científico de pesquisadores da área de memória e aprendizado.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	9
LISTA DE FIGURAS	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO	20
A memória	20
A cromatina	23
As acetiltransferases de histonas e as histonas desacetilases	28
Os inibidores de histonas desacetilases	31
As PTMs de histonas em células neuronais.....	32
As PTMs de histonas em estímulos estressantes	34
A acetilação de histonas na plasticidade sináptica e memória.....	36
Os modelos genéticos de HATs ou HDACs alteradas	44
A extinção da memória e PTMs em histonas	49
A metilação de histonas e a memória	51
A acetilação de histonas em modelos de envelhecimento e a neurodegeneração.....	54
A memória e outras proteínas acetiladas	60
Outras PTMs em histonas.....	61
A metilação do DNA na plasticidade sináptica e na memória	63

OBJETIVOS.....	66
INTRODUÇÃO AO ARTIGO 1.....	67
INTRODUÇÃO AO ARTIGO 2.....	72
INTRODUÇÃO AO ARTIGO 3.....	81
DISCUSSÃO.....	94
CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
PERSPECTIVAS.....	114
APÊNDICE.....	115
<i>CURRICULUM VITAE</i> RESUMIDO.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

5-HT:	serotonina
Ac:	<i>acetylation</i> (acetilação)
ActD:	<i>actinomycin D</i> (actinomicina D)
BDNF:	<i>brain-derived neurotrophic factor</i> (fator neurotrófico derivado do cérebro)
BLA:	<i>basolateral amygdala</i> (amígdala basolateral)
C/EBP:	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i> (proteína ligante ao amplificador CCAAT)
CA1:	<i>cornu ammonis</i> (região CA1 do hipocampo)
CaMKII:	<i>calcium-calmodulin-dependent protein kinase II</i> (proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina)
CBP:	<i>CREB binding protein</i> (proteína ligante de CREB)
CBP ^{KIX/KIX} :	camundongos homocigotos para a tripla mutação no domínio KIX de CBP
ChIP:	<i>chromatin immunoprecipitation</i> (imunoprecipitação da cromatina)
cyclicAMP:	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> (monofosfato de adenosina cíclica)
cm:	centímetro
CNS:	<i>Central Nervous System</i> (Sistema Nervoso Central)
CoFC:	<i>contextual fear conditioning</i> (condicionamento aversivo ao contexto)
CPP:	<i>conditioned place preference</i> (preferência condicionada ao lugar)

CREB:	<i>cAMP response element-binding protein</i> (proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP)
CSM:	<i>context-signal memory</i> (memória de sinal-contexto)
CuFC:	<i>cued fear conditioning</i> (condicionamento aversivo ao indício sonoro)
d:	<i>day</i> (dia)
DI:	<i>discrimination index</i> (índice de discriminação)
DMT:	<i>histone demethylase</i> (demetilase de histona)
DNA:	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DNMT:	<i>DNA methyltransferase</i> (DNA metiltransferase)
DRD1	<i>D₁ subtype of the dopamine receptor</i> (receptor de dopamina do subtipo D ₁)
DRD2:	<i>D₂ subtype of the dopamine receptor</i> (receptor de dopamina do subtipo D ₂)
EBCC:	<i>eyeblink classical conditioning</i> (condicionamento clássico de piscar o olho)
EE:	<i>environmental enrichment</i> (enriquecimento ambiental)
EED:	uma histona metiltransferase
e-LTP:	<i>early long-term potentiation</i> (potenciação de longa duração precoce)
ERK:	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> (proteína quinase regulada por sinal extracelular)
g:	grama
GR:	<i>glucocorticoid receptor</i> (receptor de glicocorticoides)

H:	<i>histone</i> (histona)
h:	<i>hours</i> (horas)
HAT:	<i>histone acetyltransferase</i> (acetiltransferase de histona)
HDAC:	<i>histone deacetylase</i> (histona desacetilase)
HDACi:	<i>histone deacetylase inhibitor</i> (inibidor de histona desacetilase)
HMT:	<i>histone methyltransferase</i> (metiltransferase de histona)
i.c.v.:	intracerebroventricular
IEG:	<i>immediately early gene</i> (gene de ativação imediata)
IKK α :	<i>IκB kinase α</i> (I κ B quinase α)
ip, i.p.:	intraperitoneal; <i>intraperitoneal</i>
K:	resíduo de aminoácido lisina
kb:	quilobase
KCl:	cloreto de potássio
kDa:	quilodalton
Kg:	quilograma
KID:	<i>kinase inducible domain</i> (domínio induzido por quinase)
I-LTP:	<i>late long-term potentiation</i> (potenciação de longa duração tardia)
LTF:	<i>long-term facilitation</i> (facilitação de longa duração)
LTM:	<i>long-term memory</i> (memória de longa duração)
LTP:	<i>long-term potentiation</i> (potenciação de longa duração)
μ l:	microlitro
MAPK:	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por

	mitógeno)
Me:	<i>methylation</i> (metilação)
MeCP2:	<i>methyl-CpG-binding domain protein 2</i> (proteína com domínio de ligação à CpG-metilada 2)
mEPSCs:	<i>miniature excitatory postsynaptic currents</i> (correntes excitatórias pós-sinápticas em miniatura)
min:	minuto; <i>minute</i>
miR:	micro ácido ribonucleico
ml:	<i>milliliter</i> (mililitro)
MLL:	uma histona metiltransferase
mRNA:	<i>messenger ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico mensageiro)
MSK:	<i>mitogen- and stress-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno e estresse)
MWM:	<i>Morris water maze</i> (labirinto aquático de Morris)
NaB, NaBut:	<i>sodium butyrate</i> (butirato sódico)
NaCl:	cloreto de sódio
NADP ⁺ :	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada)
NeuN:	<i>neuronal nuclei</i> (marcador nuclear neuronal)
NF-κB:	<i>nuclear factor-kappa B</i> (fator de transcrição nuclear kappa B)
NGS	<i>normal goat serum</i> (soro normal de cabra)
nM:	nanomolar

NMDAr:	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i> (receptor N-metil-D-aspartato)
NOR:	<i>novel object recognition</i> (reconhecimento de objeto novo)
OLT:	<i>object location task</i> (tarefa de localização do objeto)
P:	<i>phosphorylation</i> (fosforilação)
PARP:	<i>polyADP-ribose polymerase</i> [poli(ADP-ribose) polimerase]
PCAF:	<i>p300/CBP-associated factor</i> (fator associado à p300/CBP)
PDA:	<i>phorbol 12,13-diacetate</i> (forbol diacetato)
PDE4:	<i>phosphodiesterase type 4</i> (fosfodiesterase tipo 4)
PKA:	<i>protein kinase A</i> (proteína quinase A)
PKC:	<i>protein kinase C</i> (proteína quinase C)
PP1:	<i>protein phosphatase 1</i> (proteína fosfatase 1)
PTM:	<i>post translational modification</i> (modificação pós-traducional)
R:	resíduo de aminoácido arginina
RNAm:	ácido ribonucleico mensageiro
S:	resíduo de aminoácido serina
s:	segundos
SAHA:	<i>suberoylanilide hydroxamic acid</i> (ácido suberoilânido hidroxâmico)
Setdb1:	<i>set domain, bifurcated 1protein</i>
SIRT1:	<i>sirtuin 1</i> (sirtuína 1)
STF:	<i>short-term facilitation</i> (facilitação de curta duração)
STM:	<i>short-term memory</i> (memória de curta duração)
TSA:	<i>trichostatin A</i> (tricostatina A)

TSS: *transcription start site* (sítio de início da transcrição)

u: ubiquitinação

VPA: *valproic acid* (ácido valproico)

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1:	Representação esquemática de diferentes vias de sinalização que ativam a transcrição durante a consolidação da memória.....	22
Figura 2:	Cinco mecanismos interligados envolvidos na modificação da estrutura da cromatina.....	23
Figura 3:	Desenho esquemático do nucleossomo, enfatizando algumas das suas possíveis modificações pós-traducionais.....	25
Figura 4:	Diferentes classes de proteínas envolvidas na modificação da cromatina.....	27
Figura 5:	Reação reversível de acetilação controlada por acetiltransferases de histonas e histonas desacetilases.....	28
Figura 6:	Classes de histonas desacetilases e alguns dos seus inibidores seletivos e inespecíficos.....	32
Figura 7:	Diagrama esquemático de CBP mostrando seus diferentes domínios funcionais.....	46

RESUMO

A acetilação de histonas está envolvida na plasticidade sináptica e na memória, sendo uma reação reversível catalisada por acetiltransferases de histonas (HATs) e revertida por histonas desacetilases (HDACs). A administração intraperitoneal de butirato sódico (NaB) - inibidor de histonas desacetilases (HDACi), na dose de 1,2 g/kg imediatamente após o treino na tarefa de reconhecimento de objeto novo (NOR), abrandou o prejuízo associado ao envelhecimento em ratos de 24 meses no teste 24 horas após o treino, memória de longa duração (LTM). A mesma dose de NaB administrada i.p. 6 horas após o treino de NOR não tem efeito na LTM em ratos de 18 meses, indicando que a melhora observada pelo HDACi seja temporalmente restrita à fase inicial da consolidação. A injeção de NaB imediatamente após o treino não teve efeito na LTM de NOR em ratos de 3 meses. Em camundongos treinados pelo protocolo de NOR que não induz *per se* a memória de curta ou longa duração, observou-se memória 24 horas e 7 dias após o treino quando receberam NaB i.p. após o aprendizado. Os animais treinados pelo protocolo de NOR de indução de memória 24 horas - mas não 7 dias - após aprendizado, não apresentam melhora no teste de 7 dias quando receberam NaB i.p. 1 hora antes do referido teste, sugerindo que a inibição de HDACs não tenha efeito na evocação. A administração i.p. de NaB após aquisição reverteu o déficit na memória dos camundongos com a proteína de ligação à CREB com mutação no sítio de ligação à CREB 7 dias após o treino de NOR, indicando que esse sítio não é necessário

na melhora da memória de NOR por NaB. A infusão de tricostatina A - um HDACi - imediatamente após o treino na amígdala de camundongos melhorou a LTM de condicionamento aversivo ao contexto, mas não de condicionamento aversivo ao indício sonoro, indicando que o efeito gerado pela inibição de HDACs pode depender do tipo de memória analisada. Este estudo sugere que NaB abrande o prejuízo associado ao envelhecimento na memória de NOR e aumenta a persistência da memória.

ABSTRACT

Histone acetylation is involved in synaptic plasticity and memory. This reversible reaction is catalysed by histone acetyltransferases (HATs) and reversed by histone deacetylases (HDACs). Systemic administration of sodium butyrate (NaB), an inhibitor of histone deacetylases (HDACi), at 1.2 g/kg (i.p.) immediately after training on a novel object recognition task (NOR), ameliorated aging-related memory impairments in 24 month old rats. The same dose of NaB administered i.p. 6 hours after NOR training had no effect on long-term memory (LTM) in 18 month old rats, indicating that the HDACi memory enhancement is temporally restricted to the initial phase of consolidation. NaB injection immediately after training had no effect on NOR memory in 3 month old rats. Mice trained in a NOR protocol that does not elicit neither short-term nor long-term memory by itself, when received NaB i.p. after learning, showed memory 24 hours and 7 days after acquisition. Mice trained in a NOR protocol in which memory is observed 24 hours - but not 7 days - after learning, did not show memory enhancement on the 7-day test when received i.p. NaB 1 hour before, suggesting that the HDACs inhibition had no effect on retrieval. Administration of NaB after training reversed the memory deficit at the 7-day test in mice with CREB binding protein mutated on its binding site to CREB, indicating that this site is not necessary for NaB enhancement of NOR memory. Intra-amygdala infusions of the HDACi trichostatin A immediately after training enhanced contextual, but not cued, fear conditioning LTM, indicating that the effect of HDAC inhibition may depend on the memory analysed. This study

indicates that NaB ameliorated aging-related NOR memory impairments and produced an enhancement in memory persistence.

INTRODUÇÃO

A memória

A memória pode ser definida como a capacidade de aprender, armazenar e lembrar-se de informações. Entretanto, sua definição formal não reconhece toda a sua importância para o homem. A memória permite-nos recordar o passado e planejar o futuro, ter gostos e interesses, e nos define como indivíduos.

A memória é constituída por três fases interligadas: aprendizado, consolidação e evocação. O aprendizado é a aquisição de novas informações, a consolidação é o processo pelo qual a memória é armazenada e a evocação consiste na recordação da memória. Após o aprendizado, a memória é inicialmente suscetível a modulações e manipulações farmacológicas. Conforme passa o tempo, ela torna-se mais estável e resistente a intervenções. Decorrente destas características, essa fase foi denominada de consolidação. Seu período mais lábil é amplamente estudado para a compreensão dos mecanismos envolvidos e possíveis alvos terapêuticos.

Em relação ao tempo de armazenamento, divide-se a memória em: de curta duração (STM) - com duração de até algumas horas - e de longa duração (LTM) - que pode durar de horas a anos. A facilitação por serotonina (5-HT) e a potenciação hipocampal (dois modelos de plasticidade sináptica considerados modelos de memória) também se dividem temporalmente: a facilitação de curta e

longa duração (STF e LTF, respectivamente), e a potenciação de longa duração precoce e tardia (e-LTP e I-LTP, respectivamente).

A memória de longa duração pode ser classificada em dois subtipos: explícita ou declarativa e implícita ou não declarativa. A primeira corresponde ao que denominamos comumente como “memória” - informações que sabemos que possuímos e às quais temos acesso consciente. A segunda corresponde a informações às quais o acesso consciente é difícil. De acordo com seu conteúdo emocional, classificam-se as memórias em aversivas, neutras e positivas.

Os processos moleculares envolvidos na plasticidade sináptica e na memória apresentam grande complexidade. Apesar disto, alguns mecanismos são evolutivamente conservados entre espécies (*Aplysia*, *Drosophila*, camundongos e ratos) e entre os modelos de plasticidade sináptica citados acima.

A classificação temporal da memória e da plasticidade sináptica reflete o envolvimento de diferentes mecanismos. STM, STF e e-LTP dependem de proteínas previamente traduzidas, as quais envolvem modificações pós-traducionais (PTM) e/ou realocação de proteínas, mas não transcrição gênica e tradução. A formação da LTM, da LTF e da I-LTP requer diversos passos que culminam na expressão gênica e na síntese de proteínas (KANDEL, 2001) (Figura 1). Um fator de transcrição importante durante a consolidação é CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP) (ALBERINI, 2009).

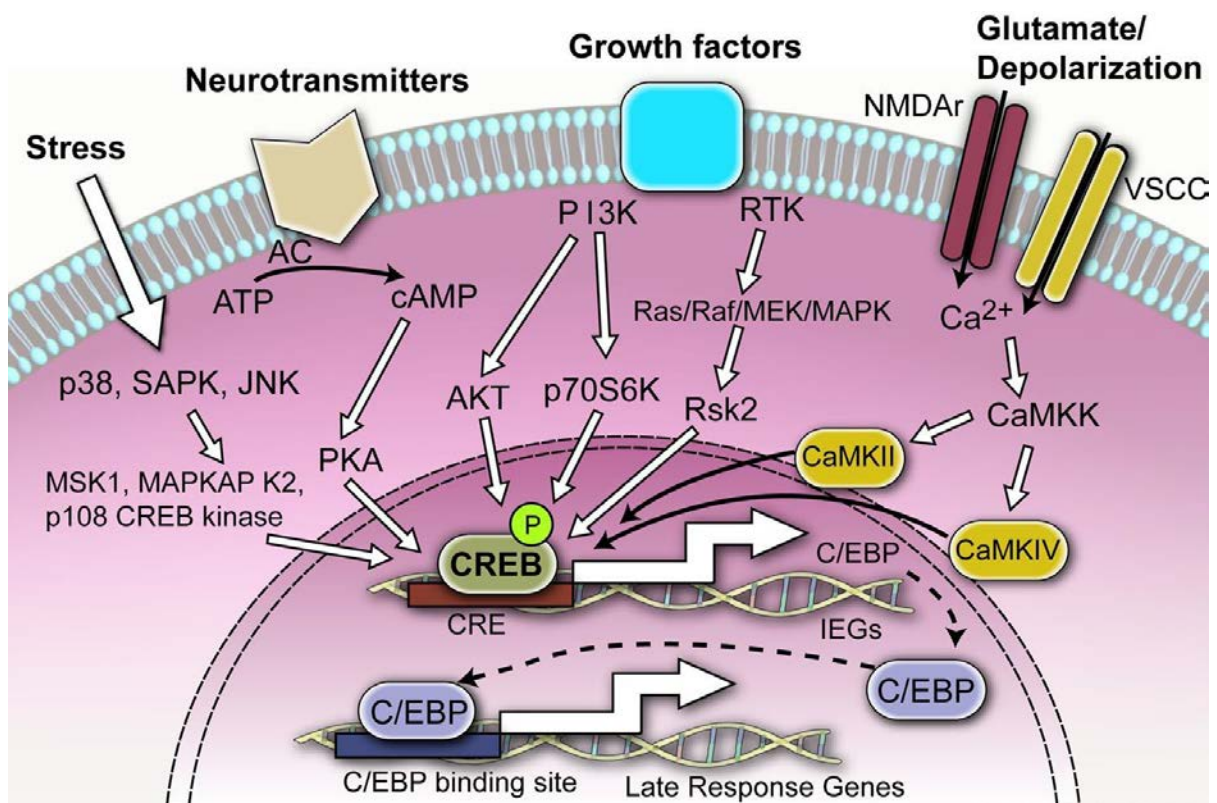


Figura 1: Representação esquemática de diferentes vias de sinalização que ativam a transcrição durante a consolidação da memória. Reproduzido de: ALBERINI (2009).

A transcrição, cuja elucidação depende da melhor compreensão dos mecanismos que a influenciam e a coordenam, é um processo-chave na formação da plasticidade sináptica e da memória de longa duração. A cromatina é uma estrutura dinâmica com influência em praticamente todos os processos metabólicos relacionados ao DNA, incluindo transcrição, recombinação, reparo, replicação e formação do centrômero [para revisões ver LI *et al.*, (2007) e

HENIKOFF (2008)]. As modificações na estrutura da cromatina têm um papel central na transcrição e seu estudo auxiliará nosso conhecimento sobre plasticidade sináptica e memória.

A cromatina

A cromatina apresenta diversos mecanismos interdependentes envolvidos na modificação da sua estrutura: metilação de DNA, modificações pós-traducionais de histonas, reorganização através de complexos de remodelamento, inserção de variantes de histonas e modulação por RNAs não codificadores (Figura 2).

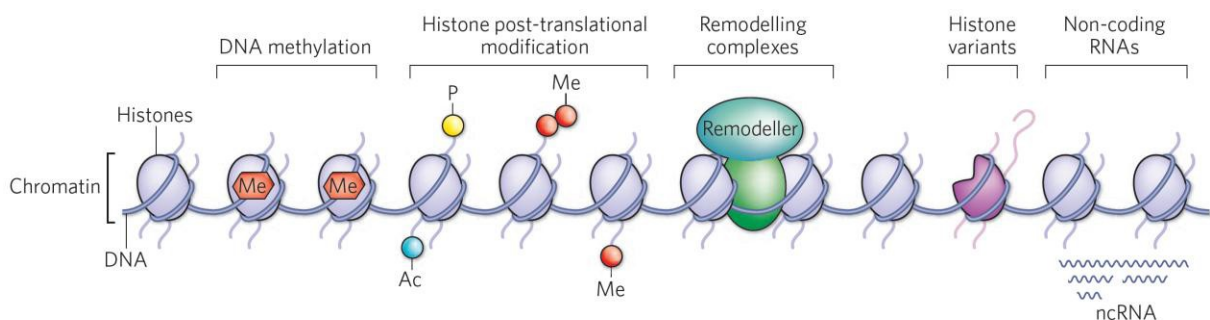


Figura 2: Cinco mecanismos interligados envolvidos na modificação da estrutura da cromatina. Ac: acetilação, Me: metilação e P: fosforilação. Reproduzido de: DULAC (2010).

Diferentes dinâmicas estão envolvidas na modulação da cromatina através da regulação do nucleossomo. A compreensão da estrutura do nucleossomo é

fundamental para o entendimento do papel da cromatina na expressão gênica. As histonas são proteínas básicas com um domínio globular e uma “cauda” N-terminal que interage com o DNA. O centro do nucleossomo consiste das histonas 2A (H2A), 2B (H2B), 3 (H3) e 4 (H4). Sobre o octâmero formado de quatro pares de histonas (dois H2A-H2B e dois H3-H4), o DNA enrola-se 1,65 vezes. Essa interação DNA-nucleossomo é mantida por 14 pontos de contato, sendo uma das mais fortes interações DNA-proteína encontrada em condições fisiológicas (LUGER *et al.*, 1997). A maior compactação entre os nucleossomos é auxiliada pela histona H1.

Especial atenção tem sido dada às diferentes PTMs em histonas. Segundo a teoria do código das histonas, padrões de modificações em histonas, principalmente nas suas caudas N-terminais (Figura 3), serviriam como marcadores de padrões de expressão gênica. Esse controle seria exercido por influência física dessas modificações na estrutura da cromatina e/ou por ligações de proteínas que alterariam a estrutura local da cromatina (JENUWEIN & ALLIS, 2001; TURNER, 2002).

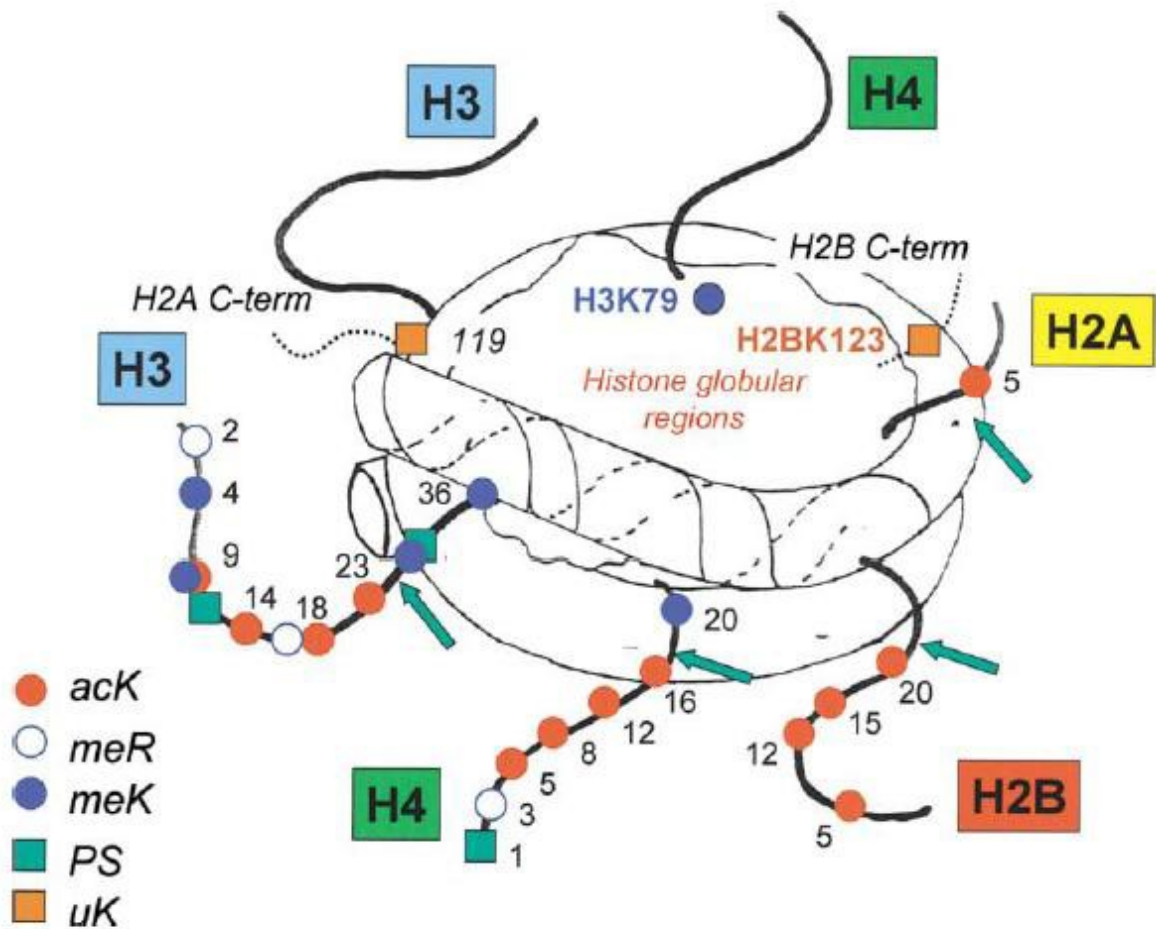


Figura 3: Desenho esquemático do nucleossomo, enfatizando algumas das suas possíveis modificações pós-traducionais nas caudas N-terminais. acK: acetil lisina; meR: metil arginina; meK: metil lisina; PS: fosfo serina e uK: lisina ubiquitinizada. Reproduzido de: TURNER (2002).

Diversas PTMs podem ocorrer em histonas, entre as mais estudadas estão: acetilação, metilação e fosforilação. Para serem capazes de sinalizar estados de transcrição gênica é necessário que essas modificações sejam adicionadas, reconhecidas e removidas (Figura 4). A adição é feita por

“escritores” (“writers”): a acetilação é catalisada por acetiltransferases de histonas (HATs); a metilação, por histonas metiltransferases (HMTs) e a fosforilação, por quinases. O reconhecimento é feito por “leitores” (“readers”), proteínas que possuem domínios de ligação a resíduos de aminoácidos modificados. A remoção é feita por “apagadores” (“erasers”): histonas desacetilases (HDACs) retiram a acetilação; demetilases de histonas (DMTs), a metilação e fosfatases, a fosforilação. Além disso, as lisinas podem ser mono, di ou trimetiladas e as argininas podem ser mono ou dimetiladas. As PTMs interagem com proteínas responsáveis pela metilação do DNA, a qual é catalisada por DNA metiltransferases (DNMTs) em citosinas e considerada mais estável do que as PTMs em histonas.

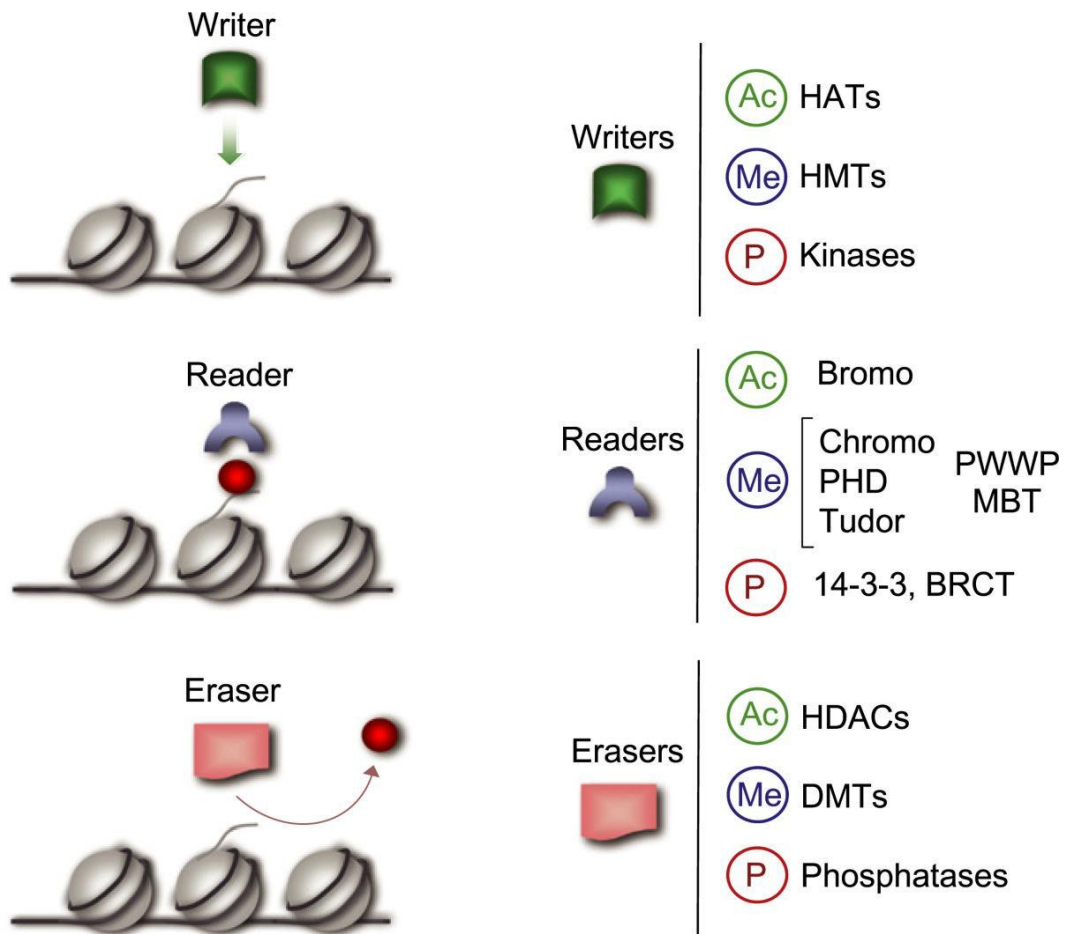


Fig 4: Diferentes classes de proteínas envolvidas na modificação da cromatina. “Writers” são as enzimas HATs, HMTs e quinases que adicionam a acetilação, a metilação e a fosforilação, respectivamente. “Readers” são as proteínas que reconhecem essas modificações. “Erasers” são as enzimas HDACs, DMTS e fosfatases que removem a acetilação, a metilação e a fosforilação, respectivamente. Reproduzido de: BORRELLI *et al.* (2008).

As acetiltransferases de histonas e as histonas desacetilases

A acetilação de histonas é a modificação pós-traducional mais estudada e tem consequências funcionais na cromatina, tanto na sua estrutura física como na sua ligação a proteínas [para uma revisão ver BARRETT & WOOD (2008)]. Essa reação neutraliza a carga positiva das lisinas, diminuindo a força de interação da histona com o DNA e, assim, permitindo a expressão gênica (Figura 5). Uma importante característica da acetilação é a sua associação frequente à transcrição ativa, diferentemente de outras modificações, que sofrem maior influência do resíduo de aminoácido individual alterado na histona e/ou da sua posição ao longo do gene (LI *et al.*, 2007).

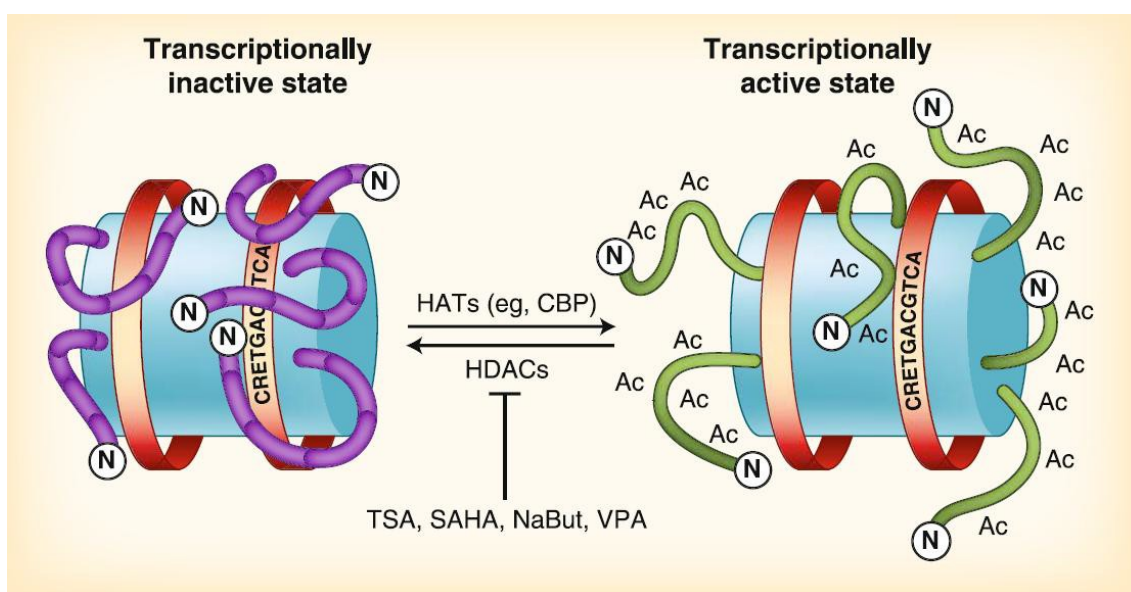


Figura 5: Reação reversível de acetilação controlada por HATs e HDACs. Manipulação farmacológica por inibidores de HDACs. Reproduzido de: MCQUOWN & WOOD (2010).

As HATs são classificadas em cinco famílias: GNAT, p300/CBP (proteína de ligação a *CREB*), MYST, HATs relacionadas a fatores de transcrição e HATs associadas ao receptor nuclear (SELVI *et al.*, 2010) (Tabela 1).

HAT families.

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

Tabela 1: Famílias de HATs, seus membros representativos e os resíduos de aminoácidos modificados. Reproduzido de: SELVI *et al.* (2010).

As histonas desacetilases são classificadas conforme sua homologia com leveduras. Em mamíferos, são conhecidas 18 HDACs separadas em três classes (Figura 6). A classe I consiste das HDACs 1-3 e 8, localizadas principalmente no núcleo e homólogas à Rpd3 de levedura. A classe II é dividida em IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9) e IIb (HDACs 6 e 10), apresenta homologia com HDA1 de levedura e sua

localização é nuclear e citosólica. A classe III são as sirtuínas (SIRT) 1-7, que apresentam homologia com SIR2 de levedura. A HDAC 11, por similitude às classes I e II, foi categorizada como classe IV. As classes I, II e IV são dependentes de zinco, enquanto a classe III é dependente de NAD⁺. Com exceção da HDAC6 (que possui dois domínios catalíticos funcionais), as proteínas das classes I e II apresentam um domínio catalítico funcional e precisam de dimerização, o que sugere a necessidade de dois domínios de desacetilação para sua ação.

A desregulação da atividade de HATs ou HDACs está associada a muitas patologias, incluindo câncer, doenças autoimunes, epilepsia e doenças psiquiátricas. A diminuição da acetilação está associada a muitos distúrbios neurodegenerativos, indicando possíveis efeitos benéficos decorrentes de tratamentos farmacológicos que aumentem a atividade das HATs e/ou diminuam a ação das HDACs (MARTIN & SUN, 2004; FISCHER *et al.*, 2010). As HATs e as HDACs necessitam de fatores de transcrição para associação ao DNA.

É importante ressaltar que os nomes histonas acetiltransferases e histonas desacetilases denotam que essas enzimas são específicas para histonas. Entretanto, é grande o número de evidências apontando a acetilação como PTM ubiquitária (BUCHWALD *et al.*, 2009; SPANGE *et al.*, 2009).

Os inibidores de histonas desacetilases

Os inibidores de histonas desacetilases (HDACis) surgiram como possíveis fármacos antitumorais, pois apresentam um amplo espectro de efeitos: antineoplásico, anti-inflamatório e neuroprotetor [para revisões ver ABEL & ZUKIN (2008) e CHUANG *et al.* (2009)]. Contudo, a maioria dos fármacos estudada é inespecífica (Figura 6) e o número de compostos tem crescido bastante devido ao grande interesse na busca de moléculas mais seletivas e específicas.

As HDACis apresentam ampla variedade estrutural, podendo ser hidroxamatos, peptídeos cíclicos, ácidos alifáticos, benzamidas e cetonas eletrofílicas. Assim como a variedade estrutural, há grande diversidade na sua potência. O butirato sódico (NaB), o fenil butirato e o ácido valproico (VPA) fazem parte da classe dos ácidos alifáticos e apresentam menor potência, sendo necessárias concentrações milimolares para inibição das enzimas. De maior potência, os hidroxamatos tricostatina A (TSA) e o ácido suberoilânilide hidroxâmico (SAHA ou vorinostat) necessitam concentrações nanomolares para inibição enzimática.

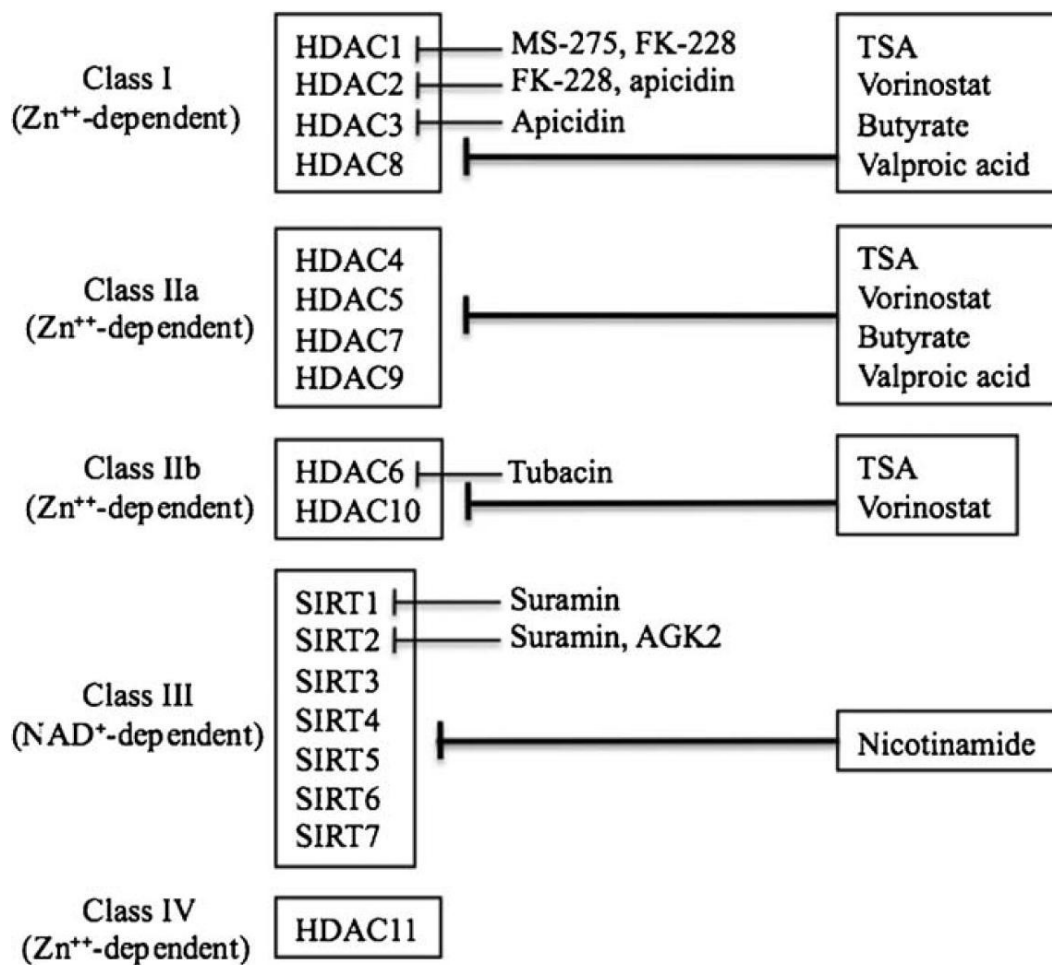


Figura 6: Classes de HDACs e alguns dos seus inibidores seletivos e inespecíficos. Reproduzido de: CHUANG *et al.* (2009).

As PTMs de histonas em células neuronais

As culturas de neurônios do corpo estriado aumentaram a fosforilação da histona H3 serina 10 (H3S10) 30 minutos após a estimulação com glutamato, ao passo que a acetilação da histona H3 lisina 14 (H3K14) não sofreu alteração (BRAMI-CHERRIER *et al.*, 2007). Utilizando um anticorpo que reconhece ambas

as modificações, houve aumento do reconhecimento após aplicação de glutamato, indicando que a fosforilação ocorra em histonas já acetiladas. A fosforilação de ERK (proteína quinase regulada por sinal extracelular) e de p38 MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) aumentou após estimulação com glutamato. O tratamento concomitante por glutamato e pelo inibidor da quinase que fosforila ERK (UO126) ou pelo inibidor de p38 MAPK (SB203580) reverteu o aumento da fosforilação de H3.

A MSK1 (proteína quinase 1 ativada por mitógeno e estresse) pode ser fosforilada por ERK ou por p38 MAPK e o tratamento com glutamato aumentou sua fosforilação. Células do corpo estriado com MSK1 deletada não apresentaram aumento da fosforilação de H3 após utilização de glutamato. A expressão do gene de ativação imediata (IEG) *c-jun* aumentou após exposição ao neurotransmissor e foi revertida pelo co-tratamento com inibidores inespecíficos de MSK1. Após estimulação, a fosforilação de H3S10 aumentou - mas não a acetilação de H3K14 - na região promotora de *c-jun*, indicando que o aumento da primeira, mas não da segunda, é necessário para a transcrição nas condições acima.

A manipulação farmacológica e genética evidenciou que a indução da fosforilação de H3S10 por haloperidol nos neurônios espinais médios é independente de ERK/MSK1 (BERTRAN-GONZALEZ *et al.*, 2009). É importante ressaltar que o haloperidol aumenta a fosforilação na população de neurônios do corpo estriado com expressão do receptor dopaminérgico do subtipo D₂ (DRD2), mas não do D₁ (DRD1); existindo, assim, a possibilidade de a sinalização

independente de ERK/MSK1 ser um mecanismo específico desse tipo celular e/ou do haloperidol.

A despolarização por KCl aumenta a acetilação total de H2B (anticorpo reconhecendo acetilação de K5, 12, 15 e 20) na região CA1 do hipocampo (MAHARANA *et al.*, 2010). O aumento de acetilação foi revertido pelo co-tratamento de KCl com qualquer um dos seguintes inibidores: KN-93 [inibidor de CaMK (proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina)], UO126 (inibidor de ERK) e 5-AZA (inibidor de DNMTs).

As PTMs de histonas em estímulos estressantes

Os processos envolvidos nas PTMs da cromatina foram investigados através do aprendizado de nado forçado. Houve intensificação da fosforilação de H3S10 no giro dentado de ratos oito e 24 horas após o nado forçado (BILANG-BLEUEL *et al.*, 2005). Em camundongos, a fosforilação de H3S10 estava elevada um dia após as sessões de nado forçado ou de exposição a predador. Contudo, houve diminuição 24 horas após o exercício físico voluntário. O incremento da fosforilação ocorreu somente em células positivas para NeuN (marcador nuclear neuronal) e foi revertido pelos antagonistas (RU 38486 ou ORG 34517) do receptor de glicocorticoides (GR). Esse estudo foi um dos primeiros a mostrar a influência do GR na fosforilação de histonas *in vivo*. A exposição à novidade induz o aumento da acetilação de H3 no hipocampo (CHANDRAMOHAN *et al.*, 2007).

No período de 15 minutos a 4 horas após o nado forçado, houve elevação da fosforilação de H3S10 e da acetilação de H3K14 (anticorpo reconhecendo ambas as modificações) no hipocampo de ratos (CHANDRAMOHAN *et al.*, 2008). O aumento da fosforilação e da acetilação no hipocampo induzido por nado forçado foi evitado pela inibição do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAr) ou de MEK através da injeção ip de MK-801 ou SL-327, respectivamente. Os camundongos *knockout* para MSK 1 e 2 não apresentaram aumento das duas PTMs após nado forçado, entretanto, os níveis basais dessas modificações estavam diminuídos. Esses resultados indicam que as PTMs associadas ao nado forçado necessitam do NMDAr, da ERK e da MSK.

No período de duas horas após nado forçado ou exposição à novidade, a fosforilação de H3S10 e a acetilação de H3K14 (anticorpo reconhecendo ambas as modificações) aumentou no giro dentado de ratos (COLLINS *et al.*, 2009). O exercício físico voluntário durante quatro semanas anteriores à exposição aos eventos estressantes incrementou as referidas PTMs no giro dentado, mas não no núcleo accumbens, 2 horas após as sessões. A modalidade de exercício descrita acima influenciou positivamente a resposta comportamental aos dois modelos, contudo, não houve diferenças entre os grupos (com e sem exercício prévio) nos níveis basais das modificações.

A acetilação de histonas na plasticidade sináptica e memória

GUAN *et al.* (2002) demonstraram que diferentes sinais de plasticidade sináptica de longa duração integram-se na cromatina em *Aplysia*. Em neurônios sensoriais, a aplicação concomitante em dois conjuntos diferentes de sinapses de sinais excitatórios (5-HT) e inibitórios (FRMRa) suficientes para formação da LTF e da LTD, respectivamente, resultou no bloqueio da LTF e na formação da LTD. A imunoprecipitação da cromatina (ChIP) mostrou que a aplicação isolada de 5-HT induziu a expressão da IEG C/EBP (proteína ligante ao amplificador CCAAT) através do recrutamento de CREB1 e CBP para a região promotora do gene, ocasionando o aumento da acetilação de histonas.

Por sua vez, a administração exclusiva de FRMRa reprimiu a expressão de C/EBP através do recrutamento de CREB2 e de HDAC5 para a região promotora, onde ocorreu redução da acetilação. A co-aplicação de TSA e de 5-HT (que normalmente não induz a LTF) resultou em LTF, e o uso concomitante de TSA e de FRMRa (suficiente para a formação de LTD) reverteu a LTD. Na indução da plasticidade sináptica de longa duração, a integração de sinais antagônicos ocorreu no núcleo com o envolvimento da regulação bidirecional da acetilação da cromatina e de HATs/HDACs.

Analisando as vias de sinalização que afetam as PTMs em histonas, CROSIO *et al.* (2003) verificaram que a injeção ip de SKF82958 (agonista do receptor dopaminérgico), de pilocarpina (agonista do receptor colinérgico muscarínico) e do ácido caínico (agonista glutamatérgico) resultou no aumento

dose-dependente da fosforilação de H3S10 no hipocampo dorsal de camundongos. A cinética temporal mostrou elevação da fosforilação aos 15 minutos, com pico em 1 hora e retorno à linha basal 3 horas após a injeção. Os neurônios com aumento da fosforilação de H3S10 apresentaram - com alta correlação – intensificação da fosforilação de ERK, indicando uma possível relação entre a via de sinalização das MAPK e a fosforilação de histonas. Utilizando CHIP, os autores demonstraram correlação entre a fosforilação de H3P10 e o aumento da expressão dos IEGs *c-fos* e *MKP-1*.

Um dos primeiros trabalhos a mostrar a influência dos mecanismos de modificação da cromatina na formação da memória foi realizado por LEVENSON *et al.* (2004). Os pesquisadores encontraram incremento da acetilação de H3K14, mas não de H4 (anticorpo reconhecendo a acetilação das lisinas 5, 8, 12 e 16), no hipocampo após o condicionamento aversivo ao contexto (CoFC) e a inibição da cascata de sinalização da ERK bloqueou o referido aumento. A inibição latente, outro aprendizado dependente do hipocampo, mostrou magnificação na acetilação de H4, mas não de H3, indicando que a acetilação diferencial de histonas possa estar envolvida na consolidação de diferentes memórias. No tempo de uma hora antes do treino, a injeção ip de NaB melhorou a LTM, mas não a STM de CoFC.

No estudo acima, a ativação farmacológica da proteína quinase C (PKC) ou da proteína quinase A (PKA) em fatias hipocâmpais levou ao aumento da acetilação de H3, mas não de H4, que foi revertido pelo co-tratamento com

inibidores de MEK. Foram feitos controles para demonstrar a ausência de efeitos inespecíficos do NaB.

CHWANG *et al.* (2006) enfocaram a via de sinalização de ERK nas PTMs da cromatina na memória. O tratamento de fatias hipocâmpais com foscolina (ativador de adenilato ciclase - que gera cAMP - e, portanto, ativa a PKA) ou com PDA (phorbol 12,13-diacetato - ativador da PKC) aumentou a fosforilação de H3S10, a acetilação de H3K14 e a ocorrência simultânea das duas marcas. Contudo, o co-tratamento com UO126 reverteu esses incrementos, indicando que ERK regula a acetilação e a fosforilação de histonas *in vitro*. O aumento de ERK fosforilada no hipocampo ocorreu uma hora após o CoFC em ratos, o mesmo tempo requerido para a intensificação das PTMs de histonas analisadas. A injeção ip de MK-801 ou SL-327 previniu a elevação da fosforilação de ERK e das PTMs de histonas. Esse estudo demonstrou o envolvimento de ERK na acetilação e na fosforilação de histonas durante a consolidação.

Em 2007, CHWANG *et al.* evidenciaram a necessidade de MSK1 na regulação da cromatina durante a formação da memória. Na região CA1, a reconsolidação da memória de CoFC induziu a fosforilação e a acetilação de H3 dependentes de I κ B quinase α (IKK α) e específicas para a re-exposição ao mesmo contexto do treino (LUBIN & SWEATT, 2007). Tais achados evidenciaram o envolvimento de IKK α e das PTMs de histonas na reconsolidação da memória aversiva.

VECSEY *et al.* (2007) avaliaram os mecanismos pelos quais HDACis melhoram a memória e a plasticidade sináptica. A infusão intra-hipocâmpal de

TSA no pós-treino imediato melhorou a LTM de CoFC, mas não do condicionamento aversivo ao indício sonoro (CuFC) - tarefa que não necessita do hipocampo. A infusão intra-hipocampal de TSA em animais *naive* aumentou a acetilação de H3 e H4 no hipocampo em duas e quatro horas após a administração, mas não em 24 horas. Para verificar o possível efeito de TSA na fosforilação de CREB, animais foram treinados na tarefa de CoFC antes da infusão intra-hipocampal do fármaco ou de veículo. Verificou-se que não houve diferença na fosforilação de CREB entre os grupos em meia, duas e quatro horas pós-treino.

Os autores acima utilizaram um protocolo de indução exclusiva de e-LTP (independente de transcrição, tradução ou PKA), o que permite usar inibidores farmacológicos ou modelos genéticos e, assim, discernir o efeito da melhora na potenciação por TSA dos mecanismos necessários à manutenção da e-LTP. O grupo veículo apresentou rápido retorno à linha basal, enquanto o grupo submetido ao tratamento com TSA manteve a sua potenciação quando analisada em até 120 minutos. O co-tratamento das fatias hipocampais com o inibidor da transcrição actinomicina D (ActD) reverteu o incremento na potenciação.

Para avaliar a necessidade de CREB na melhora da memória pelo HDACi, animais *knockout* para as isoformas alfa e delta de CREB e animais selvagens receberam infusão intra-hipocampal de TSA imediatamente após o treino de CoFC. Os resultados mostraram que o fármaco melhorou a LTM nos animais selvagens, mas não nos *knockout*. Corroborando esses dados, TSA não

magnificou a potenciação nas fatias dos animais *knockout*, mas sim dos selvagens.

A fosforilação na serina 133 do domínio KID (domínio induzido por quinase) de CREB induziu sua ligação à CBP através do domínio KIX. Animais homozigotos para a tripla mutação em resíduos de aminoácidos conservados no domínio KIX (camundongos $CBP^{KIX/KIX}$) não apresentaram ligação de CREB à CBP, prejudicando, assim, a acetilação de histonas e a expressão gênica (Figura 7). A TSA não melhorou a potenciação de animais $CBP^{KIX/KIX}$, indicando que esse domínio seja necessário para a melhora da memória pelo fármaco. O trabalho de VECSEY *et al.* (2007) sugere que o incremento da LTP e da LTM por TSA seja dependente de CREB e da sua interação com CBP.

FEDERMAN *et al.* (2009) estudaram a dinâmica temporal da acetilação de histonas durante a consolidação. A administração sistêmica de NaB imediatamente e em seis horas pós-treino, mas não em três ou 12 horas, melhorou a memória de sinal-contexto (CSM) no caranguejo *Chasmagnathus*. Os animais foram treinados utilizando um protocolo que não induz a LTM (treino fraco). Entretanto, associando o treino fraco à injeção de NaB, foi observada a LTM. A injeção sistêmica de NaB aumentou a acetilação no gânglio cerebral de H3K9 e K14 (anticorpo reconhecendo ambas modificações) aos 15 e 30 minutos após o uso, mas não em uma hora. Os animais submetidos ao treino fraco não apresentaram aumento da acetilação de H3 no gânglio cerebral imediatamente, em uma, seis e 24 horas após aquisição. Entretanto, quando expostos ao treino que gera LTM (treino forte) e testados nos mesmos tempos acima, houve

aumento da acetilação de H3 no tempo de uma hora após o aprendizado. O período de tempo para a ocorrência de incremento da acetilação de H3 após o treino forte foi o mesmo para o aparecimento da alteração depois do treino fraco associado à injeção de NaB. Esses achados indicam que a acetilação de histonas ocorre unicamente se o aprendizado for capaz de gerar a LTM.

GUAN *et al.* (2009) investigaram as histonas desacetilases envolvidas no aprimoramento da memória e na reversão de déficits cognitivos em modelos de neurodegeneração. Para tanto, utilizaram camundongos superexpressando HDAC1 ou HDAC2 em neurônios e camundongos com HDAC2 deletada: o aumento de HDAC2, mas não de HDAC1, prejudicou a LTM de CoFC e CuFC, mas não afetou a STM. O déficit na memória de labirinto aquático de Morris (MWM) foi observado nos animais superexpressando HDAC2, mas não naqueles superexpressando HDAC1. A deleção de HDAC2 melhorou a LTM de CoFC e de CuFC, e a STM de CoFC, mas não a STM de CuFC.

Os camundongos superexpressando HDAC2, mas não HDAC1, mostraram diminuição no número de sinapses na região CA1, enquanto animais *knockout* de HDAC2 apresentaram aumento. Na mesma região, a superexpressão de HDAC1 ou 2 ocasionou a redução da acetilação total de H3 e animais superexpressando HDAC2 tiveram também prejuízo na acetilação de H4K12. Nos animais *knockout* de HDAC2, identificou-se hiperacetilação de H4K5, H4K12 e H2B. A potenciação (avaliada em até 90 min pós-indução) foi observada em animais *knockout* para HDAC2 utilizando o protocolo não-indutor de I-LTP e animais superexpressando

HDAC2 tiveram um rápido retorno à linha basal no protocolo que normalmente origina I-LTP.

Em busca do mecanismo pelo qual HDAC2 melhora a memória, os autores acima estudaram as regiões promotoras de 24 genes envolvidos na sinaptogênese e na plasticidade sináptica. Com raras exceções, HDAC2, mas não HDAC1, estava associada às regiões promotoras desses genes. Analisando as regiões promotoras de um subgrupo desses genes, verificaram aumento da acetilação total de H3 e H4 em animais *knockout* para HDAC2, diminuição em animais superexpressando HDAC2 e ausência de alterações nos animais superexpressando HDAC1. Os animais com HDAC2 alterada, superexpressando e *knockout*, apresentaram diminuição e aumento, respectivamente, de determinadas proteínas envolvidas na plasticidade sináptica. Observou-se a associação à HDAC2 - mas não à HDAC1 - do co-repressor chave CoREST, que atua na expressão de genes neuronais, atraindo a maquinaria responsável pelo silenciamento de um intervalo cromossômico.

A administração ip de SAHA durante 10 dias reverteu o prejuízo comportamental de CoFC e a redução do número de sinapses na região CA1 em animais super expressando HDAC2, mas não teve efeito em animais *knockout* para HDAC2. Um inibidor seletivo de HDAC6 não teve efeito na memória de CoFC. Os resultados de GUAN *et al.* (2009) sugerem que HDAC2 se liga à região promotora de genes envolvidos na sinaptogênese e na plasticidade sináptica e regula esses processos através da redução da acetilação de histonas na região

promotora e, conseqüentemente, da diminuição da quantidade proteica desses genes.

O condicionamento aversivo ao alimento induziu o aumento da acetilação total de H3 em um único neurônio envolvido nesse modelo no molusco *Helix locurum* (DANILOVA *et al.*, 2010). Em experimento similar, o tratamento com o inibidor de MEK (PD 98059) evitou o incremento da acetilação.

Estudo de ROOZENDAAL *et al.* (2010) revelou a influência do GR na acetilação de histonas após os aprendizados descritos abaixo. A administração sistêmica de corticosterona em seguida ao treino de reconhecimento de objeto novo (NOR) ou à aquisição da tarefa de localização do objeto (OLT) melhorou a LTM das duas tarefas e aumentou a acetilação de H3K14 no hipocampo e no córtex insular em uma hora após o treino. A infusão de NaB no hipocampo (mas não no córtex insular) após o treinamento melhorou a memória de NOR, enquanto o oposto foi observado para OLT. A aplicação de NaB ou de corticosterona conjugada com albumina no córtex insular (com a finalidade de não permitir a passagem pela membrana plásmática e, assim, investigar os receptores extracelulares) melhorou a LTM de NOR, sendo tal efeito revertido em casos de tratamento concomitante pelo inibidor de GR (RU 38486) ou pelo inibidor da PKA (peptídeo inibitório). O uso por via sistêmica de glicocorticoide imediatamente após o treino de animais CBP^{KIX/KIX} melhorou a LTM de NOR, mas não da OLT.

Esses experimentos mostraram uma dupla dissociação entre o hipocampo e o córtex insular nas tarefas acima mencionadas e indicaram a modulação pelo GR na memória de NOR e da OLT envolvendo acetilação da cromatina.

Os modelos genéticos de HATs ou HDACs alteradas

Diversos estudos enfocaram o envolvimento de CBP na memória e no aprendizado. Existem dois fortes motivos para isso: a associação de CBP à CREB - um fator de transcrição associado à memória – e o fato de mutações em CBP causarem a síndrome de Rubinstein–Taybi, na qual os pacientes apresentam déficits cognitivos (PETRIJ *et al.*, 1995).

Devido ao fato de animais *knockout* para CBP morrerem durante a embriogênese (OIKE *et al.*, 1999), os primeiros trabalhos utilizaram camundongos heterozigotos para a deleção de CBP. Esses animais apresentaram a LTM de NOR prejudicada e a STM inalterada (BOURTCHOULADZE *et al.*, 2003). O déficit da LTM foi revertido por administração pré-treino de inibidores da fosfodiesterase tipo 4 (PDE4), HT 0712 ou Rolipram.

Os estudos de Alarcón e Korzus (ALARCÓN *et al.*, 2004; KORZUS *et al.*, 2004) obtiveram resultados parecidos ao avaliar animais com a atividade de CBP alterada. Em experimentos com animais heterozigotos para a deleção de CBP, foi encontrado déficit na LTM, mas não na STM, de NOR e CoFC (ALARCÓN *et al.*, 2004). A memória espacial avaliada no MWM não estava afetada. Os animais heterozigotos apresentaram a I-LTP prejudicada, que foi restaurada pelo tratamento com rolipram ou SAHA (SAHA também melhorou a I-LTP de animais selvagem). A infusão intra-hipocampal de SAHA 3 horas antes do treino desfez o déficit das tarefas aversivas. Esses animais são um modelo da síndrome de Rubinstein–Taybi. Entretanto, para melhor compreensão da influência de CBP na

memória, é necessário discerni-la do efeito decorrente da sua necessidade durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (CNS).

KORZUS *et al.* (2004) foram os primeiros a estudar a dissociação entre a influência de CBP na memória e sua necessidade na formação do CNS. Animais com mutação no sítio de ligação de CBP à acetil-CoA foram utilizados pelas seguintes razões: a inatividade de HAT e a atuação da mutante como dominante negativo. A expressão do dominante negativo com o promotor da CaMKII era controlada por doxiciclina, permitindo, assim, o controle temporal e espacial da transcrição. Os camundongos com a atividade de CBP prejudicada mostraram déficits na LTM, mas não na STM, de comparação visual pareada (teste para a memória de reconhecimento) e na LTM de MWM. A memória de CoFC e CuFC estava inalterada. A administração sistêmica de TSA antes do treino reverteu o prejuízo na memória de reconhecimento. Esse trabalho indica a necessidade do domínio HAT de CBP para a consolidação de determinadas memórias.

Em trabalho realizado por WOOD *et al.* (2005), foi evidenciado déficit na memória dependente do hipocampo de camundongos expressando CBP dominante negativo (com deleção do sítio da atividade HAT e do domínio KIX) sob o controle do promotor da CaMKII. Os autores verificaram prejuízo na LTM de MWM e de CoFC, mas não na memória de CuFC, que é independente do hipocampo. Foram utilizados três protocolos de potenciação hipocampal e os resultados apontaram para o dano da LTP hipocampal somente no protocolo utilizando o pareamento da estimulação elétrica com o agonista DRD1 para gerar a L-LTP.

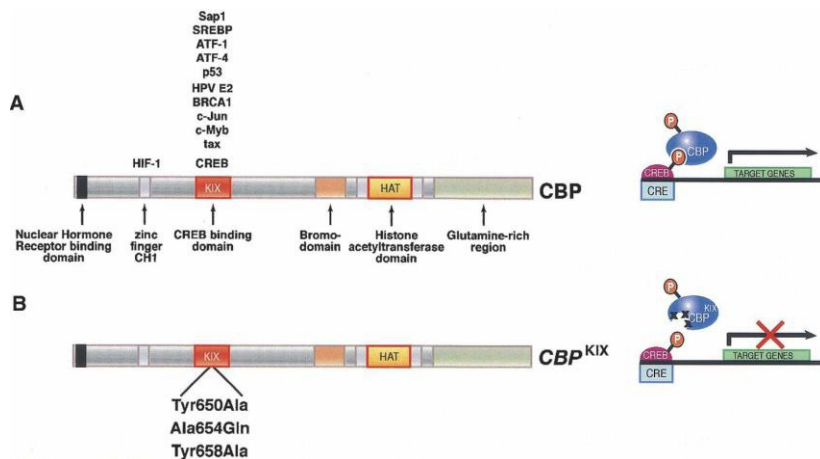


Figura 7: Diagrama esquemático de *CBP* mostrando seus diferentes domínios funcionais. (A) O alelo endógeno de *CBP* gera uma proteína funcional com todos seus domínios intactos, incluindo KIX, o qual se liga à CREB fosforilada na serina 133. (B) O alelo *CBP*^{KIX} gera um produto proteico contendo três mutações pontuais no domínio KIX. Essas mutações bloqueiam de forma específica a interação entre CBP e CREB. Reproduzido de: WOOD *et al.*, (2006a).

Embora CBP e p300 tenham sido consideradas por muito tempo como redundantes, sabe-se agora que existem diferenças funcionais importantes entre as mesmas [para uma revisão ver KALKHOVEN *et al.*, (2004)]. Avaliando o aprendizado motor, algumas distinções foram encontradas entre as HATs acima mencionadas. Os camundongos heterozigotos para a tripla mutação no domínio KIX de CBP apresentaram déficit no aprendizado motor testado no *rotarod*, enquanto animais heterozigotos com a tripla mutação no domínio KIX de p300 não apresentaram dano (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Devido ao fato do domínio KIX interagir com o domínio KID de CREB, os autores analisaram animais com parte

de CREB deletada. Assim, como os animais com KIX mutado de CBP, os animais com a deleção de CREB apresentaram prejuízo no aprendizado motor. Esses foram os primeiros resultados mostrando papéis diferentes de CBP e p300 em testes comportamentais.

Animais CBP^{KIX/KIX} testados por WOOD *et al.* (2006a) apresentaram déficit na LTM de NOR e de CoFc, mas não de CuFC, ao passo que a STM permaneceu inalterada. Os camundongos transgênicos apresentaram prejuízo na expressão hipocampal de mRNAs quatro horas após o treino de CoFC, enquanto a expressão basal esteve alterada em apenas um mRNA.

A deleção do fator associado à p300/CBP (PCAF) - fator de transcrição com atividade intrínseca de HAT - ocasionou déficit em diferentes tipos de memória (MAURICE *et al.*, 2007). Camundongos transgênicos de dois meses de idade apresentaram prejuízo na STM de MWM, enquanto o dano à LTM manifestou-se em animais mais velhos.

O envolvimento de SIRT1 na plasticidade sináptica e na memória foi abordado em dois artigos (GAO *et al.*, 2010; MICHAN *et al.*, 2010). MICHAN *et al.* (2010) verificaram que SIRT1 e NeuN apresentavam a mesma localização em células hipocâmpais. Contudo, não houve co-marcação da proteína glial fibrilar ácida (indicador de células da glia).

Os animais *knockout* para SIRT1 apresentaram a STM de NOR inalterada, não tendo sido testada a LTM. Esses animais mostraram déficit na STM da tarefa de labirinto em Y, na STM e na LTM de CoFC. Os camundongos transgênicos também demonstraram dano na memória de CuFC e do labirinto de Barnes (teste

que avalia a memória espacial). Os animais *knockout* revelaram prejuízo na I-LTP hipocampal, mas não na e-LTP, menor complexidade das árvores dendríticas da região CA1 e alteração na expressão gênica do hipocampo.

Entretanto, animais superexpressando SIRT1 no telencéfalo não evidenciaram melhora na LTP ou na memória. Embora os animais *knockout* utilizados apresentassem alterações devido à perda da desacetilase durante o desenvolvimento, esses resultados indicam o envolvimento de SIRT1 na plasticidade sináptica e memória.

GAO *et al.* (2010) mostraram que SIRT1 regula pós-traducionalmente CREB através de um microRNA (miR). A deleção de SIRT1 restrita ao CNS ocasionou déficit na LTP e na LTM de CoFC, de CuFC, de MWM e de NOR. A quantidade de sinaptofisina (proteína marcadora de terminais pré-sinápticos funcionais) e de espinhas dendríticas estava diminuída no hipocampo nos camundongos transgênicos. Os montantes proteicos de CREB e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) também se encontravam reduzidos. Porém, ao mensurar os mRNAs, apenas o BDNF apresentou diminuição.

Investigando os possíveis mecanismos de controle pós-traducional de CREB, GAO *et al.* (2010) utilizaram CHIP e encontraram que SIRT1 se associou ao fator de transcrição YY1 na região promotora de miR134 e controlou de forma negativa a sua transcrição. Por sua vez, o miR134 regulou negativamente a transcrição de CREB acarretando os déficits acima mencionados. Esse trabalho indica o envolvimento de SIRT1 na sinaptogênese, na plasticidade sináptica e na memória através da regulação negativa de um microRNA cujo alvo é CREB.

A extinção da memória e PTMs em histonas

A extinção da memória depende da expressão gênica, sendo, portanto, possivelmente influenciada por modificações na cromatina. Poucos estudos avaliaram as PTMs na extinção da memória. BREDY *et al.* (2007) estudaram camundongos treinados na tarefa de CuFC e, 24 horas após, expostos a outro contexto com ou sem sessão de extinção. Analisando o córtex pré-frontal duas horas após a sessão, ocorreu aumento da acetilação de H3 (anticorpo reconhecendo acetilação de K9 e 14) nos promotores 1 e 4 do gene *BDNF* no grupo exposto ao contexto sem extinção quando comparado ao grupo *naive*. Além disso, o grupo com extinção apresentou diminuição na acetilação de H3 no promotor 1 e de H4 (anticorpo reconhecendo acetilação de K5, 8, 12 e 16) no promotor 4 quando comparado aos outros grupos. Não houve diferença entre os grupos na acetilação de H4 no promotor 1.

Os animais submetidos à extinção, quando comparados aos grupos *naive* e ao grupo exposto ao contexto sem extinção, apresentaram um aumento do mRNA contendo o exon 1 e o exon 4 de *BDNF*. A injeção sistêmica de HDACis (VPA ou NaB) antes da sessão de extinção parcial melhorou a memória dessa extinção medida sete dias após. A análise no córtex pré-frontal duas horas pós-extinção mostrou que a extinção parcial, quando aliada à administração ip de VPA, incrementou a acetilação de H4 (mas não de H3) nos promotores 1 e 4 de *BDNF*, e que o VPA intensificou de forma exclusiva a expressão do mRNA contendo o exon 4.

Os achados acima mostraram diferentes modificações em promotores únicos do gene *BDNF* após CuFC e na extinção sob efeito de VPA. Em outro trabalho, BREDY & BARAD (2008) avaliaram o efeito de VPA em diferentes fases da memória aversiva. A aplicação ip de VPA pré-treino melhorou a LTM de CuFC em camundongos. Utilizando diferentes protocolos, a injeção de VPA antes da sessão de extinção ou de reconsolidação melhorou a LTM da extinção e da reconsolidação, respectivamente.

No estudo de MALVAEZ *et al.* (2010), o NaB acelerou a extinção da preferência condicionada ao lugar (CPP) induzida por cocaína (MALVAEZ *et al.*, 2010). Os camundongos que receberam administração sistêmica de NaB após as sessões de extinção não confinada (durante as quais os animais podiam movimentar-se livremente pelos compartimentos) passaram menos tempo no contexto previamente pareado com cocaína. O mesmo resultado foi obtido nos camundongos submetidos à extinção confinada (na qual os animais podiam explorar somente o contexto previamente pareado com cocaína). Não houve diferenças quando o NaB foi administrado 10 horas após as sessões de extinção.

Para avaliar o restabelecimento, os animais foram submetidos às sessões de extinção confinada imediatamente após uso do NaB ou do veículo e, posteriormente, receberam injeção de cocaína na dose que, *per se*, não induz o condicionamento. Quando os animais eram recolocados no aparelho de CPP, aqueles que receberam veículo passaram mais tempo no contexto previamente pareado com cocaína. Além disso, o tratamento com o NaB ip aumentou a acetilação de H3K14 no núcleo accumbens meia hora após a sessão de extinção.

Esse artigo indica que a extinção e a inibição do restabelecimento da memória de CPP induzida por cocaína podem ser facilitadas pelo NaB.

A metilação de histonas e a memória

O primeiro trabalho a avaliar a metilação de histonas na memória obteve resultados interessantes (GUPTA *et al.*, 2010). Na região CA1 de ratos, a trimetilação de H3K4 (marca associada à transcrição ativa) estava aumentada no grupo treinado uma hora após a aquisição de CoFC, mas não no grupo *naive* ou no grupo exposto exclusivamente ao contexto. A dimetilação de H3K9 – marca associada à repressão transcricional – estava aumentada nos animais treinados e, surpreendentemente, naqueles sem o estímulo aversivo, mas expostos ao aparelho. A análise 24 horas após o treino não mostrou alterações na trimetilação de H3K4, entretanto, a dimetilação de H3K9 estava diminuída nos ratos treinados ou somente expostos quando comparados com o grupo *naive*.

Os autores verificaram a especificidade na trimetilação de H3K4 através do treino de animais em inibição latente (aprendizado diferente de CoFC, mas com o mesmo choque). A inibição latente não apresentou aumento na trimetilação hipocampal de H3K4 uma hora após o treino. Anteriormente, foram relatadas diferenças na acetilação hipocampal entre CoFC e a inibição latente (LEVENSON, 2004).

Para investigar a função da metilação de H3K4 na memória, os autores acima utilizaram animais com metiltransferases deletadas. A EED é uma HMT

inespecífica, enquanto a MLL é uma HMT específica para H3K4. Os camundongos heterozigotos para *Mll*, mas não para *eed*, e animais duplo heterozigotos apresentaram prejuízo na LTM de CoFC mas a LTM de CuFC estava inalterada. Entretanto, esses resultados podem advir de diferenças na intensidade dos treinos: os animais-controle da tarefa de CoFC apresentaram aproximadamente 80% de congelamento no teste, à medida que os animais-controle da tarefa de CuFC manifestaram congelamento de cerca de 30%. Déficits motores também foram observados nesses transgênicos.

A injeção ip de NaB na dose que melhora a LTM de CoFC não alterou a trimetilação de H3K4 na região CA1 uma hora após a aquisição, mas diminuiu a dimetilação de H3K9 ao mesmo nível do grupo *naive*. Analisando a região promotora de IEGs, houve um aumento da trimetilação de H3K4 de *Zif268* e do promotor 1, mas não do 4, de *BDNF*. A metilação no DNA na região promotora de *Zif268* foi detectada 30 minutos após o treino, mesmo momento em que se intensificou a expressão desse gene. Nesse promotor, a trimetilação de H3K4 estava associada à metilação do DNA e ao aumento da sua expressão. Um dia após o aprendizado, a metilação do DNA no promotor de *Zif268* e a expressão desse gene no grupo treinado retornaram aos mesmos níveis do grupo *naive*.

O grupo de exposição única ao contexto apresentou incremento da metilação no promotor de *Zif268* e diminuição da expressão desse gene quando comparado aos outros grupos, indicando que o aumento da metilação do DNA nesse local pode acarretar a regulação bidirecional da transcrição. Avaliando duas ilhas CpG do promotor de *Zif268*, foi observada, em uma das ilhas dos animais

treinados ou somente expostos, a ocorrência simultânea de aumento da trimetilação de H3K9 e de diminuição da interação com a proteína com domínio de ligação à CpG-metilada 2 (MeCP2) . Esse trabalho sugere que a metilação de histonas influencia a consolidação e interage com a metilação do DNA.

Em camundongos superexpressando *Setdb1* (a HMT que catalisa a trimetilação de H3K9), verificou-se que essa se localizava contigualmente ao promotor do gene *Grin2b*, responsável pela subunidade NR2B do NMDAr (JIANG *et al.*, 2010). Essa associação reduziu o nível de mRNA e de proteína dessa subunidade no hipocampo dos camundongos transgênicos, e, assim, alterou as propriedades eletrofisiológicas do NMDAr. Esses animais apresentaram comportamento alterado de ansiedade e depressão, mas, apesar disto, a LTM de esQUIVA inibitória e de CuFC não estava alterada.

Em artigo publicado em 2009, SCHAEFER *et al.* avaliaram a deleção pós-natal de GLP/G9a (HTMs que catalisam a dimetilação de H3K9, marca associada ao silenciamento gênico em regiões eucromáticas). Os camundongos com essas enzimas deletadas apresentaram - em neurônios - a expressão de genes normalmente não transcritos e déficits em tarefas comportamentais, indicando que GLP/G9a está envolvida no silenciamento de genes em neurônios, permitindo, desta forma, a homeostase necessária para a LTM.

O ortólogo de GLP/G9a em *Drosophila*, EHMT, foi foco de outro trabalho (KRAMER *et al.*, 2011). Animais com deleção dessa enzima apresentaram diminuição do número de dendritos e prejuízo na locomoção, na memória de habituação e no condicionamento de corte. CHIP seguida de sequenciamento

revelou diminuição de H3K9me2 nas regiões 1kb a montante do sítio de início da transcrição (TSS) e 1kb a jusante do sítio de poliadenilação de genes importantes para a plasticidade sináptica e a memória. Os autores apontam para essa HMT como chave na regulação desses processos.

A acetilação de histonas em modelos de envelhecimento e a neurodegeneração

O envelhecimento está associado ao prejuízo na memória, mas pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos (BURKE & BARNES, 2006). Estudos associaram o envelhecimento e a neurodegeneração à diminuição da acetilação na cromatina. Dessa forma, HDACis poderiam auxiliar no tratamento da perda de memória (ABEL & ZUKIN, 2008).

FISCHER *et al.* (2007) mostraram que déficits comportamentais podem ser revertidos por NaB em um modelo murino de neurodegeneração. Os autores utilizaram camundongos com o promotor da CaMKII (expressão controlada por tetraciclina e restrita ao telencéfalo, abrangendo regiões importantes para a memória como o hipocampo e o córtex) fusionado ao gene da proteína p25 (associada a doenças neurodegenerativas). A indução do transgene durante seis semanas levou à morte neuronal de grande monta, avaliada imunohistoquimicamente com o marcador neuronal NeuN e com marcadores de plasticidade e de integridade sináptica.

É amplamente aceito que o enriquecimento ambiental (EE) melhora a memória, contudo, os mecanismos de ação são pouco conhecidos. Para avaliar o efeito do EE na neurodegeneração, os autores acima utilizaram camundongos transgênicos de 11 meses de idade com a expressão de p25 induzida por seis semanas. Nas quatro semanas seguintes, os animais permaneciam na sua caixa-moradia ou eram expostos ao ambiente enriquecido. Transcorridas 10 semanas, os animais eram treinados e testados nas tarefas de CoFC e de MWM. Os animais que tiveram p25 induzido e ficaram na caixa-moradia apresentaram extensa morte neuronal, déficit nas duas tarefas e diminuição de marcadores de plasticidade e de integridade sináptica quando comparados ao grupo controle em que p25 não foi induzido. Os animais com p25 induzido e expostos ao EE apresentaram grande morte neuronal. Apesar disto, os déficits comportamentais foram revertidos e os marcadores de plasticidade e de integridade sináptica apresentavam os mesmos níveis do grupo sem indução de p25.

Visando a avaliação da LTM remota, os animais foram treinados quatro semanas antes da indução de p25, à qual se seguiram quatro semanas com ou sem o EE. O grupo sem o EE mostrou o mesmo padrão de resultados do experimento anterior e, surpreendentemente, também o grupo exposto ao EE, indicando que é possível restabelecer o acesso à memória através do EE mesmo depois da neurodegeneração. Animais do grupo selvagem submetidos ao EE mostraram aumento da acetilação de H3 (K9/K14) e de H4 (K5/K8/K12) no hipocampo e aumento da metilação de H3K4 no córtex.

A injeção ip de NaB em animais do grupo selvagem durante quatro semanas aumentou os marcadores de plasticidade e de integridade sináptica e a acetilação de H3K14 e de H4K5 no hipocampo. A administração crônica do HDACi melhorou a memória na tarefa de CoFC e de MWM, entretanto, não intensificou a fosforilação de ERK 1/2 no hipocampo. O tratamento crônico com NaB em animais selvagem pareceu mimetizar o efeito do EE. Utilizando o protocolo de indução do transgene seguida de treino e de administração de NaB, observou-se no grupo do NaB o aumento de marcadores de plasticidade e de integridade sináptica no hipocampo e melhora da memória de CoFC e de MWM quando comparado ao grupo com indução do transgene e administração do veículo, apesar dos animais tratados com NaB apresentarem alta perda neuronal.

O mesmo padrão de resultados acima descritos foi evidenciado quando a indução de p25 por seis semanas ocorreu após o treinamento. A injeção crônica de NaB levou à recuperação do déficit no aprendizado e do acesso à LTM. Esses achados indicam que déficits cognitivos por neurodegeneração podem ser revertidos por HDACis.

A administração ip repetida de NaB sete dias após um modelo de lesão cerebral traumática e antes do treino na tarefa de MWM não melhorou a memória em camundongos (DASH *et al.*, 2009). A utilização de um protocolo de tratamento durante a neurodegeneração (imediatamente após a lesão e durante os quatro dias seguintes) tampouco afetou a memória. Entretanto, 14 dias depois da lesão, a administração de NaB concomitante com as sessões de treino facilitou a

aquisição da tarefa. Durante um teste de prova, os animais que receberam NaB apresentaram melhora na STM, mas não na LTM.

Os camundongos que receberam o tratamento durante o treino de MWM foram posteriormente treinados nas tarefas de CuFC e de CoFC. Ao testar-se a memória de curta e de longa duração, verificou-se que somente a STM de CuFC apresentou incremento. Embora esses resultados sejam diferentes daqueles da maioria dos trabalhos, eles apontam para a melhora da memória por NaB somente quando a administração coincide com o treino.

FONTÁN-LOZANO *et al.* (2008) verificaram a acetilação de histonas durante a consolidação e o efeito de HDACis em dois modelos de neurodegeneração. No hipocampo dos camundongos, a acetilação total de H3 intensificou-se uma hora após o treino de NOR (treino com duração de 15 minutos, condição que gera LTM) e após o último treino de condicionamento clássico de piscar o olho (EBCC). O córtex perirrinal também demonstrou incremento da acetilação de H3 após a aquisição de NOR. O tratamento pré-treino ip com TSA ou NaB melhorou a LTM de EBCC. O treino fraco de NOR (treino com duração de 5 minutos que induz exclusivamente a STM) associado à TSA ou ao NaB pré-treino ip levou à expressão da LTM. O tratamento com HDACis em camundongos que receberam somente habituação não alterou a acetilação hipocampal, mas, nos animais que receberam o treino durante 5 minutos, aumentou a acetilação no hipocampo e no córtex perirrinal aos mesmos níveis dos animais treinados durante 15 minutos.

Consistente com esses achados, a inibição de HDACs elevou os níveis de mRNA de *c-fos* e *BDNF* de animais treinados durante 5 minutos aos mesmos daqueles dos animais treinados durante 15 minutos. Em dois modelos de morte neuronal, um modelo farmacológico induzido por ácido caínico e outro modelo genético induzido por acúmulo proteico, os HDACis pré-treino reverteram os déficits de STM e LTM de NOR. Esse trabalho mostrou que o treinamento de EBCC e de NOR leva ao aumento da acetilação hipocampal e que HDACis revertem o prejuízo na memória induzido por morte neuronal.

PELEG *et al.* (2010b) investigaram a possibilidade de alterações na cromatina e na expressão gênica estarem envolvidas no prejuízo cognitivo associado ao envelhecimento. Em camundongos *naive* com idades de três e 16 meses (sem e com déficit em tarefas comportamentais, respectivamente), os autores observaram que não houve diferença no nível de acetilação em resíduos de aminoácidos de H3 e H4 no hipocampo dorsal. Consistente com esses dados, não existiu disparidade nos níveis de expressão, na quantidade proteica e na atividade enzimática de HATs e HDACs no hipocampo dorsal de animais *naive* nas duas idades. Com o aprendizado da tarefa de CoFC, os níveis hipocampais de acetilação de H3K9, H3K14, H4K5 e H4K8 aumentaram 60 minutos pós-treino e voltaram ao basal 24 horas após em camundongos de três e 16 meses de idade. Esse mesmo padrão temporal ocorreu para H4K12 nos animais de três meses, mas não naqueles de 16 meses.

Os autores fizeram estudos com microarranjos de DNA para avaliar a expressão gênica nas duas idades após o condicionamento aversivo. Após

exclusão dos genes alterados na exposição ao contexto ou na exposição ao choque não pareado ao contexto, encontrou-se que 2229 genes alteraram-se em decorrência do aprendizado nos animais de três meses, enquanto somente seis genes alteraram-se nos camundongos com 16 meses. Consistente com os resultados anteriores de ausência de alterações na acetilação da cromatina no estado basal, apenas 14 genes apresentaram diferença entre os controles de três meses e os de 16 meses.

Para avaliar melhor a relação entre a acetilação de H4K12 e a expressão gênica durante a consolidação, no período de uma hora após o treino de CoFC, os autores empregaram ChIP para essa modificação seguida de sequenciamento. Embora não tenha ocorrido nos animais de três meses, os animais de 16 meses apresentaram diminuição na acetilação de histonas na região 1kb a jusante, mas não a montante, do TSS de genes sabidamente relacionados ao aprendizado. A imunoprecipitação com H3K9 não mostrou diferença na acetilação de histonas no mesmo grupo de genes.

A infusão intra-hipocampal de SAHA uma hora pré-treino reverteu o déficit da memória de CoFC nos camundongos com 16 meses. No hipocampo, o uso de ChIP duas horas após a infusão de SAHA e uma hora pós-treino revelou aumento da acetilação de H4K12 na região transcrita de genes analisados. O efeito na região promotora não foi tão pronunciado. Além disso, a infusão intra-hipocampal de um inibidor específico de HDAC1 não reverteu o déficit de CoFC.

Ensaio de atividade total de HDACs e de HATs não mostraram diferença entre as idades uma hora pós-treino. Entretanto, a expressão de HDAC2, de

HDAC4 e de duas HATs (Myst4 e Gcn512) aumentou somente nos animais de três meses que passaram por CoFC.

Esse trabalho indicou que o prejuízo na acetilação de H4K12 leva à falha na expressão necessária para a LTM nos animais de 16 meses. É importante ressaltar que existe a possibilidade de outras PTMs em histonas estarem envolvidas no déficit cognitivo associado ao envelhecimento (SWEATT, 2010).

A memória e outras proteínas acetiladas

Utilizando um protocolo de aprendizado a novo sabor, a exposição de camundongos por 10 minutos a uma nova comida elevou a acetilação de duas proteínas não identificadas, comprovadamente não histonas, no córtex insular de camundongos (SWANK & SWEATT, 2001). A acetilação da proteína com peso molecular aproximado de 42 kDa (p42) intensificou em uma e duas horas após a exposição, diminuiu e voltou a subir por volta de 12 horas, tendo se mantido elevada por 48 horas. Apresentando uma cinética diferente, a acetilação da proteína com peso molecular aproximado de 55 kDa (p55) incrementou em até 12 horas após a exposição e retornou ao nível basal em 24 horas.

O tratamento de fatias do córtex insular com forskolin (ativador de adenilato ciclase) aumentou a acetilação de p42, mas não de p55. O tratamento simultâneo com forskolin e com o inibidor de MEK (UO126) reverteu o incremento da acetilação de p42 e elevou a acetilação de p55, indicando uma possível regulação bidirecional dessa via de sinalização na acetilação de proteínas não histônicas.

A acetilação de NF- κ B (fator de transcrição nuclear κ B) p65 na amígdala aumentou após *fear-potentiated startle* em ratos (YEH *et al.*, 2004). A atividade de HATs também se elevou após o treino de condicionamento aversivo. TSA intra-amigdalар incrementou a acetilação de NF- κ B e melhorou a LTM de *fear-potentiated startle*.

Outras PTMs em histonas

Outras PTMs na cromatina estão envolvidas na plasticidade sináptica e na memória. A ADP-ribosilação é catalisada por poli(adp-ribose) polimerases (PARPs). No hipocampo e no córtex de camundongos, houve aumento de ADP-ribosilação em proteínas nucleares, incluindo H1, imediatamente após o treino na tarefa de NOR (GOLDBERG *et al.*, 2009). Uma ressalva a esse experimento deve ser feita: os autores avaliaram o grupo treinado versus o *naive*, existindo a possibilidade do aumento da ADP-ribosilação ter sido provocado, assim como a acetilação, pela novidade ou pela ansiedade (BILANG-BLEUEL *et al.*, 2005). A infusão intracerebroventricular (i.c.v) do inibidor de PARP-1, responsável por grande parte da ribosilação no núcleo, prejudicou a LTM de NOR e CoFC, mas não a STM.

Fosfatases, assim como desacetilases, são necessárias para a regulação das PTMs de histonas. A proteína fosfatase 1 (PP1) apresenta-se em grande concentração no núcleo e está associada a modificações na cromatina de células não neuronais. Expressando o domínio inibitório de PP1 com um sinal de

localização nuclear no telencéfalo de camungongos, houve diminuição da interação de PP1 com HDAC1 e com a HMT JMJD2A (KOSHIBU *et al.*, 2009). A imunoprecipitação demonstrou interação entre PP1 e H3 *in vivo*, e correlacionou essa relação aos níveis de fosforilação de H3P10 *in vitro*. No hipocampo de animais mutantes, houve aumento da concentração da fosforilação de H3P10, da acetilação de H3K14, de H4K5 e de H2B, e da trimetilação de H3K36. Ensaios de ChIP mostraram que genes associados à memória apresentavam alterações bidirecionais dessas modificações, as quais correlacionavam-se com sua expressão.

A análise do promotor de CREB no hipocampo de animais selvagem após treino de NOR mostrou elevação da fosforilação de H3S10 e da acetilação de H3K14, mas não da acetilação de H3K9 e de H4K12 ou da trimetilação de H3K36. Os animais com a expressão do domínio inibitório apresentaram o aumento após o treino nos mesmos resíduos de aminoácidos dos animais controle, porém, seus valores basais e pós-treino foram significativamente maiores. Além disso, os animais transgênicos apresentaram incremento pós-treino de H3K36 trimetilada e diminuição de H3K9 e de H4K12 acetiladas. Esse trabalho foi o primeiro a relacionar PP1 à modificação direta e indireta de três PTMs induzidas mediante aprendizado no CNS.

A metilação do DNA na plasticidade sináptica e na memória

O tratamento com inibidores de DNMTs, zebularina ou 5-AZA, prejudicou a LTP hipocampal em camundongos (LEVENSON, 2006). A ativação de PKC através de PDA aumentou a expressão gênica de DNMT3A, mas não de DNMT3B ou de DNMT1. A exposição de fatias hipocampais ao PDA aumentou a acetilação de H3K14, tendo o aumento sido revertido pelo tratamento concomitante de forbol e zebularina ou de forbol e 5-AZA. A acetilação de H4 (K5/8/12/16) não teve alteração em nenhum tratamento. Esse trabalho trouxe evidências do envolvimento de DNMTs na regulação positiva da plasticidade sináptica.

A infusão intra-hipocampal de 5-AZA no pós-treino imediato de CoFC prejudicou a memória testada 24 horas após e previniu o incremento da acetilação hipocampal de H3K14 uma hora depois do aprendizado em ratos, efeitos esses revertidos pela infusão prévia de NaB (MILLER *et al.*, 2008). Corroborando esses resultados, o tratamento com TSA reverteu o prejuízo na potenciação causada por 5-AZA, sugerindo participação da acetilação de histonas no efeito de 5-AZA.

A infusão intra-hipocampal de TSA ou 17 β -estradiol logo após o treino de NOR em camundongos prolongou a retenção da memória em um protocolo no qual se observava a preferência pelo objeto novo em 24 horas, mas não em 48, depois da aquisição (ZHAO *et al.*, 2010). A infusão de TSA três horas pós-treino não teve efeito na LTM de NOR. A aplicação intra-hipocampal de estradiol

aumentou, nessa estrutura, a fosforilação de p42 ERK e a acetilação de H3 (anticorpo reconhecendo K9 e 14 acetiladas), mas não as PTMs de H4. O tratamento simultâneo de estradiol com o inibidor de MEK (ambos i.c.v) previniu a acetilação de H3 e a melhora da memória. Quatro horas após a infusão intra-hipocampal de estradiol, a quantidade proteica de HDAC2, mas não de HDAC1, diminuiu. No hipocampo, a infusão de estradiol intensificou o montante de mRNA de DNMT3A e de DNMT3B (enzimas responsáveis pela metilação de novo), mas não de DNMT1 (responsável pela metilação do DNA durante a replicação). Além disso, a quantidade proteica de DNMT3B elevou-se quatro horas pós-infusão. 5-AZA melhorou a memória quando administrado no hipocampo imediatamente, mas não três horas, após o treino.

A metilação de DNA, por ser uma marca mais estável do que muitas PTMs de histonas, poderia estar envolvida na manutenção da memória (YU *et al.*, 2011). Avaliando a metilação de promotores de genes associados à memória, encontrou-se correlação entre a metilação do DNA e a manutenção da memória em ratos (MILLER *et al.*, 2010). Os animais foram separados em quatro grupos: treinados no CoFC, expostos unicamente ao contexto, expostos ao choque sem associação ao contexto e *naive*. No córtex anterior cingulado e pré-límbico, a metilação nas regiões promotoras de genes relacionados à memória foi testada em uma hora e em um e sete dias após as respectivas sessões comportamentais.

Em relação aos animais *naive*, todos os outros grupos tiveram a metilação do gene *Zif268* diminuída em todos os tempos. A metilação de *Reelin*, envolvido na regulação positiva da memória, aumentou e diminuiu com o passar do tempo

no grupo treinado. Nos animais treinados, o regulador negativo da memória – *Calcineurin* - aumentou a metilação em um e sete dias, mas não em uma hora, após o treino. A administração dos inibidores do NMDAr (MK-801 ou APV) impediu o aumento da metilação observado aos sete dias em *Reelin* e *Calcineurin*. O grupo treinado apresentou elevação da metilação e redução da expressão de *Calcineurin* 30 dias após o treino, período no qual se acredita que o córtex esteja envolvido na manutenção da memória.

A infusão no córtex anterior cingulado de inibidores de DNMTs (5-AZA ou zebularina) aos 29 dias, mas não em um dia, após o treino prejudicou a memória testada aos 30 dias. Esses interessantes resultados indicam que a metilação de promotores específicos possa estar envolvida na manutenção da memória.

Embora as PTMs de histonas e a metilação do DNA muitas vezes sejam estudadas de forma isolada, diversos indícios apontam para sua forte inter-relação. A melhor apreensão das PTMs em histonas, tanto as já conhecidas como as inexploradas, é imprescindível para a compreensão da plasticidade sináptica e da memória.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de inibidores de histonas desacetilases e a participação do domínio KIX de CBP no aprendizado e na memória.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito de butirato sódico durante a consolidação da memória de reconhecimento de objetos em ratos de 24 meses.

Avaliar o efeito de butirato sódico na memória de reconhecimento de objeto em camundongos. Estudar sua influência na evocação e na persistência dessa memória. Analisar a necessidade do domínio KIX de CBP no efeito de NaB sobre a memória.

Investigar o efeito da administração intra-amigdalar de tricostatina A na memória de condicionamento aversivo ao contexto e de condicionamento aversivo ao indício sonoro.

INTRODUÇÃO AO ARTIGO 1

No artigo intitulado “*Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats*”, relatou-se o efeito da administração sistêmica de butirato sódico na memória de reconhecimento de objeto em ratos de dois, 18 e 24 meses. Esse artigo foi aceito na revista “*Behavioural Brain Research*” e está disponível online.

Reolon GK, Maurmann N, Werenicz A, Garcia VA, Schröder N, Wood MA, Roesler R (2011) *Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. Behavioural Brain Research.*



Short communication

Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats

Gustavo K. Reolon^{a,b}, Natasha Maurmann^{a,b,c}, Aline Werenicz^{a,b}, Vanessa A. Garcia^{b,c}, Nadja Schröder^{b,c}, Marcelo A. Wood^d, Rafael Roesler^{a,b,e,*}

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

^b National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Department of Neurobiology and Behavior, Center for the Neurobiology of Learning and Memory, University of California, Irvine, CA, USA

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

article info

Article history:

Received 1 February 2011

Received in revised form 11 March 2011

Accepted 13 March 2011

Available online 21 March 2011

Keywords: Sodium butyrate
Histone deacetylase
Recognition memory
Epigenetics
Memory consolidation

abstract

Here we show that a systemic injection of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) sodium butyrate (NaB) ameliorated an aging-associated deficit in object recognition memory in rats when the injection was given immediately, but not 6 h after training. NaB had no effect in younger rats with normal memory retention. The results indicate that HDACis can ameliorate aging-related memory impairments by influencing the early consolidation phase of memory formation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Memory formation involves changes in neuronal gene expression. Accumulating evidence indicates that chromatin modification is a key epigenetic mechanism regulating gene transcription during the stabilization of long-term memories. Histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) play opposing roles in modifying chromatin. HATs increase the access to genomic DNA by relaxing chromatin, whereas HDACs induce chromatin condensation and repress gene transcription. HDAC inhibitors (HDACis), initially developed as potential anticancer agents [14], have been shown to enhance memory, or ameliorate deficits in experimental models of memory dysfunction, by inducing a histone hyperacetylated state (for recent reviews, see [2,12,21]).

Memory decline related to aging has been recently associated with changes in epigenetic modification of chromatin [16–18,23], and administration of a HDACi restored memory-associated regulation of gene expression and improved memory in aged mice

[16]. Sodium butyrate (NaB) is an HDACi that enhances formation and extinction of memory when given systemically before training in rats and mice [10,11], and improves memory deficits in models of neurodegenerative disorders and acute brain injury [1,3,9]. However, previous studies have not examined whether systemic HDAC inhibition can ameliorate aging-related cognitive decline by influencing memory consolidation.

In the present study, we examined the effects of posttraining systemic administration of NaB on the formation of novel object recognition (NOR) memory in young adult and aged rats. We found that aged rats showed a deficit in 24-h retention of NOR, which was rescued by NaB given immediately after training, but not at a later posttraining interval. The results suggest that HDACis can rescue aging-associated cognitive decline by influencing the early phase of memory consolidation.

Young adult (age 3 months) or aged (age 24 months for the experiment with immediate posttraining injections; age 18 months for the experiment with 6-h delayed injections) male Wistar rats were obtained from our institutional certified breeding colony (CREAL-UFRGS). Animals were kept in groups of 3 per cage in a plastic cage with sawdust bedding, with room temperature of 22 ± 1 °C and a 12 h light/dark cycle, with standardized pellet food and water ad libitum. All behavioral experiments took place between 9 AM and

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

E-mail address: rroesler@terra.com.br (R. Roesler).

5 PM. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication number 80-23 revised 1996) and approved by the institutional animal care committee.

NOR training and testing took place in a 40 cm × 50 cm open field surrounded by 50 cm high walls made of plywood with a frontal glass wall. The floor was covered with sawdust. Objects used in training and testing trials presented distinctive colors and shapes and consisted of pairs of identical cans, small glass bottles, or blocks made with plastic Duplo Lego toys. The different objects and their positions were counterbalanced across experiments and behavioral trials, and all objects had a height of about 10 cm. Between trials the objects were washed with a 70% ethanol solution. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws, sitting on the object was not considered exploration. Training and test procedures followed the general methods described in previous reports [4,5,19]. Briefly, rats were left to explore the empty arena for 2 min in the first day (habituation). Twenty-four hours after habituation, training was conducted by placing individual rats into the field, in which two identical objects (objects A1 and A2) were positioned in two adjacent corners, 10 cm from the walls. Animals were left to explore the objects until they had accumulated 30 s of total object exploration time a maximum of 20 min. On a memory retention test trial given 24 h after training, rats explored the open field for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. Object exploration was measured by one experimenter blind to group treatment assignments. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $TB/(TA + TB) \times 100$ [TA = time spent exploring the familiar object A; TB = time spent exploring the novel object B]. Because all rats were trained to a criterion of 30 s of total time exploring both objects, there were no differences among experimental groups in the amount of object exploration. This protocol was used to avoid the possible interference on learning of age-related alterations in locomotion or motivation [4,5,19].

Rats received a single intraperitoneal (i.p.) injection of saline (NaCl 0.9%) or NaB (1.2 g/kg) dissolved in saline in a 2.0 ml/kg injection volume immediately after training. In another experiment (delayed injection), aged rats received the injection of saline or NaB 6 h after training. The dose of NaB was chosen on the basis of previous studies [10,11,13,22] as well as pilot experiments performed in our laboratory. NaB 98% was purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA.

Data are expressed as mean + S.E.M. exploratory preferences. Comparisons between groups were performed using a Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Mann–Whitney U-tests, two-tailed when necessary. Comparisons between trials (preference for the novel object in the test trial compared with exploratory preference for object A2 in the training trial) within the same group were performed by Wilcoxon tests [4,5,19]. Comparisons between rats treated with NaB and their respective controls in the time required to reach criterion during training were made with Student's t-tests for independent samples. In all comparisons, $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Results for young adult rats are shown in Fig. 1. There was no significant difference between rats given saline and NaB in the time required to reach criterion (mean + S.E.M. time (s) was 176.8 + 11.9 in the saline group and 186.0 + 6.4 in the NaB group; $P = 0.51$). Both experimental groups showed significant memory retention as revealed by the comparison between exploratory preferences between the training and the test trials (saline, $P = 0.005$, $n = 10$; NaB, $P = 0.008$, $n = 9$). There were no significant differences between groups (training, $P = 0.45$; test, $P = 1.00$). Results for aged rats given an immediate posttraining injection are shown in Fig. 2A. There was no significant difference between groups in the time required to reach criterion (mean + S.E.M. time (s) was 573.0 + 118.8 in the

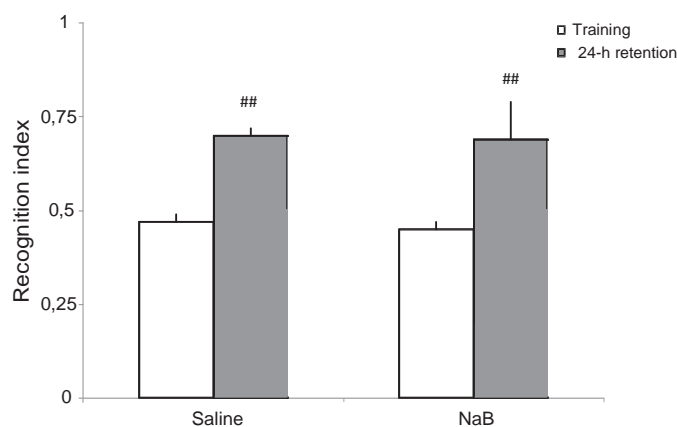


Fig. 1. Posttraining administration of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) sodium butyrate (NaB) does not affect retention of novel object recognition (NOR) in young adult rats. Male Wistar rats (age 3 months) were trained in a NOR task and tested for retention 24 h later. Immediately after training, animals received a single intraperitoneal (i.p.) injection of saline (NaCl 0.9%, $n = 9$) or NaB (1.2 g/kg, $n = 9$) dissolved in saline. ### $P < 0.01$, comparison between training and test within the same group. There was no significant difference between groups.

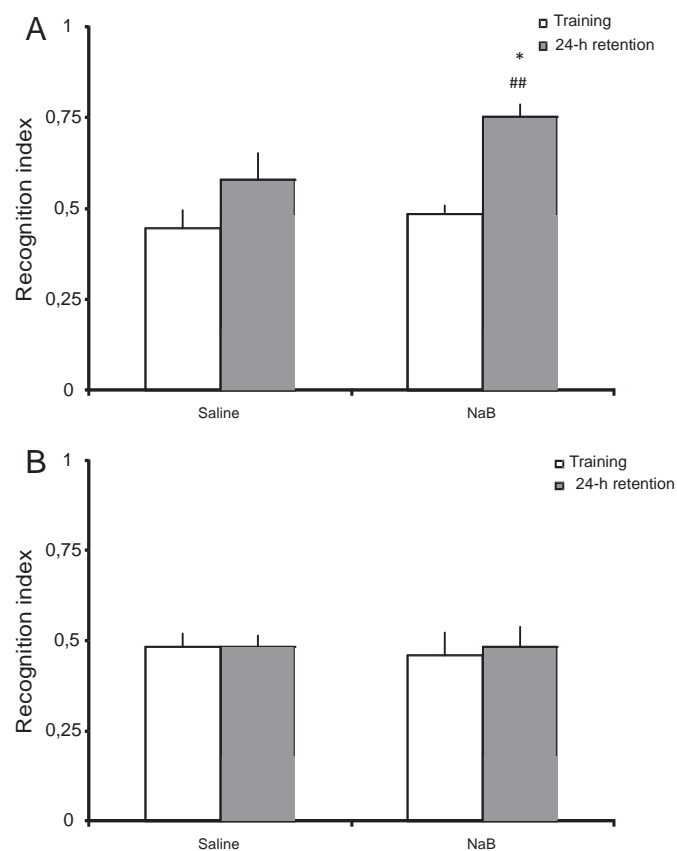


Fig. 2. Posttraining administration of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) sodium butyrate (NaB) rescues aging-associated memory impairment in rats. Aged male Wistar rats (age 18 or 24 months) were trained in novel object recognition (NOR) task and tested for retention 24 h later. Either immediately after (A) or 6 h after (B) training, animals received a single intraperitoneal (i.p.) injection of saline (NaCl 0.9%, $ns = 10$ for immediate posttraining injections and 6 for 6 h delayed injections) or NaB (1.2 g/kg, $ns = 9$ for immediate posttraining injections and 7 for 6 h delayed injections) dissolved in saline. ## $P < 0.01$, comparison between training and test within the same group. * $P < 0.05$, comparison between experimental groups within the same trial.

saline group and $596.4 + 120.5$ in the NaB group; $P = 0.89$). Control aged rats given saline immediately after training showed impaired 24-h retention of NOR memory: there was no significant difference between performance in training and test trials, although it fell short of significance ($P = 0.074$, $n = 10$). In contrast, rats given NaB showed significant memory retention in the test trial ($P = 0.008$, $n = 9$). There was a significant difference in exploratory preference between groups in the test trial ($P = 0.035$), but not in the training trial ($P = 0.50$). The mean percentage of time exploring the novel object in the retention test for aged rats given NaB (about 75%) was comparable to those of young adult rats given either saline or NaB (about 70% in both groups). The results indicate that aging is associated with an impairment of 24-h retention of NOR, and this impairment is rescued by a single systemic injection of NaB given immediately, but not 6 h, after training. In contrast, in younger animals that showed normal levels of memory retention, NaB did not produce further enhancement of NOR retention.

To verify whether the beneficial effects of NaB were specific for the early phase of consolidation, an additional experiment was carried out in which injections were given at a delayed time point (6 h) after training. Results are shown in Fig. 2B. There was no significant difference between groups in the time required to reach criterion (mean + S.E.M. time (s) was $548.5 + 138.5$ in the saline group and $667.0 + 84.7$ in the NaB group; $P = 0.49$). Neither the saline nor the NaB group showed significant memory retention assessed by training-test-differences (saline, $P = 0.92$, $n = 6$; NaB, $P = 0.74$, $n = 7$). In addition, there were no significant differences between groups (both $P_s = 0.73$ for training and test trials). These results confirm that aged rats show impaired NOR memory and indicate that NaB does not improve the impairment when given at a later time point after training.

Because all animals were trained to a criterion of object exploration, the differences between young and aged rats given saline observed in the present study were unlikely to be related to differences in acquisition, locomotion, or motivation. In addition, there were no differences in the time of context exposure required to reach criterion between rats treated with NaB and their respective controls. Direct comparisons between young and aged rats were not performed because the experiments using young and adult rats were carried out separately. However, aged rats clearly took a longer exposure time to reach the 30-s criterion of object exploration. In spite of the similar amounts of object exploration during training in all groups, we cannot rule out the possibility that the longer context exposure time in aged rats has influenced the differential effects of NaB in young and aged rats.

Since NaB injections were given after training, the NaB-induced improvement of performance observed in aged rats cannot be explained by drug-induced alterations in acquisition, anxiety, locomotion, motivation, or other sensorial or motor parameters. Also, the lack of effect of NaB when given 6 h after training in aged rats indicates that the improving effect of immediate posttraining NaB on 24-h retention was not produced by long-lasting effects of NaB that could influence performance by affecting aspects of brain function and behavior unrelated to memory. Finally, systemic administration of NaB to rodents given behavioral training has been used in several previous studies without any evidence indicating that NaB can produce drug-induced conditioned aversion that could influence performance.

Several studies have shown that systemic or intracerebral administration of HDACis can produce memory-enhancing effects in normal animals as well as in models of brain disorders [1,3,7,9–11,22,24], and it was recently shown that HDACis can ameliorate aging-related memory decline in mice [16]. Many of the studies investigating the effects of HDACis on memory have used systemic administration of NaB to produce memory enhancement via HDAC inhibition. Although a few previous studies have indi-

cated that NaB can enhance memory when given after training [6,20,22], there is no previous evidence that HDACis can modify aging-related memory deficits by specifically influencing consolidation. The present results add to the previous evidence by showing that, in rats, acute systemic administration of NaB can rescue aging-related impairment in object recognition memory when given after training.

A previous study in *Chasmagnathus granulatus* crabs has found that NaB enhanced memory consolidation at two time windows after training, immediately and 6 h after training [6]. In contrast, we found no effect of NaB injected 6 h after training in 18-month rats with impaired retention of NOR memory. This difference might be related to species-specific differences in the action of NaB and/or in the influence of histone acetylation in memory consolidation. Additional studies are required to further characterize the time window for the effects of HDACis in consolidation in rodents. Another difference between the present study and the previous findings is that, in our experiment, NaB failed to affect NOR memory measured 24 h after training in young adult rats. Stefanko et al. [22] showed a significant enhancement of 24-h NOR retention after posttraining injection of 1.2 g/kg NaB in young adult mice. This discrepancy might be explained by the lower retention index displayed by control mice in the study by Stefanko et al. [22], which used a sub-threshold condition for training (i.e., a 3-min training trial), whereas in the present study young saline-treated rats were given a stronger training protocol and showed significant retention. Under conditions in which control animals show high retention scores for NOR memory, there might be a “ceiling effect” that can prevent cognitive enhancers from further improving memory.

Several molecular mechanisms modified in response to chromatin relaxation might be involved in the effects of HDACis on memory in aged rats. For example, evidence indicates that the memory-enhancing effects of HDACis is mediated primarily by activation of genes regulated by the CREB:CREB-binding protein (CBP) transcriptional complex [8,15,24]. Memory impairment associated with aging in mice was specifically related to changes in histone H4 lysine 12 (H4K12) acetylation, leading to altered expression of several genes involved in memory consolidation. Importantly, HDACis (including NaB) that restored normal H4K12 also rescued aging-related memory impairment [16]. Recent evidence suggests that aging is also associated with aberrant changes in methylation of the *Arc* gene, leading to decreased transcription of *Arc*, an immediate early gene required for memory consolidation [18]. One can speculate that restoration of *Arc* expression might be a mechanism involved in HDACi-induced amelioration of memory dysfunction associated with aging. Advances in the detailed understanding of alterations in specific histone subtypes in aging and pathological conditions, and investigation of the actions of HDACis on these alterations, will allow the identification of the most promising HDACis for ameliorating cognitive dysfunction in a clinical setting.

In conclusion, the present results indicate that HDACis can ameliorate aging-related memory impairments by influencing the early consolidation phase of memory formation.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grants 303703/2009-1 to R.R. and 305905/2009-0 to N.S., National Institute of Mental Health (NIMH) grant R01MH081004 to M.A.W., National Institute for Translational Medicine (INCT-TM, Brazil), and the South American Office for Anticancer Drug Development (R.R.). G.K.R. is supported by a CNPq fellowship. We thank Thiago Rodrigues Pedrosa and Paulo Fernandes Costa Jobim for excellent technical assistance.

References

- [1] Alarcón JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, et al. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/−} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 2004;42:947–59.
- [2] Barrett RM, Wood MA. Beyond transcription factors: the role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn Mem* 2008;15:460–7.
- [3] Dash PK, Orsi SA, Moore AN. Histone deacetylase inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. *Neuroscience* 2009;163:1–8.
- [4] de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schröder N. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with 1-deprenyl. *Exp Gerontol* 2005;40:506–11.
- [5] de Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimaraes MR, Scalco FS, Roesler R, et al. Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology* 2008;55:788–92.
- [6] Federman N, Fustiñana MS, Romano A. Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. *Learn Mem* 2009;16:600–6.
- [7] Fontán-Lozano A, Romero-Granados R, Troncoso J, Múnera A, Delgado-García JM, Carrión AM. Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Mol Cell Neurosci* 2008;39:193–201.
- [8] Haettig J, Stefanko DP, Multani ML, Figueroa DX, McQuown SC, Wood MA. HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learn Mem* 2011;18:71–9.
- [9] Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, et al. Inhibitors of class I histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:870–80.
- [10] Lattal KM, Barrett RM, Wood MA. Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav Neurosci* 2007;121:1125–31.
- [11] Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 2004;279:40545–59.
- [12] Levenson JM, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:108–18.
- [13] Lubin FD, Sweatt JD. The IkappaB kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. *Neuron* 2007;55:942–57.
- [14] Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 2009;107:600–8.
- [15] McQuown SC, Barrett RM, Matheos DP, Post RJ, Rogge GA, Alenghat T, et al. HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci* 2011;31:764–74.
- [16] Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, et al. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 2010;328:753–6.
- [17] Penner MR, Roth TL, Barnes CA, Sweatt JD. An epigenetic hypothesis of aging-related cognitive dysfunction. *Front Aging Neurosci* 2010;2:9.
- [18] Penner MR, Roth TL, Chawla MK, Hoang LT, Roth ED, Lubin FD, et al. Age-related changes in Arc transcription and DNA methylation within the hippocampus. *Neurobiol Aging* 2010, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.009.
- [19] Pietá Dias C, de Lima MN, Presti-Torres J, Dornelles A, Garcia VA, Siciliani Scalco F, et al. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience* 2007;146:1719–25.
- [20] Roozendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagevoud R, Malvaez M, Stefanko DP, et al. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci* 2010;30:5037–46.
- [21] Roth TL, Sweatt JD. Regulation of chromatin structure in memory formation. *Curr Opin Neurobiol* 2009;19:336–42.
- [22] Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:9447–52.
- [23] Sweatt JD. Epigenetics and cognitive aging. *Science* 2010;328:701–2.
- [24] Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, et al. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 2007;27:6128–40.

INTRODUÇÃO AO ARTIGO 2

No artigo intitulado “*Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition*”, foi estudado o efeito da administração sistêmica de butirato sódico na memória de reconhecimento de objeto em camundongos. O planejamento, a execução experimental e a análise desses dados realizou-se no laboratório do co-orientador desta tese, Dr. Marcelo Wood. Esse artigo foi publicado na revista “*Proceedings of the National Academy of Sciences*”.

Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA (2009) *Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 106:9447-9452.

Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition

Daniel P. Stefanko^a, Ruth M. Barrett^a, Alexandra R. Ly^a, Gustavo K. Reolon^{a,b,c}, and Marcelo A. Wood^{a,1}

^aDepartment of Neurobiology and Behavior, Center for the Neurobiology of Learning and Memory, University of California, Irvine, CA 92697-3800;

^bDepartment of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Cellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-9000 Porto Alegre, RS, Brazil; and ^cGraduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Communicated by James L. McGaugh, University of California, Irvine, CA, April 10, 2009 (received for review February 26, 2009)

Histone acetylation is a chromatin modification critically involved in gene regulation during many neural processes. The enzymes that regulate levels of histone acetylation are histone acetyltransferases (HATs), which activate gene expression and histone deacetylases (HDACs), that repress gene expression. Acetylation together with other histone and DNA modifications regulate transcription profiles for specific cellular functions. Our previous research has demonstrated a pivotal role for cyclicAMP response element binding protein (CREB)-binding protein (CBP), a histone acetyltransferase, in long-term memory for novel object recognition (NOR). In fact, every genetically modified *Cbp* mutant mouse characterized thus far exhibits impaired long-term memory for NOR. These results suggest that long-term memory for NOR is especially sensitive to alterations in CBP activity. Thus, in the current study, we examined the role of HDACs in memory for NOR. We found that inducing a histone hyperacetylated state via HDAC inhibition transforms a learning event that would not normally result in long-term memory into an event that is now remembered long-term. We have also found that HDAC inhibition generates a type of long-term memory that persists beyond a point at which normal memory for NOR fails. This result is particularly interesting because one alluring aspect of examining the role of chromatin modifications in modulating transcription required for long-term memory processes is that these modifications may provide potentially stable epigenetic markers in the service of activating and/or maintaining transcriptional processes.

CBP | chromatin | epigenetic | acetylation | CREB

In the past 5 years, chromatin modification has been identified as a pivotal molecular mechanism underlying certain forms of synaptic plasticity and memory. One of the best studied chromatin modifications is histone acetylation, which modulates histone-DNA interactions and provides recruitment sites for additional chromatin regulatory proteins (reviewed in ref. 1). The enzymes that regulate levels of histone acetylation are histone acetyltransferases (HATs), which generally activate gene expression and histone deacetylases (HDACs), which generally repress gene expression (2). Acetylation together with other histone and DNA modifications regulate transcription profiles for specific cellular functions. Recently, HAT enzymes, such as cyclicAMP response element binding protein (CREB)-binding protein (CBP) and HDACs, have been shown to be essential components of the molecular mechanisms underlying memory formation.

By using genetically modified *Cbp* mutant mice, we and others have shown that CBP is necessary for specific forms of hippocampal long-term potentiation (LTP), hippocampus-dependent long-term memory, and long-term memory for object recognition (3–8). Interestingly, all of the different types of genetically modified *Cbp* mutant mice studied to date exhibit deficits in long-term memory for object recognition (3–7); reviewed in ref. 1. This evidence suggests that brain regions required for long-term memory for object recognition (9–16) may be particularly sensitive to alterations in CBP activity and

histone acetylation. The results from *Cbp* mutant mice with regard to long-term memory for object recognition suggest that this type of memory may be well suited for studying the role of histone modifying enzymes in memory formation. Because CBP HAT activity is opposed by HDAC activity, we examined the role of HDACs as potential memory suppressor genes involved in modulating molecular mechanisms required for long-term memory for object recognition in this study.

Previously, we demonstrated that blocking HDAC activity with nonspecific HDAC inhibitors, such as trichostatin A (TSA) or sodium butyrate (NaBut), enhances synaptic plasticity and memory, suggesting that HDACs may actually serve to return chromatin to a repressive state and silence transcription required for long-term memory formation (17, 18). In the current study, we show that HDAC inhibition can transform a learning event that does not normally lead to long-term memory for object recognition into a long-lasting form of memory. Moreover, HDAC inhibition during memory consolidation generates a form of long-term memory that persists beyond the point at which normal memory fails. Together, these results suggest HDACs may serve as critical memory suppressor genes and show that HDAC inhibition may generate more persistent forms of long-term memory, which has great therapeutic and translational value.

Results

Identification of Behavioral Parameters Affecting Long-Term Memory for Novel Object Recognition.

The overall aim of this study was to examine the role of histone-modifying enzymes in the formation of object recognition memory and to determine how altering those enzymes changes memory formation. Therefore, we first examined what parameters are critical for establishing long-term memory for novel object recognition (NOR). We first assessed the effect of training duration and habituation duration on memory formation for NOR. We examined 3 different groups. Group 1 received habituation and a 10-min training session. Group 2 received habituation and a 3-min training session. Group 3 received no habituation and a 10-min training session. The percentage of time spent exploring the objects during training did not significantly differ between training conditions (Fig. 1A). All 3 groups were given a 24-h retention test. A 1-way ANOVA showed that the effect of training was significant [$F_{(2, 27)} = 6.27, P < 0.01$]. Post-hoc analysis using the Student-Newman-Keuls test ($\alpha = 0.05$) indicated that Group 1 had a significantly higher discrimination index (DI = $48.1 \pm 10.0\%$, $n = 10$) than both Groups 2 (DI = $13.2 \pm 8.7\%$, $n =$

Author contributions: D.P.S., R.M.B., G.K.R., and M.A.W. designed research; D.P.S., A.R.L., and G.K.R. performed research; D.P.S., G.K.R., and M.A.W. analyzed data; and R.M.B. and M.A.W. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

¹To whom correspondence should be addressed at: University of California, Irvine, Department of Neurobiology and Behavior, Center for the Neurobiology of Learning and Memory, 106 Bonney Research Lab, Irvine, CA 92697-3800. E-mail: mwood@uci.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0903964106/DCSupplemental.

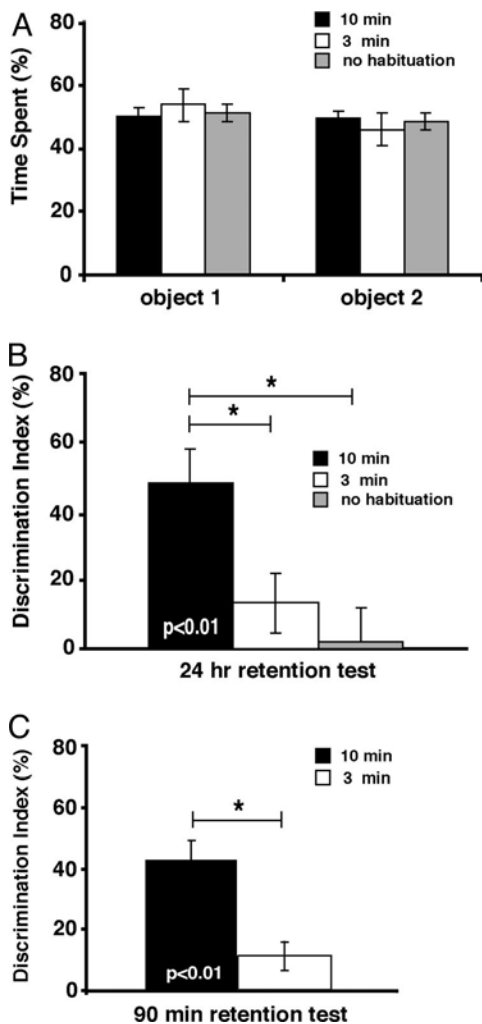


Fig. 1. Effect of training period (3 min versus 10 min) and habituation to context on long-term memory for the familiar object. (A) Two groups of mice were habituated and then exposed to the objects for either 10 min or 3 min. A third group received no habituation followed by a 10-min training period. All 3 groups exhibited equal exploration times for each object. (B) During the 24-h retention test, animals receiving 10 min of training after 3 days of habituation ($n = 10$) displayed a significant preference for the novel object, whereas those that received 3 min of training ($n = 10$) or 10 min of training with no habituation ($n = 10$) showed no significant preference ($P > 0.05$). (C) During a 90-min retention test, animals receiving 10 min of training ($n = 10$) displayed a significant preference for the novel object, whereas those that received 3 min of training ($n = 10$) showed no significant preference.

10) and 3 ($DI = 1.7 \pm 10.2\%$, $n = 10$); no other differences were statistically significant (Fig. 1B). These results demonstrate that a training duration of 3 min is not sufficient for animals to form a long-term memory for NOR, and nonhabituated mice are unable to form a memory for the familiar object even with a 10-min exposure to the familiar object. Also, we have found that a 10-min training period is sufficient to generate long-term memory for the familiar object only when the mice are habituated to the context.

To test training duration on short-term memory, a retention test was given 90 min after training to a different set of mice. Mice receiving a 10-min training session exhibit significant memory for the familiar object as demonstrated by the discrimination index [$DI = 42.7 \pm 6.2\%$; $t_{(10)} = 5.87$; $P < 0.001$; Fig. 1C]. In contrast, mice receiving a 3-min training session did not exhibit memory for the familiar object. These results establish that a 10-min training period is sufficient to generate short- and

long-term memory for the familiar object, but that a 3-min training period does not result in either short- or long-term memory. Thus, we next examined how increasing histone acetylation via HDAC inhibition affects memory for NOR.

HDAC Inhibition Transforms a Learning Event that Would Not Normally Result in Long-Term Memory into an Event That Is Now Remembered Long-Term. In a previous study, we demonstrated that HDAC inhibition could transform a transient transcription-independent form of E-LTP into a long-lasting robust transcription-dependent form of LTP (18). However, at the behavioral level, whether HDAC inhibition can transform a learning event that would normally not result in long-term memory into a form of memory that is long-lasting remains to be shown. Thus, we next examined the effect of HDAC inhibition on memory after a 3-min training period. Mice were subject to habituation followed by a 3-min training period. Immediately after training, mice were administered either vehicle or sodium butyrate (NaBut) and given a retention test 24 h later. We and others have shown that a single systemic injection of NaBut enhances memory (17, 19) associated with increases in histone acetylation in the brain (20). As shown in Fig. 2A, NaBut-treated mice exhibited significantly increased memory for the familiar object (NaBut, $DI = 36.9 \pm 7.5\%$; $n = 8$; $t = 2.38$, $P < 0.05$) compared with vehicle controls (vehicle, $DI = 12.6 \pm 6.9\%$; $n = 8$). Similar results were obtained using a 0.6-g/kg dose of NaBut (supporting information (SI) Fig. S1). These results show that HDAC inhibition can enhance memory for the familiar object and transform what is learned by just a 3-min training period (that does not lead to long-term memory by itself) into an event leading to long-term memory.

We next examined the effect of HDAC inhibition on short-term memory. Mice were subject to habituation, received a 3-min training period, immediately followed with vehicle or NaBut treatment and tested 90 min later. Fig. 2B shows that mice receiving NaBut (NaBut, $DI = 16.2 \pm 4.5\%$; $n = 8$; $t = 0.095$, $P = 0.98$) exhibit similar memory for NOR as vehicle-treated animals (vehicle, $DI = 15.6 \pm 4.2\%$; $n = 8$). Together, these findings suggest that the 3-min training is sufficient to initiate molecular mechanism that can be “captured” by HDAC inhibition and lead to long-term memory, but that short-term memory processes are not affected.

As shown in Fig. 1B, mice subject to a 10-min training period without habituation exhibit no long-term memory for object recognition. Because these animals tend to explore the context rather than the objects, they do not distinguish between novel and familiar objects. Thus, as predicted, mice receiving a 10-min training period without habituation still do not exhibit memory for the familiar object even when treated with an HDAC inhibitor (vehicle, $DI = 13.0 \pm 12.5\%$; $n = 8$; NaBut, $DI = 8.3 \pm 11.9\%$; $n = 8$; $t = 0.27$, $P = 0.79$; Fig. 2C). These results serve as a control to demonstrate that HDAC inhibition does not simply increase a performance variable that confounds interpretation of our data.

HDAC Inhibition Generates a Type of Long-Term Memory That Persists Beyond a Point at Which Normal Memory for NOR Fails. We next determined whether HDAC inhibition-dependent memory could persist over long retention intervals. Again, mice were subject to habituation, 3 min of training, followed immediately by an injection of vehicle or NaBut. To measure persistence, a retention test was given 7 days after training. Mice treated with NaBut (NaBut, $DI = 39.4 \pm 7.6\%$; $n = 9$; $t = 2.49$, $P < 0.01$) showed significantly better memory for the familiar object than vehicle controls (vehicle, $DI = 16.0 \pm 5.5\%$; $n = 8$; Fig. 3A). These results demonstrate that HDAC inhibition is able to induce a form of memory that persists beyond a typical 24-h memory retention test.

To examine the effect of inhibiting HDAC activity during

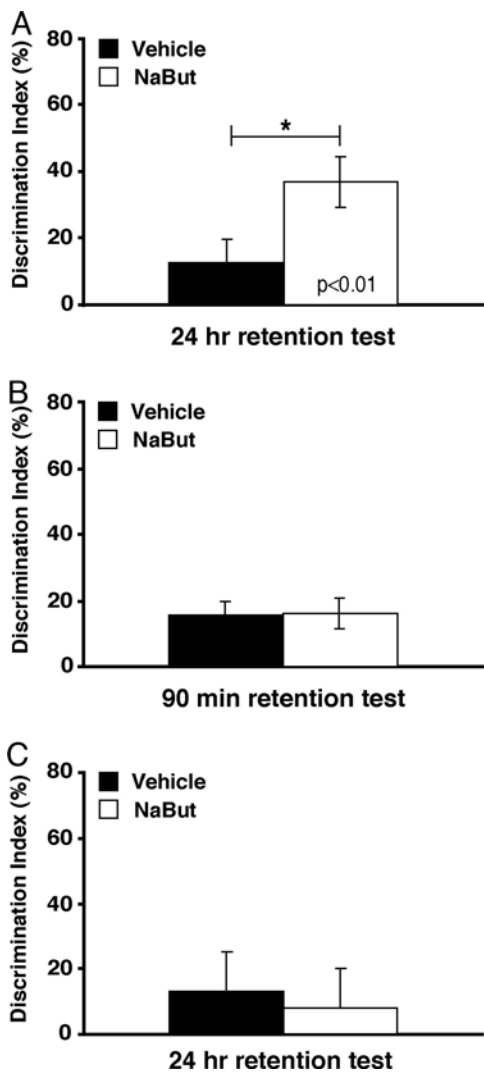


Fig. 2. HDAC inhibition facilitates long-term memory, measured at 24 h, after 3 min of object recognition training. (A) During a 24-h retention test, mice that received 3 min of training followed by an i.p. administration of NaBut ($n = 8$) displayed significantly enhanced preference for the novel object compared with vehicle-treated mice ($n = 8$). (B) During a 90-min retention test, mice that received NaBut ($n = 8$) immediately after 3 min of training showed no preference for the novel object compared with vehicle-treated mice ($n = 8$). (C) Mice that did not receive habituation to the context before a 10-min training period were unable to form a long-term memory for the familiar object. On the training day, mice were exposed to the experimental apparatus with 2 identical objects for 10 min. Both groups showed similar exploration times for each object. During the 24-h retention test, mice treated with NaBut ($n = 8$) or vehicle ($n = 8$) did not display a significant preference for the novel object.

the 7-day retention test, we delivered NaBut (normal dose, 1.2 g/kg; low dose, 0.6 g/kg) or vehicle 1 h before the 7-day test. In this experiment, mice received habituation and then a 10-min training session, which results in 24-h long-term memory. Seven days later, mice were administered vehicle or NaBut 1 h before the retention test. A repeated-measures ANOVA (between the 7-day test shown in Fig. 3B and the 24-h test a day later on the same mice shown in Fig. 3C) revealed a main effect of test [$F_{(1, 26)} = 19.07, P < 0.01$] and treatment [$F_{(2, 26)} = 9.20, P < 0.01$] with a significant interaction between test and treatment [$F_{(2, 26)} = 15.14, P < 0.01$]. Bonferroni post-hoc comparisons revealed no differences among groups during the

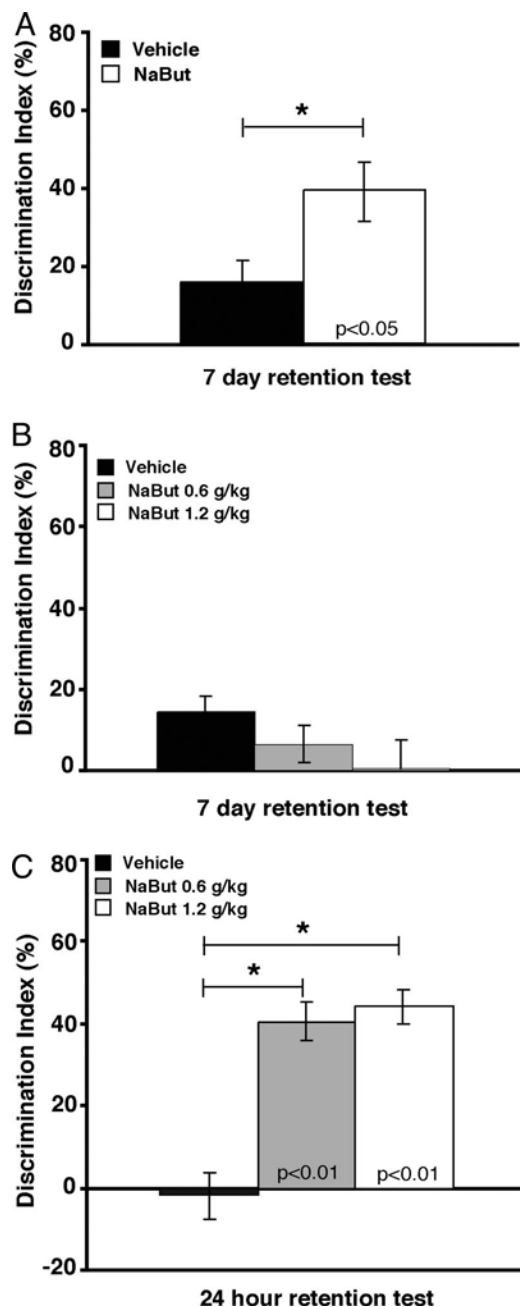


Fig. 3. HDAC inhibition generates a type of long-term memory that persists at least 7 days. (A) During the 7-day retention trial, animals receiving 3 min of training followed by an i.p. administration of NaBut ($n = 9$) displayed a significant preference for the novel object compared with vehicle-treated controls ($n = 8$). (B) To determine the effect of NaBut on retrieval, animals receiving a 10-min training period were injected with i.p. NaBut 1 h before a 7-day retention test. We examined 2 different doses of NaBut (normal dose: 1.2 g/kg, $n = 9$; low dose: 0.6 g/kg, $n = 11$; vehicle, $n = 9$). Neither dose of NaBut affected behavior of mice in the retrieval test compared with vehicle-treated mice. (C) To demonstrate that NaBut was active during the retention test in Fig. 3B, we retested the same mice 24 h later using a different novel object paired with the former novel object in the 7-day retention test. NaBut-treated mice (low dose, $n = 11$; normal dose, $n = 9$) exhibited significantly enhanced preference for the novel object compared with vehicle-treated mice ($n = 9$).

7-day retention test (Fig. 3B). The results in Fig. 3B indicate that HDAC inhibition before retention has no effect.

To demonstrate that the NaBut delivered 1 h before the 7-day retention test was active, we subjected the same set of mice to a

subsequent retention test on day 8. We predicted that although HDAC inhibition did not affect retrieval, the animals are indeed learning something new during that retrieval test in the presence of HDAC inhibition, and thus NaBut-treated mice should exhibit enhanced preference for a novel object in a subsequent retention test on day 8. Indeed, we observed that mice treated with either a low dose (0.6 g/kg, DI = $40.6 \pm 4.9\%$, $n = 11$; $t_{19} = 5.96$, $P < 0.01$, Bonferroni post-hoc) or a normal dose (1.2 g/kg, DI = $44.1 \pm 4.4\%$, $n = 9$; $t_{17} = 6.15$, $P < 0.01$, Bonferroni post-hoc) showed significantly better memory for the familiar object than vehicle controls (vehicle, DI = $-1.9 \pm 5.6\%$, $n = 9$; Fig. 3C). Two results were obtained from experiments shown in Fig. 3. First, a 10-min training session is not sufficient to generate a form of long-term memory that persists 7 days. Second, NaBut delivered 1 h before the 7-day retention test had no effect. These results indicate that HDAC inhibition generates a form of long-term memory that persists up to at least 7 days.

To investigate the role of CBP in HDAC inhibition-dependent long-term memory formation, we examined *Cbp* knockin mice (*Cbp*^{KIX/KIX}) carrying a mutation in the KIX (CREB-binding) domain of CBP (21). We have found these mice to exhibit normal short-term memory for object recognition, but impaired long-term memory (7). To examine these mice in the current study, we needed to determine whether these mice also exhibit impairments under the training conditions used here. Fig. S2 shows that *Cbp*^{KIX/KIX} exhibit severe long-term memory impairments when given a 10-min training period followed by a 24-h retention test and that HDAC inhibition can ameliorate that memory impairment.

We next examined whether CBP was required for HDAC inhibition-dependent long-term memory that persists over a 7-day period (as shown in Fig. 3 in C57BL/6 mice). *Cbp*^{KIX/KIX} homozygous mice and wild-type *Cbp*^{+/+} littermates were subject to habituation, a 10-min training period, and then immediately after given an injection of either vehicle or NaBut. In this experiment, the mice received a 7-day retention test. A 2-way ANOVA yielded no significant difference because of genotype and no significant interaction between genotype and treatment [Main effect of genotype $F_{(1, 26)} = .016$, $P = 0.90$; Genotype \times Treatment interaction, $F_{(1, 26)} = 1.27$, $P = 0.268$]. However, there was a significant difference among treatment [$F_{(1, 26)} = 27.32$, $P < 0.001$]. One-way ANOVA revealed that neither *Cbp*^{KIX/KIX} homozygous mice treated with vehicle (Fig. 4A, DI = $-4.5 \pm 10.5\%$; $n = 7$), nor wild-type *Cbp*^{+/+} littermates treated with vehicle (Fig. 4B, DI = $5.8 \pm 7.7\%$; $n = 7$) exhibited persistent memory for the familiar object when tested 7 days after training [$F_{(1, 12)} = .849$, $P = 0.373$]. In contrast, both *Cbp*^{KIX/KIX} homozygous mice treated with NaBut (Fig. 4A, NaBut, DI = $47.8 \pm 10.8\%$; $n = 7$) and wild-type *Cbp*^{+/+} littermates treated with NaBut (Fig. 4B, NaBut, DI = $39.6 \pm 8.5\%$; $n = 9$) performed significantly better than their respective vehicle controls [*Cbp*^{KIX/KIX}, NaBut, $F_{(1, 12)} = 16.17$, $P < 0.001$]; *Cbp*^{+/+}, NaBut, $F_{(1, 14)} = 10.60$, $P < 0.005$], exhibiting long-term memory for the familiar object that persists up to 7 days, but were not significantly different from each other [$F_{(1, 14)} = .48$, $P = 0.50$]. These results indicate that CBP is not required for persistent HDAC inhibition-dependent memory. Further, they demonstrate that HDAC inhibition can induce a form of memory for object recognition that persists beyond the point at which normal memory fails.

Discussion

One of the most important results from these experiments is that HDAC inhibition can generate a form of long-term memory that persists beyond a point at which normal memory fails. An alluring aspect of examining chromatin modifications in regulating transcription required for long-term memory processes is that these modifications, in combination with DNA methylation,

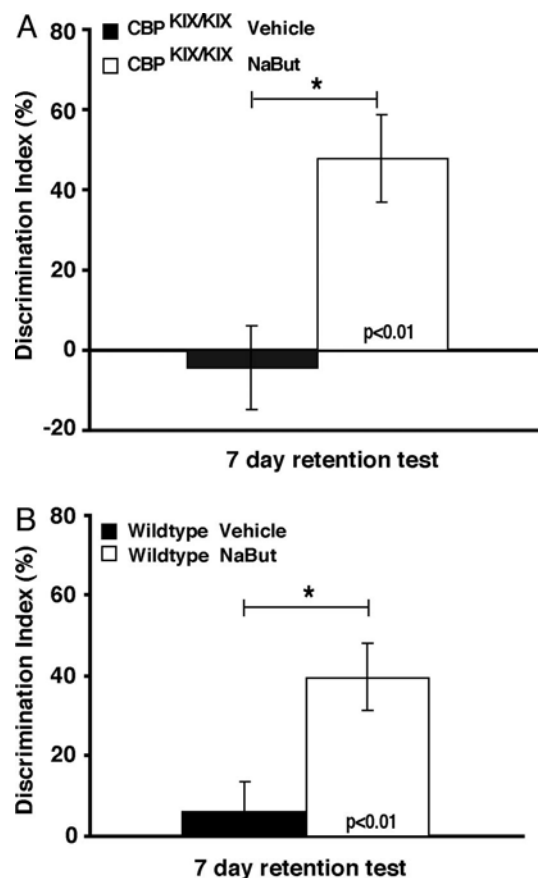


Fig. 4. HDAC inhibition can induce a form of memory for object recognition that persists beyond the point at which normal memory fails. (A) *CBP*^{KIX/KIX} mice that received 10 min of training immediately followed by an i.p. injection of NaBut ($n = 7$) displayed a significant preference for the novel object compared with vehicle-treated *CBP*^{KIX/KIX} mice ($n = 7$) during a 7-day retention test. (B) Wild-type *CBP*^{+/+} mice that received 10 min of training immediately followed by an i.p. injection of NaBut ($n = 9$) displayed a significant preference for the novel object compared with vehicle-treated wild-type *CBP*^{+/+} mice ($n = 7$) during a 7-day retention test.

may provide transient and stable markers in the service of activating and/or maintaining transcriptional profiles underlying cellular functions (1). These transcriptional profiles in turn may play a role in the molecular mechanisms underlying neuronal changes that subserve persistent changes in behavior. Although much more work needs to be done to elucidate the precise mechanisms involved, our results show that modulating chromatin modification may generate a persistent form of long-term memory lasting beyond the point at which normal memory fails.

A second important finding from this study is that a learning event that does not lead to short-term or long-term memory can be transformed by HDAC inhibition into an event that does result in long-term memory. Conceptually, this finding is similar to what we observed in hippocampal slices examining the effect of HDAC inhibition on synaptic plasticity in a previous study. We have shown that HDAC inhibition enhances hippocampal LTP, allowing a protocol that usually only leads to a short-term form of LTP, E-LTP, to lead to a longer lasting form of transcription-dependent LTP (18). We now show at the behavioral level that a 3-min exposure to objects fails to induce long-term memory for a familiar object. However, when an animal receives a 3-min exposure to the objects and immediately afterward an injection of an HDAC inhibitor, the animal now forms long-term memory for the familiar object. Similar results

were shown in a study by Fontan-Lozano et al. (20) using a 5-min exposure length. Thus, a common theme that has emerged from studies of HDAC inhibition and synaptic plasticity and memory formation is that an event that would normally lead to a transient or transcription-independent form of plasticity or memory can result in stable, long-lasting transcription-dependent plasticity or memory when paired with HDAC inhibition.

A unique result from our experiments is that the 3-min training protocol we used does not result in short-term memory by itself or when paired with post-training HDAC inhibition. This result may indicate that a 3-min exposure to objects is sufficient to begin rapid molecular mechanisms, but without additional exposure time (e.g., 10 min), these mechanisms do not result in short-term or long-term changes in behavior. However, HDAC inhibition may generate a chromatin state that is permissive to rapid molecular mechanisms engaging transcription-dependent pathways necessary for memory consolidation. This idea may have been predicted from genetically modified mice in which other enzymes affecting histone acetylation exhibit normal short-term memory, but impaired long-term memory (3, 5–8).

Much more work will be necessary to determine how exactly HDAC inhibition modulates memory. Presumably, HDAC inhibition is acting on memory consolidation. One advantage of using HDAC inhibitors to examine their effect on memory consolidation is that they can be delivered posttraining and their effects on histone acetylation are not detectable 24 h later when a typical long-term memory test is given (see also ref. 18). Thus, it is most likely that the HDAC inhibitor effects on memory are not because of effects on performance, which is a critical factor in studies examining memory enhancements/impairments (22–24). A key open question is what effect does HDAC inhibition have on gene expression required for memory consolidation? HDAC inhibition is thought to facilitate gene expression by inducing an open chromatin configuration. But does this form of open chromatin configuration increase the level of gene expression after an activity-dependent stimulus? Or does the open chromatin configuration help maintain expression of key genes involved in the generation of long-term memory? What is the overlap between genes normally turned on/off during memory consolidation and genes turned on/off during memory consolidation in the presence of HDAC inhibition? Answers to these questions will not only give us a better understanding of how HDAC inhibitors modulate memory, but perhaps critical insight into the regulation of gene expression required for memory formation.

In a previous study, we showed that the transformation of hippocampal E-LTP into a transcription-dependent form of LTP by HDAC inhibition depended on the interaction between CBP and cyclicAMP response-element binding protein (CREB), a transcription factor (18). To test whether the same is true for the enhancement of object-recognition memory by HDAC inhibition, we used mutant mice in which the interaction between CBP and CREB is disrupted. These mice carry mutations in three highly conserved residues (Tyr650Ala, Ala654Gln, and Tyr658Ala) within the CBP KIX domain (*cbp*^{KIX/KIX}), which is where CBP interacts with phospho-CREB (21). *Cbp*^{KIX/KIX} homozygous mutant mice exhibit impairments in long-term memory for contextual fear conditioning and NOR (7; this study). We initially predicted that CBP would also be required for HDAC inhibition to enhance memory for NOR. Contrary to what we expected, we found that HDAC inhibition was able to ameliorate memory impairments in *cbp*^{KIX/KIX} mutant mice. There may be several possible explanations. First, this experiment examines the relationship between the CREB:CBP interaction and HDAC inhibition in an area of the brain other than the hippocampus. In our previous study, we only examined hippocampal LTP in the *cbp*^{KIX/KIX} mutant mice (18). The

object-recognition experiments we performed in this study may be hippocampus independent because we do not alter object location or the relationship between object and context, both of which have been shown to engage the hippocampus during object recognition (13, 25, 26). Thus, HDAC inhibition-dependent enhancement in hippocampal LTP may require CBP whereas HDAC inhibition-dependent modulation of long-term memory for object recognition may not. A second possibility is that our previous findings in hippocampal slices do not extend to memory processes at the behavioral level. For example, HDAC inhibition-dependent long-term memory processes could be engaged using systems level consolidation, which is not observable in hippocampal slices. Last, the CBP deficiency in *cbp*^{KIX/KIX} mutant mice is not complete. In mouse embryonic fibroblasts from *cbp*^{KIX/KIX} mutant mice there is still 30% of wild-type CBP transcriptional activity present. Thus, although *cbp*^{KIX/KIX} mutant mice used in these experiments are homozygous knockins, the CBP activity is not completely abrogated. Future experiments will be necessary to fully understand the role of CBP and other HATs in the molecular mechanisms underlying the modulation of memory formation by HDAC inhibitors.

In summary we have found that HDAC inhibition can transform a learning event that does not lead to long-term memory into an event that does, which parallels what we have observed at the cellular level with regard to synaptic plasticity (18). We have also demonstrated that HDAC inhibition can generate a form of long-term memory that is persistent and lasts beyond the time at which normal memory for object recognition fails. Future studies will reveal additional critical components of chromatin modification mechanisms involved in memory processes such as the targets of CBP and individual HDACs, nonhistone acetylation, and interactions with DNA methylation, other histone modifications, and nucleosome remodeling.

Materials and Methods

Subjects. Male C57BL/6J mice obtained from The Jackson Laboratory were used in most experiments. The *CBP*^{KIX/KIX} homozygous knockin mice were generated as described in ref. 21. Briefly, the targeting vector for CBP contained the point mutations Tyr650Ala, Ala654Gln, and Tyr658Ala. The 3 mutations were introduced into the *CBP* locus of 129P2/OlaHsd-derived E14 embryonic stem cells by homologous recombination. Mice carrying the mutant allele of the KIX domain of CBP (designated *CBP*^{KIX/KIX} for homozygous knockin mice) have been bred and backcrossed in a heterozygous state on a C57BL/6 genetic background for 12 generations. Mice for experiments were generated from heterozygous matings, and wild-type littermates were used as controls. Mice were 8- to 10-weeks of age at the time of the experiment and had free access to food and water in their home cages. Lights were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle, with all behavioral testing carried out during the light portion of the cycle. All experiments were conducted according to National Institutes of Health guidelines for animal care and use and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of California, Irvine. The investigator was blind to the genotype of the mice during behavioral testing.

Object Recognition. The object recognition task consisted of a training phase and a testing phase. Before training, all mice were handled 1–2 min a day for 5 d and were habituated to the experimental apparatus 3 min a day for 3 consecutive days in the absence of objects. The experimental apparatus was a white rectangular open field (30 × 23 × 21.5 cm). During the training phase, mice were placed in the experimental apparatus with two identical objects (100-ml beakers, 1 inch circumference × 1.5 inch height; large blue Lego blocks, 1 × 1 × 2 inches) and were allowed to explore for either 3 or 10 min. The objects were thoroughly cleaned between trials to make sure no olfactory cues were present. Retention was tested at 90 min for short-term memory and 24 h for long-term memory. During these retention tests, mice explored the experimental apparatus for 5 min in the presence of 1 familiar and 1 novel object. The location of the object was counterbalanced so that one-half of the animals in each group saw the novel object on the left side of the apparatus, and the other half saw the novel object on the right side of the apparatus. A third object was used for the experiments in Fig. 3C (a small white light bulb, 1 inch circumference × 1.5 inch height).

All training and testing trials were videotaped and analyzed by individuals blind to the treatment condition and the genotype of subjects to determine the amount of time the mouse spent exploring the novel and familiar objects. A mouse was scored as exploring an object when its head was oriented toward the object within a distance of 1 cm or when the nose was touching the object. The relative exploration time was recorded and expressed by a discrimination index [D.I. = $(t_{\text{novel}} - t_{\text{familiar}})/(t_{\text{novel}} + t_{\text{familiar}}) \times 100\%$]. Mean exploration times were calculated and the discrimination indexes between treatment groups were compared.

A different set of mice was used in each experiment unless otherwise stated. The only experiment in which the same set of mice were examined is in Fig. 3 B and C.

Delivery of HDAC Inhibitors. For most of the experiments, mice received i.p. injections of 1.2 g/kg sodium butyrate (NaBut; Upstate) dissolved in distilled water or an equivalent volume of distilled water alone (vehicle) immediately after NOR training. We and others have used 1.2 g/kg NaBut in previous studies (17, 19). Similar results were obtained with 0.6 g/kg NaBut.

Data Analysis. All NOR data were analyzed using 2-way ANOVAs to examine the interactions. Separate 1-way ANOVAs were used to make specific comparisons when interactions were observed. Student-Newman-Keuls posthoc tests were performed where appropriate. Simple planned comparisons were made using Student *t* tests with alpha levels held at 0.05. A *P* value within a bar in a given figure is derived from comparing testing and training, whereas a # is used to designate a *P* value < 0.05 comparing between treatment groups.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank M. Malvaez and B. Callahan for helpful discussions and critical reading of the manuscript, G.P. Matheos for help with design and construction of the object recognition chambers, and the Friends of the Center for the Neurobiology of Learning and Memory and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for their support. This work was supported by the Whitehall Foundation and National Institutes of Mental Health Grant R01MH081004 (to M.A.W.), predoctoral Training Program in Cellular and Molecular Neuroscience fellowship (to R.M.B.; PI: Arthur D. Lander, T32 NS007444–7), and a Center for the Neurobiology of Learning and Memory (CNLM) Foreign Graduate Student Award (G.K.R.) and the Renée Harwick Visiting Scholars Award (G.K.R.).

- Barrett RM, Wood MA (2008) Beyond transcription factors: The role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn Mem* 15:460–467.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705.
- Alarcon JM, et al. (2004) Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: A model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42:947–959.
- Bourtchouladze R, et al. (2003) A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: Defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10518–10522.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004) CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 42:961–972.
- Oliveira AM, Wood MA, McDonough CB, Abel T (2007) Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits. *Learn Mem* 14:564–572.
- Wood MA, Attner MA, Oliveira AM, Brindle PK, Abel T (2006) A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes. *Learn Mem* 13:609–617.
- Wood MA, et al. (2005) Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn Mem* 12:111–119.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2004) Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14515–14520.
- Bermudez-Rattoni F, Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL (2005) Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 12:447–449.
- Brown MW, Aggleton JP (2001) Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2:51–61.
- Ennaceur A, Aggleton JP (1997) The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behav Brain Res* 88:181–193.
- Mumby DG, Gaskin S, Glenn MJ, Schramek TE, Lehmann H (2002) Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: Memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem* 9:49–57.
- Murray EA, Mishkin M (1998) Object recognition and location memory in monkeys with excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus. *J Neurosci* 18:6568–6582.
- Stupien G, Florian C, Roulet P (2003) Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiol Learn Mem* 80:32–41.
- Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ (2004) Double dissociation between the effects of peri-posterior cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: Heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 24:5901–5908.
- Lattal KM, Barrett RM, Wood MA (2007) Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav Neurosci* 121:1125–1131.
- Vecsey CG, et al. (2007) Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 27:6128–6140.
- Levenson JM, et al. (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279:40545–40559.
- Fontan-Lozano A, et al. (2008) Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Mol Cell Neurosci* 39:193–201.
- Kasper LH, et al. (2002) A transcription-factor-binding surface of coactivator p300 is required for haematopoiesis. *Nature* 419:738–743.
- Cahill L, McGaugh JL, Weinberger NM (2001) The neurobiology of learning and memory: Some reminders to remember. *Trends Neurosci* 24:578–581.
- McGaugh JL (1989) Dissociating learning and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Res Bull* 23:339–345.
- McGaugh JL, Roozendaal B (2009) Drug enhancement of memory consolidation: Historical perspective and neurobiological implications. *Psychopharm* 202:3–14.
- Balderas I, et al. (2008) The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn Mem* 15:618–624.
- Pitkerkin P, Cole E, Cossette MP, Gaskin S, Mumby DG (2008) A limited role for the hippocampus in the modulation of novel-object preference by contextual cues. *Learn Mem* 15:785–791.

Supporting Information

Stefanko et al. 10.1073/pnas.0903964106

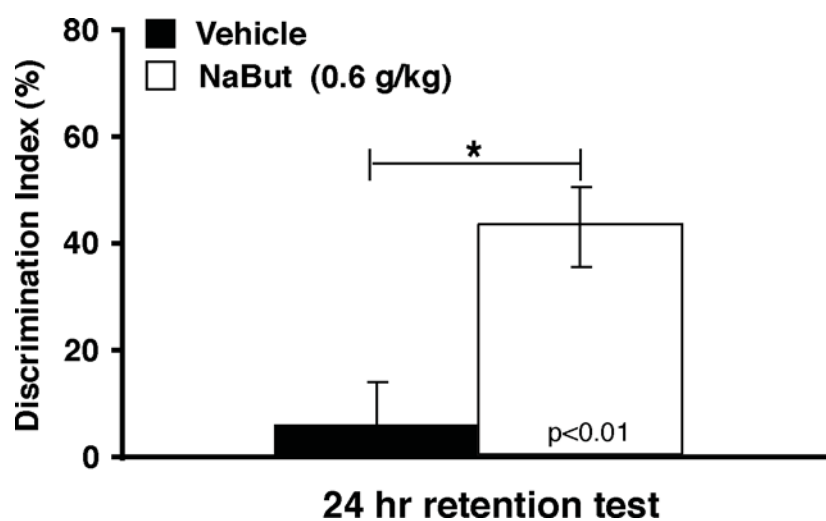


Fig. S1. HDAC inhibition facilitates long-term memory, measured at 24 h, using a low dose of NaBut. During the 24-h retention test, mice receiving 3 min of training followed by an i.p. administration of 0.6 g/kg NaBut ($n = 10$) exhibit a significant preference for the novel object compared with vehicle-treated mice ($n = 10$).

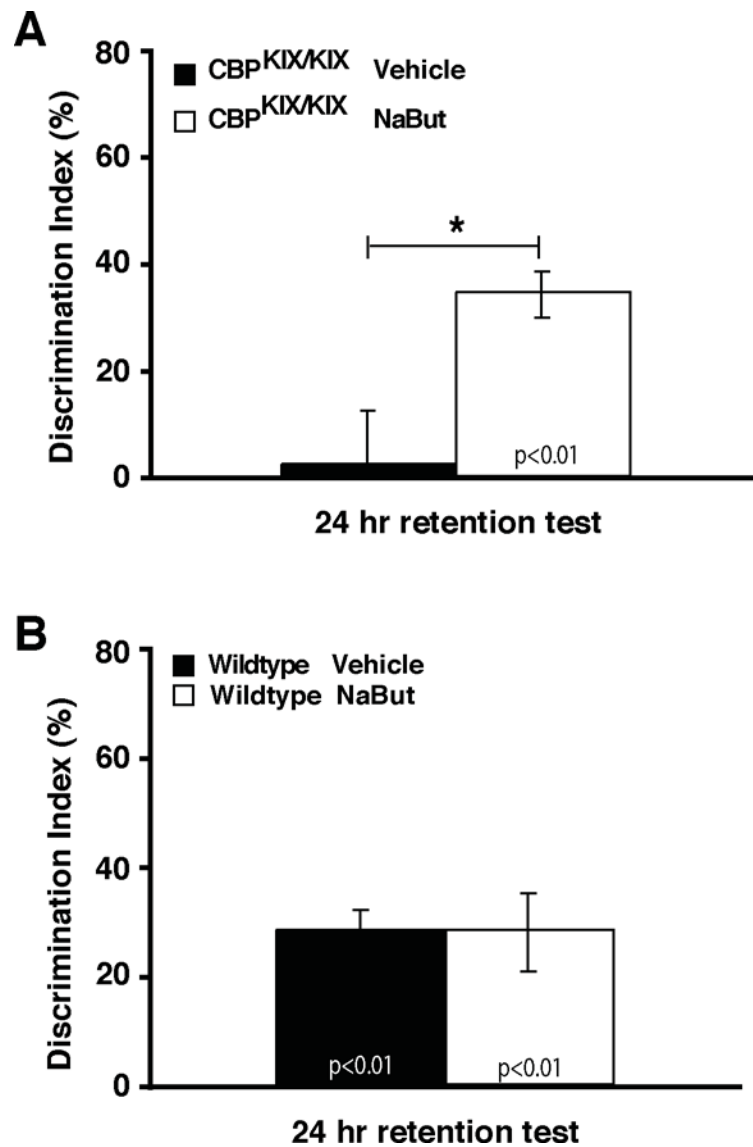


Fig. S2. HDAC inhibition ameliorates memory deficits in CBP^{KIX/KIX} mice. (A) CBP^{KIX/KIX} mice that received 10 min of training immediately followed by an i.p. injection of NaBut ($n = 10$) displayed a significant preference for the novel object during a 24-h retention test compared with vehicle-treated CBP^{KIX/KIX} mice ($n = 13$). (B) Wild-type mice ($n = 13$) that received 10 min of training immediately followed by an i.p. injection of NaBut exhibited a significant preference for the novel object similar to wild-type mice treated with vehicle ($n = 11$) during a 24-h retention test. Vehicle-treated CBP^{KIX/KIX} mice exhibited impaired long-term memory compared with wild-type controls.

INTRODUÇÃO AO ARTIGO 3

Sabendo da importância da amígdala na modulação da memória, investigou-se o efeito da inibição de HDACs através da infusão intra-amigdalar de tricostatina A na memória de condicionamento aversivo ao contexto e de condicionamento aversivo ao indício sonoro em camundongos. Esse manuscrito está em fase de preparação para publicação.

Posttraining intra-amigdala TSA administration enhances contextual, but not cued, fear conditioning memory in mice

Gustavo K. Reolon ^{a*}, Dario Figueroa ^b, Rafael Roesler ^{a, c, d}, Marcelo A. Wood ^b

^a *Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Department of Neurobiology and Behavior, Center for the Neurobiology of Learning and Memory, University of California, Irvine, CA, USA*

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

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

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

E-mail address: gkreolon@gmail.com (Reolon, G. K.)

Number of pages (including figures and tables): 9

Number of figures: 4

Number of tables: 0

ABSTRACT

Posttraining intra-amygdala administration of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) trichostatin A (TSA) enhanced long-term, but not short-term, memory of cued fear conditioning. TSA had no effect on long-term memory of contextual fear conditioning. The results indicate that HDAC inhibition memory effects may depend on the type of memory analysed.

Keywords:

Trichostatin A

Histone deacetylase

Aversive memory

Epigenetics

Amygdala

Gene transcription is required for long-lasting forms of synaptic plasticity and memory storage. Chromatin post-translation modifications (PTMs) are key epigenetic mechanism regulating expression necessary for consolidation. Histone acetylation is by far the most studied, it is regulated by histone acetyltransferases (HATs), which generally activate gene expression, and histone deacetylases (HDACs), which generally repress gene expression (BARRETT & WOOD, 2008). Most works evaluating epigenetic mechanisms on memory focused the hippocampus. Amygdala is central in many forms of memory (MCGAUGH, 2000). We decided to evaluate the effect of amygdala HDACs inhibition on memory.

Male C57BL/6J mice were obtained from Jackson Laboratory. Before surgery, mice were group housed (4 mice per cage). After surgery, they were housed individually. During all times, animals were maintained on a standard 12/12 h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water. Training and testing were performed during the light phase of the cycle between 10:00 A.M. and 5:00 P.M. All experimental procedures were in compliance with the National Institutes of Health guidelines and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of California, Irvine.

Bilateral 26 gauge guide cannulas were used to guide an injection cannula into the amygdala. The guide cannula placement was as follows in relation to bregma: anteroposterior, -1.82 mm; mediolateral, ± 3.0 mm and dorsoventral, -3.5 mm. Injection cannula extended an additional 1.0 mm below the guide cannula (total depth, 4.5 mm). Immediately after conditioning, mice received bilateral intra-amygdala injections of 0.25 μL of 16.5 mM trichostatin A (TSA) (Sigma) dissolved

in 50% ethanol or 50% ethanol per side [vehicle (VEH)] from a 5.0 μ L Hamilton syringe operated by a Harvard Apparatus. Injections occurred over 1 min, and injection cannulas were left in place an additional 30 s to allow the fluid to diffuse. Each side was injected individually, one immediately after the other. The entire injection process took approximately 4 min.

Immunohistochemistry was performed as previously described (VECSEY *et al.*, 2007). Briefly, four hours after intra-amygdala injection with TSA or vehicle, mice were anesthetized with isoflurane and transcardially perfused with PBS, followed by 4.0% paraformaldehyde in PBS using a peristaltic perfusion pump. Fixed brains were dissected, postfixed overnight and then cryoprotected in 30% sucrose at 4°C. Coronal sections were cut at a thickness of 30 μ m and collected in PBS. Floating sections were blocked for 50 min at room temperature in 8% normal goat serum (NGS) with 0.3% Triton X-100 in PBS and then incubated overnight at 4°C in 2% NGS, 0.3% Triton X-100 in PBS with anti-acetyl histone H3K14 antibody (1:1000; Millipore, EUA) and for 2 h at room temperature with FITC-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:1000; Millipore, EUA). Sections were washed in PBS three times for 5 min each before and after each incubation step. Sections were mounted on slides using ProLong Gold with DAPI (Invitrogen, EUA). Amygdala images were obtained using Olympus BX51TF-5 microscope. On each slide, the same exposition parameters were used for the two groups.

Fear conditioning experiments were performed in chambers using the methods described previously (WOOD *et al.*, 2005). During all sessions, animals were filmed and freezing was analysed by a blind observer. Mice were handled for

7 consecutive days for 1 min each day. For contextual fear conditioning (CoFC), C57BL/6J mice were placed into the conditioning chamber and received a 2 s, 0.75 mA scrambled footshock 2.5 min after placement into the chamber. Mice were removed from the chamber after 3 min. During testing, mice received one 5 min exposure to the same conditioned context in the absence of shock 24 h after conditioning.

For cued fear conditioning (CuFC), C57BL/6J mice were placed into the chamber, and the cue (white noise) was presented from 2 to 2.5 min after placement into the chamber and coterminated with a 2 s, 0.75 mA footshock. Mice were removed from the chamber after 3 minutes. On testing, 2 or 24 h after training, mice in the cued group received one to 5 minutes exposure to a novel context (same conditioning chamber, but with smooth flat floor, altered dimensions, and a novel odorant) for 0–2 minutes [pre-conditioning stimulus (CS)], followed by exposure to the cue from 2 to 5 minutes (CS). Conditioning was assayed by measuring freezing behavior, the complete absence of movement. Different sets of mice were used for contextual and cued conditioning experiments.

Intra-amygdala TSA infusion increased H3K14 acetylation 4 h after administration (Figure 1). This enhance was not seen in the adjacent areas, indicating that on our conditions, acetylation is locally restricted to the amygdala.

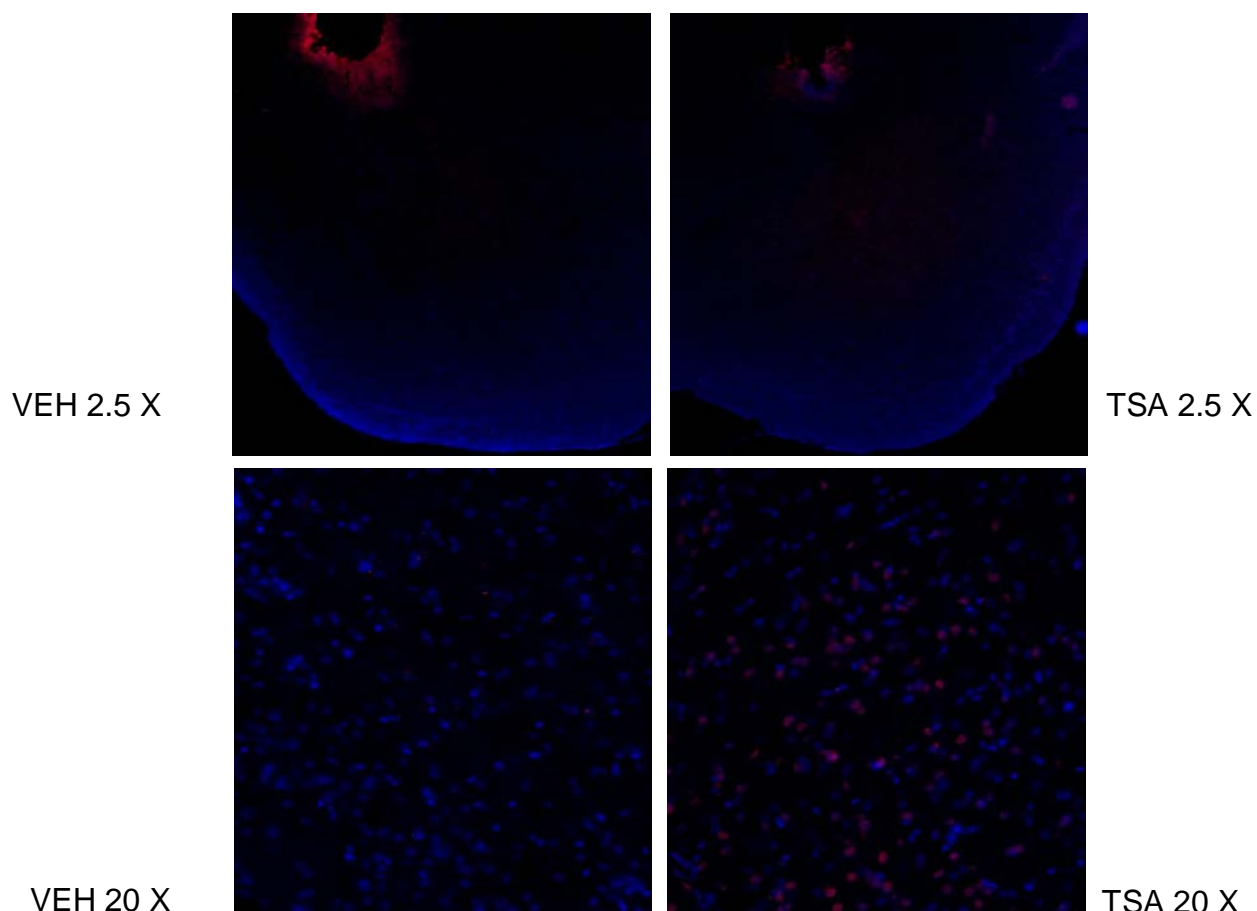


Figure 1: Intra-amygdala injection of TSA locally increases histone H3K14 acetylation. Perfusion-fixed and immunostained coronal brain sections were prepared from mice killed 4 h after receiving Intra-amygdala injections of vehicle (50% ethanol) or TSA (16.5 mM TSA). A representative section from a mouse treated with vehicle shows negligible histone H3 acetylation (VEH, top left). Bottom left shows higher-magnification 20X image of BLA. A representative section from a mouse treated with TSA shows increased histone H3K14 acetylation (TSA, top right). Bottom right shows higher-magnification 20X image of BLA. Nuclear

staining with DAPI demonstrates normal amygdala morphology in sections from both vehicle- and TSA-treated mice.

Intra-amygdala TSA infusion immediately after CuFc training enhances long-term memory (LTM) on a 24 h test (Figure 2). TSA has no effect on a 2 h short-term memory (STM) test (Figure 3). Our results are similar with the ones from Yeh and co-workers (2004): they found that pre-training intra-amygdala TSA infusion enhanced fear-potentiated startle LTM, but not STM. They showed that fear-potentiated startle increased NF- κ B p65 acetylation, this acetylation increased DNA binding. It is possible that our results are, at least in part, mediated by NF- κ B acetylation. TSA could also increase amygdala transcription of genes associated with memory through

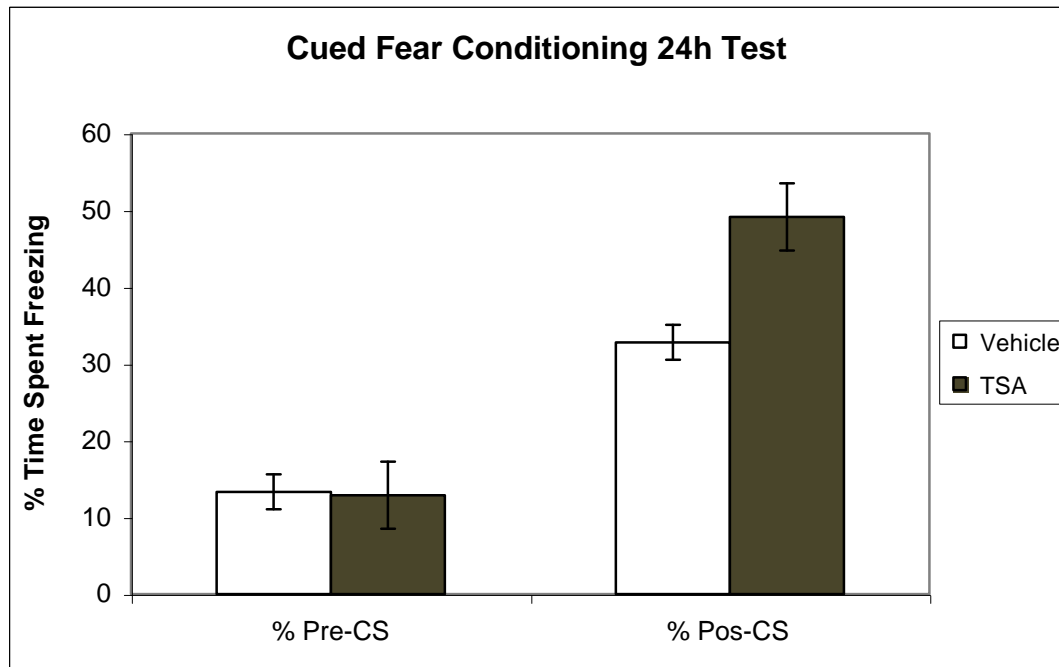


Figure 2: Intra-amygdala TSA immediately after cued fear conditioning increased freezing levels in a 24 h retention test. Mice receiving TSA immediately after conditioning showed increased levels during (CS), but not before (Pre CS), the presentation of the tone cue. * $p < 0.05$.

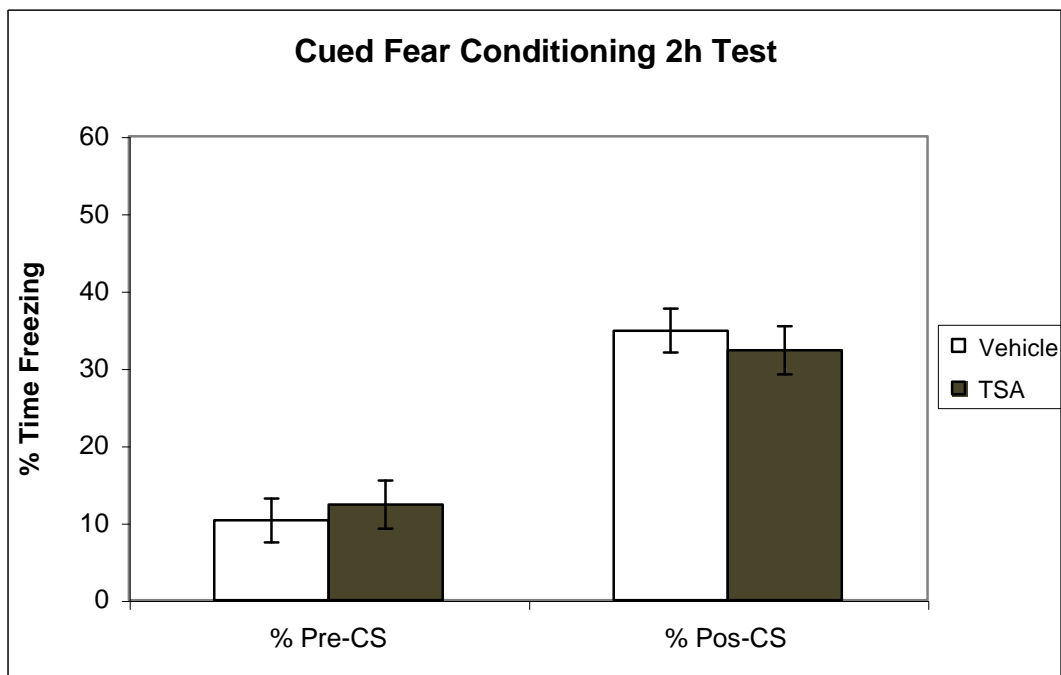


Figure 3: Intra-amygdala TSA immediately after cued fear conditioning showed no difference in freezing levels in a 2 h retention test. Mice receiving either TSA or vehicle immediately after conditioning showed no difference in levels of freezing during a cued fear conditioning test 2 h after conditioning, either before (Pre CS) or during (CS) presentation of the tone cue.

a CREB-CBP dependent mechanism, as it was seen on the hippocampus (VECSEY *et al.*, 2007). Also, both possibilities are not mutually exclusive. Our results and those of the literature showing that HDACis enhance LTM but not STM are in agreement with HDACis memory effects being mediated by alterations on gene expression. HDACis have been found enhancing different types of memories: contextual fear conditioning (LEVENSON, 2004; MILLER *et al.*, 2008) novel-object recognition memory (STEFANKO *et al.*, 2009), object location memory (ROOZENDAAL *et al.*, 2010), conditioned place preference memory (MALVAEZ *et al.*, 2010), eyeblink classical conditioning memory (FONTÁN-LOZANO *et al.*, 2008), context-signal memory (FEDERMAN *et al.*, 2009) and cued fear conditioning memory (BREDY & BARAD, 2008). However, most works used systemic or intrahippocampal administration.

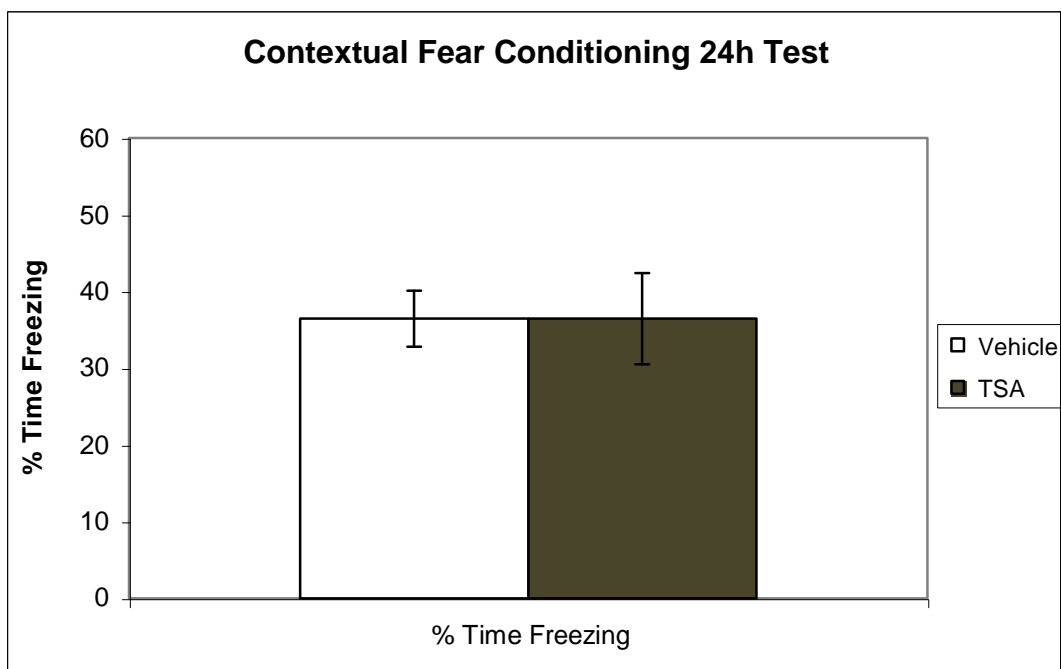


Figure 4: Intra-amygdala TSA immediately after contextual fear conditioning showed no difference in freezing levels in a 24 h retention test. Mice receiving either TSA or vehicle immediately after conditioning showed no difference in levels of freezing.

Posttraining amygdala TSA infusion did not enhance contextual fear conditioning memory (Figure 4). That was unexpected, as this task depends both on the hippocampus and amygdala. In conclusion, the present results indicate that intra-amygdala TSA can enhance cued, but not contextual fear conditioning memory, indicating that HDAC inhibition memory effects may depend on the type of memory analysed.

Acknowledgements

This research was supported by the National Institutes of Mental Health grant R01MH081004, Whitehall Foundation to M.A.W., Center for the Neurobiology of Learning and Memory (CNLM) Foreign Graduate Student Award (G.K.R.), Renée Harwick Visiting Scholars Award (G.K.R.), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grants 303703/2009-1 to R.R, and the South American Office for Anticancer Drug Development (R.R.). G.K.R. is a CNPq fellowship recipient.

References

Barrett RM, Wood MA (Beyond transcription factors: The role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learning & Memory* 15:460-467.2008).

Bredy TW, Barad M (The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem* 15:39-45.2008).

Federman N, Fustinana MS, Romano A (Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. *Learning & Memory* 16:600-606.2009).

Fontán-Lozano Á, Romero-Granados R, Troncoso J, Múnera A, Delgado-García JM, Carrión ÁM (Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Molecular and Cellular Neuroscience* 39:193-201.2008).

Levenson JM (Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus. *Journal of Biological Chemistry* 279:40545-40559.2004).

Malvaez M, Sanchis-Segura C, Vo D, Lattal KM, Wood MA (Modulation of Chromatin Modification Facilitates Extinction of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference. *Biological Psychiatry* 67:36-43.2010).

McGaugh JL (Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.2000).

Miller CA, Campbell SL, Sweatt JD (DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory* 89:599-603.2008).

Roosendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP, Haettig J, Wood MA (Membrane-Associated Glucocorticoid Activity Is Necessary for Modulation of Long-Term Memory via Chromatin Modification. *Journal of Neuroscience* 30:5037-5046.2010).

Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA (Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9447-9452.2009).

Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T, Wood MA (Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB: CBP-Dependent Transcriptional Activation. *Journal of Neuroscience* 27:6128-6140.2007).

Wood MA, Kaplan MP, Park A, Blanchard EJ, Oliveira AM, Lombardi TL, Abel T (Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn Mem* 12:111-119.2005).

DISCUSSÃO

A regulação da cromatina mostrou-se um mecanismo essencial no controle da expressão gênica envolvida na plasticidade sináptica e na memória (TANIURA *et al.*, 2007; MEHLER, 2008; FRANKLIN & MANSUY, 2010). Dentre as diversas PTMs que ocorrem em histonas, a acetilação, a fosforilação e a metilação foram as mais estudadas. Muitos trabalhos avaliaram essas modificações em regiões específicas do genoma, enquanto a maioria verificou sua modificação ao longo de toda a cromatina. A manipulação farmacológica através de HDACs trouxe grandes descobertas sobre o envolvimento da acetilação em diversos processos do CNS [para revisões ver LEVENSON & SWEATT, (2005); SHARMA *et al.*, (2005); DULAC, (2010); MCQUOWN & WOOD, (2010); ZOCCHI & SASSONE-CORSI, (2010)].

O envelhecimento e a neurodegeneração estão associados à diminuição da acetilação de histonas e da metilação do DNA (ROUAUX *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2009; RIVIECCIO *et al.*, 2009). PELEG *et al.* (2010b) tiveram resultados interessantes: a acetilação de H3 e de H4 em diferentes resíduos de aminoácidos não estava alterada nos níveis hipocámpais basais na comparação de camundongos jovens e velhos. Esse mesmo padrão foi observado na atividade e na quantidade de mRNA e de proteínas de HATs e de HDACs. A expressão gênica basal alterou-se pouco com o envelhecimento, indicando que o envelhecimento não altera a homeostase basal da acetilação de histonas no hipocampo.

A dimetilação de H3K9 estava diminuída em oligodendrócitos do corpo caloso de camundongos com oito meses de idade quando comparada àquela dos animais com três semanas (SHEN *et al.*, 2008). Na comparação entre os dois grupos, os animais de oito meses apresentaram elevação na acetilação total de H3 e diminuição da atividade e da expressão de HDACs, resultando na alteração da expressão gênica. Mesmo levando em consideração as diferenças entre os dois trabalhos anteriormente citados [regiões cerebrais, métodos de análise e tipos celulares observados (específico *versus* total)], é possível especular que a acetilação de histonas no estado basal seja mais heterogênea no hipocampo de animais velhos do que a observada por PELEG *et al.* (2010b).

Após CoFC, a elevação da acetilação de H4K12 e da transcrição foi observada nos camundongos adultos jovens, mas não nos velhos (PELEG *et al.*, 2010), indicando que o aumento da acetilação atividade-dependente esteja prejudicado nos animais velhos, podendo ser responsável pela deficiência na transcrição necessária para a LTM.

FISCHER *et al.* (2007) avaliaram a acetilação de H4K12. Animais superexpressando HDAC2 apresentaram déficit na LTM e diminuição da acetilação de H4K12 no hipocampo. Animais knockout para HDAC2 apresentaram melhora na LTM e aumento da acetilação hipocampal de H4K12. O EE melhorou a memória de animais com neurodegeneração e incrementou a acetilação de H4K12 no hipocampo. Os resultados de PELEG *et al.* (2010a) e de FISCHER *et al.* (2007) indicam que a acetilação de H4K12 seja importante para a formação da LTM.

Estudos analisaram o efeito do tratamento crônico com NaB, o qual aprimorou a performance motora (avaliada no *rotarod*) em modelos de doenças neurodegenerativas (FERRANTE *et al.*, 2003; YING *et al.*, 2006) e reverteu o prejuízo na memória de animais transgênicos expressando p25 (FISCHER *et al.*, 2007). A administração crônica de SAHA também melhorou o desempenho motor em um modelo murino da doença de Huntington (HOCKLY *et al.*, 2003). A infusão intra-hipocampal de SAHA pré-treino reverteu o déficit da memória em camundongos velhos (PELEG *et al.*, 2010).

HDACis melhoraram a memória em dois modelos de neurodegeneração quando administrados no pré-treino (FONTÁN-LOZANO *et al.*, 2008). Trabalhos que avaliaram a melhora da memória ou de outros déficits através da administração de HDACis em modelos de neurodegeneração ou de envelhecimento não especificaram a fase da memória afetada, nem sua janela temporal de suscetibilidade.

Nosso trabalho (REOLON *et al.*, 2011) mostrou, pela primeira vez, que uma única injeção de NaB imediatamente após o treino de NOR melhora a LTM em ratos com 24 meses. Avaliando o período no qual NaB melhorou a memória, encontramos que a injeção seis horas depois do treino não apresentou efeito, indicando que a melhora observada é específica para a fase inicial da consolidação. Em ratos de três meses sem déficit de memória, a administração de NaB após o treino de NOR não melhorou a LTM.

A injeção de NaB imediatamente e seis horas após o aprendizado de CSM em *Chasmagnathus granulatus* melhorou a LTM. Embora esses achados sejam

discrepantes dos nossos, é possível que as diferenças encontradas devam-se a dissimilaridades da ação de NaB em outras espécies e/ou disparidades na consolidação das duas tarefas. A infusão intra-hipocampal de TSA imediatamente - mas não três horas - após o treino melhorou a memória de NOR testada dois dias depois do treino (protocolo no qual a memória é observada 24 horas, mas não 48, após o treino) (ZHAO *et al.*, 2010). A dose e o veículo utilizados (16,5 nM por hipocampo diluído em álcool 50%) nesse trabalho são os mesmos de VECSEY *et al.* (2007), no qual TSA intra-hipocampal tem o pico da acetilação quatro horas após a infusão.

É possível que, no experimento de ZHAO *et al.* (2010), a infusão tardia de TSA tenha induzido o auge da acetilação quatro horas após a administração, ou seja, sete horas após o treino de NOR. A acetilação total de H3 e de H4 intensificou-se no hipocampo 30 minutos após a injeção ip de NaB - mesma dose utilizada em nosso trabalho - (DASH *et al.*, 2009). Assim, o aumento da acetilação hipocampal nas condições deste estudo ocorreu provavelmente seis horas e meia após o treino.

O envolvimento do hipocampo na tarefa de NOR é controverso. A inativação reversível do hipocampo com o agonista gabaérgico muscimol imediatamente e em três horas, mas não em seis horas, após o treino prejudicou a LTM (DE LIMA *et al.*, 2006). Muscimol antes do teste prejudicou a memória de OLT, mas não a de NOR (HAETTIG *et al.*, 2011). A administração sistêmica de cetamina ocasionou dano à memória de NOR e estava associada à diminuição de BDNF hipocampal (GOULART *et al.*, 2010).

Embora o envolvimento do hipocampo na memória de NOR seja polêmico, a infusão de TSA pós-treino teve efeito na LTM, o que indica envolvimento do hipocampo no método utilizado por ZHAO *et al.* (2010). Os achados de ZHAO *et al.* (2010), ou seja, a ausência de efeito de TSA 3 horas após o treino, corroboram os nossos resultados, que mostraram ausência de efeito de NaB seis horas após o treino e a brevidade do período no qual HDACis melhoram a memória de NOR. A ausência de efeito de NaB na LTM de ratos de três meses pode ser devido a um “efeito-teto”, o que impediria melhora na memória. A utilização de um protocolo não gerador de LTM poderia auxiliar na elucidação dessa questão.

Estímulos que não induzem formas de plasticidade sináptica e de memória de longa duração *per se* quando associados à inibição de HDACs ou à sua deleção levaram à observação de LTF, LTP e LTM. A administração de TSA e de 5-HT, que não gera LTF em neurônios de *Aplysia*, induziu LTF (GUAN *et al.*, 2002). Um protocolo de indução exclusiva de e-LTP associado à TSA resultou em I-LTP (VECSEY *et al.*, 2007). Em condições experimentais que geram unicamente e-LTP, fatias hipocâmpais de animais com HDAC2 deletada mostraram I-LTP (GUAN *et al.*, 2009).

Em camundongos, a inibição de HDACs por NaB ou TSA resultou na LTM de NOR em um protocolo no qual somente a STM era observada (FONTÁN-LOZANO *et al.*, 2008). Além disso, essa inibição associada ao treino fraco resultou nos mesmos níveis hipocâmpais de acetilação e de expressão gênica de *c-fos* e *BDNF* observados em animais treinados em um protocolo desencadeador da LTM, indicando que HDACis permitem, sob a ação de um estímulo fraco,

“alcançar” o mesmo grau de acetilação necessário para a transcrição de genes necessários à LTM.

Utilizando um protocolo parcial de extinção, BREDY & BARAD (2008) encontraram que a administração de VPA em camundongos resultou na extinção, a qual não foi observada no grupo controle. Um trabalho interessante de ROOZENDAAL *et al.* (2010) mostrou que um treino fraco de NOR ou OLM associado à corticosterona levou à LTM e que a corticosterona elevou a acetilação de H3K14 no hipocampo e no córtex insular, indicando que um dos mecanismos associados à melhora da memória por corticosterona ocorra através da acetilação de histonas.

Nosso artigo (STEFANKO *et al.*, 2009) mostrou que, quando camundongos receberam NaB sistêmico após o treino fraco (treino de três minutos) que não gerou a STM nem a LTM, os animais demonstraram LTM, mas não STM. Até o presente momento, esse é o único trabalho a mostrar que um treino fraco a ponto de não gerar a STM ou a LTM em condições não patológicas seja capaz de induzir a LTM associado à inibição de HDACs. Em outros trabalhos com resultados semelhantes aos nossos, a STM esteve presente ou não foi verificada. É possível que a inibição de HDACs e o consequente aumento da acetilação de histonas sejam capazes de interagir com sinais do treino fraco gerando a LTM.

FONTÁN-LOZANO *et al.* (2008) discutem a possibilidade de HDACs diminuírem o “limiar” para a formação da LTM através do aumento da expressão gênica. VECSEY *et al.* (2007) mostraram que a melhora da LTP e da LTM depende de CREB e de sua interação com CBP e que TSA após o treino de

CoFC eleva a transcrição de dois genes envolvidos com a consolidação. GUAN *et al.* (2009) evidenciaram que HDAC2 está associado fisicamente e funcionalmente aos promotores de genes envolvidos na LTM.

Os achados indicando que estímulos fracos resultem na plasticidade sináptica e na memória de longa duração quando associados aos HDACs permitem enriquecer nosso conhecimento acerca do papel das HDACs como reguladores negativos da plasticidade sináptica e da memória. Assumindo que os efeitos observados pelos HDACs sejam mediados pela inibição específica da desacetilação de histonas, e não pela desacetilação de outras proteínas, poderíamos concluir que o estímulo do treino fraco não conseguiu engajar a transcrição necessária para a consolidação. Se isso for verdade, esperar-se-ia que HDACs atuassem como uma barreira para a transcrição de genes envolvidos na plasticidade sináptica e na memória.

Nos três trabalhos abaixo citados, HDACs foram observadas com a função de impedir a expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica e à memória. No promotor de C/EBP, existe competição entre CREB1-CBP e CREB2-HDAC5 (GUAN *et al.*, 2002). No estado basal, CREB2-HDAC5 está associado ao promotor, inibindo a acetilação e a transcrição. Posterior à estimulação, ocorre seu deslocamento e CREB1-CBP liga-se ao promotor, havendo aumento da acetilação de histonas e da transcrição. A HDAC2 é um regulador negativo da plasticidade sináptica e da memória através da sua associação física aos promotores de genes necessários à consolidação (GUAN *et al.*, 2009). A HDAC3

também foi demonstrada como um controlador negativo da expressão gênica necessária para a consolidação (MCQUOWN *et al.*, 2011).

A intensidade do estímulo parece ser um ponto-chave para observar o aumento da acetilação e da fosforilação de histonas. Foi visto que o incremento da fosforilação de H3S10 depois do nado forçado era maior em temperaturas mais frias, ou seja, em ambiente com maior estímulo (BILANG-BLEUEL *et al.*, 2005). A indução de estresse através da exposição à novidade com variações na intensidade de luz teve achados parecidos: maior intensidade de luz resultando em maior aumento da fosforilação de H3S10 e da fosfoacetilação de H3S10 e de H3K14 (CHANDRAMOHAN *et al.*, 2007). Esses achados indicam que a acetilação e a fosforilação de histonas são dependentes da intensidade do estímulo estressante.

FEDERMAN *et al.* (2009) verificaram o efeito da intensidade do treino na acetilação de histonas. Em *Chasmagnathus granulatus*, o treino forte, mas não o fraco, induziu aumento da acetilação de H3. Esses resultados sugerem que a intensidade do treino regule a acetilação de histonas. Os autores mediram a acetilação total, podendo haver mudanças não captadas em localizações específicas do genoma.

O hipocampo é a estrutura na qual as PTMs de histonas foram mais estudadas (Anexo B: Tabela 2). Até o momento, somente um artigo enfocou a acetilação de proteínas na amígdala (YEH *et al.*, 2004). Nossos experimentos mostraram que TSA intra- amigdalár melhorou a LTM de CuFC, mas não de CoFC.

A acetilação total de H3 aumentou após diversas tarefas comportamentais: o condicionamento aversivo à comida (DANILOVA *et al.*, 2010), o EBCC e o NOR (FONTÁN-LOZANO *et al.*, 2008) e a reexposição ao contexto do treino de CoFC (LUBIN & SWEATT, 2007). Até agora, a acetilação de H3K14 é a marca mais estudada em plasticidade sináptica e memória (Anexo B: Tabela 2), estando aumentada frente a diferentes estímulos: no hipocampo após CoFC (LEVENSON, 2004; CHWANG, 2006; MILLER *et al.*, 2008; PELEG *et al.*, 2010), no hipocampo após CuFC (CHWANG *et al.*, 2007), no hipocampo e córtex insular após NOR associado à corticosterona (ROOZENDAAL *et al.*, 2010), no hipocampo após NOR (KOSHIBU *et al.*, 2009), no hipocampo (mas não no córtex) após EE (FISCHER *et al.*, 2007) e no hipocampo após reexposição ao contexto do treino de CoFC (LUBIN & SWEATT, 2007).

As PTMs em histonas podem aumentar a transcrição gênica necessária durante a consolidação e/ou mediar mudanças mais duradouras na expressão gênica (WOOD *et al.*, 2006b). Os HDACis são excelentes ferramentas farmacológicas e possivelmente terapêuticas. Contudo, seus mecanismos moleculares responsáveis pela melhora na formação da memória estão longe de ser satisfatoriamente compreendidos.

CONCLUSÃO

Abaixo estão apresentadas as principais conclusões desta tese:

- a administração intraperitoneal de NaB na dose de 1,2 g/kg imediatamente após o treino na tarefa de NOR abrandou o prejuízo na LTM associado ao envelhecimento em ratos de 24 meses;
- a mesma dose de NaB utilizada i.p. seis horas após o treino de NOR não teve efeito na LTM em ratos de 18 meses, indicando que a melhora observada pelo HDACi seja temporalmente restrita à fase inicial da consolidação;
- a injeção de NaB imediatamente após o treino não teve efeito na LTM de NOR em ratos de três meses;
- em camundongos treinados no protocolo de NOR não indutor *per se* da memória de curta ou longa duração observou-se a memória 24 horas e sete dias após o treino quando receberam NaB i.p. após a aquisição, sugerindo que um aprendizado que não gera STM ou LTM, quando pareado ao NaB, permita a formação e a persistência por tempo estendido da LTM;
- os camundongos treinados no protocolo de NOR de indução de memória de 24 horas - mas não de sete dias - após aprendizado não apresentaram melhora no teste de sete dias quando receberam NaB i.p. uma hora antes do referido teste, sugerindo que a inibição de HDACs não tenha efeito na evocação;
- a administração i.p. de NaB após a aquisição reverteu o déficit na memória de NOR sete dias após o treino dos camundongos com a proteína de ligação à

CREB mutada no sítio de ligação à CREB, indicando que esse sítio não seja necessário na melhora da memória de NOR por NaB;

– a infusão de tricostatina A - um HDACi - imediatamente após o treino na amígdala de camundongos melhorou a LTM de condicionamento aversivo ao indício sonoro, mas não de condicionamento aversivo ao contexto, indicando que o efeito gerado pela inibição de HDACs possa depender da memória analisada;

Em suma, encontramos que NaB reverteu o déficit na LTM de NOR de ratos envelhecidos, melhorou a memória em camundongos adultos jovens com um treino não gerador da LTM e prolongou a persistência da memória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABEL T. & ZUKIN R. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(1): 57-64, 2008.
2. ALARCÓN J. M.; MALLERET G.; TOUZANI K.; VRONSKAYA S.; ISHII S.; KANDEL E. R. & BARCO A. Chromatin Acetylation, Memory, and LTP Are Impaired in CBP+/- Mice A Model for the Cognitive Deficit in Rubinstein-Taybi Syndrome and Its Amelioration. *Neuron*, 42(6): 947-959, 2004.
3. ALBERINI C. M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev*, 89(1): 121-145, 2009.
4. 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.
5. BERTRAN-GONZALEZ J.; HÅKANSSON K.; BORGKVIST A.; IRINOPOULOU T.; BRAMI-CHERRIER K.; USIELLO A.; GREENGARD P.; HERVÉ D.; GIRAULT J.-A.; VALJENT E. & FISONE G. Histone H3 Phosphorylation is Under the Opposite Tonic Control of Dopamine D2 and Adenosine A2A Receptors in Striatopallidal Neurons. *Neuropsychopharmacology*, 34(7): 1710-1720, 2009.
6. BILANG-BLEUEL A.; ULBRICHT S.; CHANDRAMOHAN Y.; DE CARLI S.; DROSTE S. K. & REUL J. M. H. M. Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response. *European Journal of Neuroscience*, 22(7): 1691-1700, 2005.
7. BORRELLI E.; NESTLER E. J.; ALLIS C. D. & SASSONE-CORSI P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron*, 60(6): 961-974, 2008.
8. BOURTCHOULADZE R.; LIDGE R.; CATAPANO R.; STANLEY J.; GOSSWEILER S.; ROMASHKO D.; SCOTT R. & TULLY T. A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(18): 10518-10522, 2003.
9. BRAMI-CHERRIER K.; LAVAUUR J.; PAGES C.; ARTHUR J. S. & CABOCHE J. Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *J Neurochem*, 101(3): 697-708, 2007.

10. BREDY T. W. & BARAD M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem*, 15(1): 39-45, 2008.
11. 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. *Learn Mem*, 14(4): 268-276, 2007.
12. BUCHWALD M.; KRÄMER O. H. & HEINZEL T. HDACi – Targets beyond chromatin. *Cancer Letters*, 280(2): 160-167, 2009.
13. BURKE S. N. & BARNES C. A. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*, 7(1): 30-40, 2006.
14. CHANDRAMOHAN Y.; DROSTE S. K.; ARTHUR J. S. C. & REUL J. M. H. M. The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-d-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *European Journal of Neuroscience*, 27(10): 2701-2713, 2008.
15. CHANDRAMOHAN Y.; DROSTE S. K. & REUL J. M. H. M. Novelty stress induces phospho-acetylation of histone H3 in rat dentate gyrus granule neurons through coincident signalling via the N-methyl-d-aspartate receptor and the glucocorticoid receptor: relevance for c-fos induction. *Journal of Neurochemistry*, 101(3): 815-828, 2007.
16. CHUANG D.-M.; LENG Y.; MARINOVA Z.; KIM H.-J. & CHIU C.-T. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends in Neurosciences*, 32(11): 591-601, 2009.
17. CHWANG W. B. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learning & Memory*, 13(3): 322-328, 2006.
18. CHWANG W. B.; ARTHUR J. S.; SCHUMACHER A. & SWEATT J. D. The Nuclear Kinase Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 1 Regulates Hippocampal Chromatin Remodeling in Memory Formation. *Journal of Neuroscience*, 27(46): 12732-12742, 2007.
19. COLLINS A.; HILL L. E.; CHANDRAMOHAN Y.; WHITCOMB D.; DROSTE S. K. & REUL J. M. Exercise improves cognitive responses to psychological stress through enhancement of epigenetic mechanisms and gene expression in the dentate gyrus. *PLoS One*, 4(1): e4330, 2009.
20. CROSIO C.; HEITZ E.; ALLIS C. D.; BORRELLI E. & SASSONE-CORSI P. Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce

specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *J Cell Sci*, 116(Pt 24): 4905-4914, 2003.

21. DANILOVA A. B.; KHARCHENKO O. A.; SHEVCHENKO K. G. & GRINKEVICH L. N. Histone H3 Acetylation is Asymmetrically Induced Upon Learning in Identified Neurons of the Food Aversion Network in the Mollusk *Helix Lucorum*. *Front Behav Neurosci*, 4: 180, 2010.

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

23. DE LIMA M. N.; LUFT T.; ROESLER R. & SCHRODER N. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci Lett*, 405(1-2): 142-146, 2006.

24. DULAC C. Brain function and chromatin plasticity. *Nature*, 465(7299): 728-735, 2010.

25. FEDERMAN N.; FUSTINANA M. S. & ROMANO A. Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. *Learning & Memory*, 16(10): 600-606, 2009.

26. FERRANTE R. J.; KUBILUS J. K.; LEE J.; RYU H.; BEESEN A.; ZUCKER B.; SMITH K.; KOWALL N. W.; RATAN R. R.; LUTHI-CARTER R. & HERSCH S. M. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci*, 23(28): 9418-9427, 2003.

27. 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.

28. FISCHER A.; SANANBENESI F.; WANG X.; DOBBIN M. & TSAI L.-H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, 447(7141): 178-182, 2007.

29. FONTÁN-LOZANO Á.; ROMERO-GRANADOS R.; TRONCOSO J.; MÚNERA A.; DELGADO-GARCÍA J. M. & CARRIÓN Á. M. Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(2): 193-201, 2008.

30. FRANKLIN T. B. & MANSUY I. M. The prevalence of epigenetic mechanisms in the regulation of cognitive functions and behaviour. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(4): 441-449, 2010.

31. GAO J.; WANG W. Y.; MAO Y. W.; GRAFF J.; GUAN J. S.; PAN L.; MAK G.; KIM D.; SU S. C. & TSAI L. H. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature*, 466(7310): 1105-1109, 2010.
32. GOLDBERG S.; VISOCHEK L.; GILADI E.; GOZES I. & COHEN-ARMON M. PolyADP-ribosylation is required for long-term memory formation in mammals. *Journal of Neurochemistry*, 111(1): 72-79, 2009.
33. GOULART B. K.; DE LIMA M. N.; 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(4): 969-973, 2010.
34. GUAN J.-S.; HAGGARTY S. J.; GIACOMETTI E.; DANNENBERG J.-H.; JOSEPH N.; GAO J.; NIELAND T. J. F.; ZHOU Y.; WANG X.; MAZITSCHKE R.; BRADNER J. E.; DEPINHO R. A.; JAENISCH R. & TSAI L.-H. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*, 459(7243): 55-60, 2009.
35. GUAN Z.; GIUSTETTO M.; LOMVARDAS S.; KIM J.-H.; MINIACI M. C.; SCHWARTZ J. H.; THANOS D. & KANDEL E. R. Integration of Long-Term-Memory-Related Synaptic Plasticity Involves Bidirectional Regulation of Gene Expression and Chromatin Structure. *Cell*, 111(4): 483-493, 2002.
36. GUPTA S.; KIM S. Y.; ARTIS S.; MOLFESE D. L.; SCHUMACHER A.; SWEATT J. D.; PAYLOR R. E. & LUBIN F. D. Histone Methylation Regulates Memory Formation. *Journal of Neuroscience*, 30(10): 3589-3599, 2010.
37. HAETTIG J.; STEFANKO D. P.; MULTANI M. L.; FIGUEROA D. X.; MCQUOWN S. C. & WOOD M. A. HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learn Mem*, 18(2): 71-79, 2011.
38. HENIKOFF S. Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet*, 9(1): 15-26, 2008.
39. HOCKLY E.; RICHON V. M.; WOODMAN B.; SMITH D. L.; ZHOU X.; ROSA E.; SATHASIVAM K.; GHAZI-NOORI S.; MAHAL A.; LOWDEN P. A.; STEFFAN J. S.; MARSH J. L.; THOMPSON L. M.; LEWIS C. M.; MARKS P. A. & BATES G. P. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4): 2041-2046, 2003.
40. JENUWEIN T. & ALLIS C. D. Translating the histone code. *Science*, 293(5532): 1074-1080, 2001.

41. JIANG Y.; JAKOVCEVSKI M.; BHARADWAJ R.; CONNOR C.; SCHROEDER F. A.; LIN C. L.; STRAUBHAAR J.; MARTIN G. & AKBARIAN S. Setdb1 Histone Methyltransferase Regulates Mood-Related Behaviors and Expression of the NMDA Receptor Subunit NR2B. *Journal of Neuroscience*, 30(21): 7152-7167, 2010.
42. KALKHOVEN E. CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol*, 68(6): 1145-1155, 2004.
43. KANDEL E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544): 1030-1038, 2001.
44. KORZUS E.; ROSENFELD M. G. & MAYFORD M. CBP Histone Acetyltransferase Activity Is a Critical Component of Memory Consolidation. *Neuron*, 42(6): 961-972, 2004.
45. 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.
46. KRAMER J. M.; KOCHINKE K.; OORTVELD M. A.; MARKS H.; KRAMER D.; DE JONG E. K.; ASZTALOS Z.; WESTWOOD J. T.; STUNNENBERG H. G.; SOKOLOWSKI M. B.; KELEMAN K.; ZHOU H.; VAN BOKHOVEN H. & SCHENCK A. Epigenetic regulation of learning and memory by *Drosophila* EHMT/G9a. *PLoS Biol*, 9(1): e1000569, 2011.
47. LEVENSON J. M. Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39): 40545-40559, 2004.
48. LEVENSON J. M. Evidence That DNA (Cytosine-5) Methyltransferase Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23): 15763-15773, 2006.
49. LEVENSON J. M. & SWEATT J. D. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*, 6(2): 108-118, 2005.
50. LI B.; CAREY M. & WORKMAN J. L. The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4): 707-719, 2007.
51. LIU L.; VAN GROEN T.; KADISH I. & TOLLEFSBOL T. O. DNA methylation impacts on learning and memory in aging. *Neurobiology of Aging*, 30(4): 549-560, 2009.
52. LUBIN F. D. & SWEATT J. D. The I κ B Kinase Regulates Chromatin Structure during Reconsolidation of Conditioned Fear Memories. *Neuron*, 55(6): 942-957, 2007.

53. LUGER K.; MADER A. W.; RICHMOND R. K.; SARGENT D. F. & RICHMOND T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648): 251-260, 1997.
54. MAHARANA C.; SHARMA K. P. & SHARMA S. K. Depolarization induces acetylation of histone H2B in the hippocampus. *Neuroscience*, 167(2): 354-360, 2010.
55. MALVAEZ M.; SANCHIS-SEGURA C.; VO D.; LATTAL K. M. & WOOD M. A. Modulation of Chromatin Modification Facilitates Extinction of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference. *Biological Psychiatry*, 67(1): 36-43, 2010.
56. MARTIN K. C. & SUN Y. E. To Learn Better, Keep the HAT on. *Neuron*, 42(6): 879-881, 2004.
57. MAURICE T.; DUCLOT F.; MEUNIER J.; NAERT G.; GIVALOIS L.; MEFFRE J.; CÉLÉRIER A.; JACQUET C.; COPOIS V.; MECHTI N.; OZATO K. & GONGORA C. Altered Memory Capacities and Response to Stress in p300/CBP-Associated Factor (PCAF) Histone Acetylase Knockout Mice. *Neuropsychopharmacology*, 33(7): 1584-1602, 2007.
58. MCGAUGH J. L. Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451): 248-251, 2000.
59. MCQUOWN S. C.; BARRETT R. M.; MATHEOS D. P.; POST R. J.; ROGGE G. A.; ALENGHAT T.; MULLICAN S. E.; JONES S.; RUSCHE J. R.; LAZAR M. A. & WOOD M. A. HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci*, 31(2): 764-774, 2011.
60. MCQUOWN S. C. & WOOD M. A. Epigenetic Regulation in Substance Use Disorders. *Current Psychiatry Reports*, 12(2): 145-153, 2010.
61. MEHLER M. F. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Prog Neurobiol*, 86(4): 305-341, 2008.
62. MICHAN S.; LI Y.; CHOU M. M.; PARRELLA E.; GE H.; LONG J. M.; ALLARD J. S.; LEWIS K.; MILLER M.; XU W.; MERVIS R. F.; CHEN J.; GUERIN K. I.; SMITH L. E.; MCBURNEY M. W.; SINCLAIR D. A.; BAUDRY M.; DE CABO R. & LONGO V. D. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci*, 30(29): 9695-9707, 2010.
63. MILLER C. A.; CAMPBELL S. L. & SWEATT J. D. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(4): 599-603, 2008.
64. MILLER C. A.; GAVIN C. F.; WHITE J. A.; PARRISH R. R.; HONASOGE A.; YANCEY C. R.; RIVERA I. M.; RUBIO M. D.; RUMBAUGH G. & SWEATT J. D.

Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat Neurosci*, 13(6): 664-666, 2010.

65. OIKE Y.; HATA A.; MAMIYA T.; KANAME T.; NODA Y.; SUZUKI M.; YASUE H.; NABESHIMA T.; ARAKI K. & YAMAMURA K. Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum Mol Genet*, 8(3): 387-396, 1999.

66. OLIVEIRA A. M. M.; ABEL T.; BRINDLE P. K. & WOOD M. A. Differential role for CBP and p300 CREB-binding domain in motor skill learning. *Behavioral Neuroscience*, 120(3): 724-729, 2006.

67. 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.

68. PETRIJ F.; GILES R. H.; DAUWERSE H. G.; SARIS J. J.; HENNEKAM R. C.; MASUNO M.; TOMMERUP N.; VAN OMMEN G. J.; GOODMAN R. H.; PETERS D. J. & ET AL. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature*, 376(6538): 348-351, 1995.

69. REOLON G. K.; MAURMANN N.; WERENICZ A.; GARCIA V. A.; SCHRODER N.; WOOD M. A. & ROESLER R. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behav Brain Res*, 2011.

70. RIVIECCIO M. A.; BROCHIER C.; WILLIS D. E.; WALKER B. A.; D'ANNIBALE M. A.; MCLAUGHLIN K.; SIDDIQ A.; KOZIKOWSKI A. P.; JAFFREY S. R.; TWISS J. L.; RATAN R. R. & LANGLEY B. HDAC6 is a target for protection and regeneration following injury in the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46): 19599-19604, 2009.

71. ROOZENDAAL B.; HERNANDEZ A.; CABRERA S. M.; HAGEWOUT R.; MALVAEZ M.; STEFANKO D. P.; HAETTIG J. & WOOD M. A. Membrane-Associated Glucocorticoid Activity Is Necessary for Modulation of Long-Term Memory via Chromatin Modification. *Journal of Neuroscience*, 30(14): 5037-5046, 2010.

72. ROUAUX C.; JOKIC N.; MBEBI C.; BOUTILLIER S.; LOEFFLER J. P. & BOUTILLIER A. L. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J*, 22(24): 6537-6549, 2003.

73. SCHAEFER A.; SAMPATH S. C.; INTRATOR A.; MIN A.; GERTLER T. S.; SURMEIER D. J.; TARAKHOVSKY A. & GREENGARD P. Control of Cognition and

Adaptive Behavior by the GLP/G9a Epigenetic Suppressor Complex. *Neuron*, 64(5): 678-691, 2009.

74. SELVI B. R.; CASSEL J.-C.; KUNDU T. K. & BOUTILLIER A.-L. Tuning acetylation levels with HAT activators: Therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(10-12): 840-853, 2010.

75. SHARMA R. P.; GRAYSON D. R.; GUIDOTTI A. & COSTA E. Chromatin, DNA methylation and neuron gene regulation--the purpose of the package. *J Psychiatry Neurosci*, 30(4): 257-263, 2005.

76. SHEN S.; LIU A.; LI J.; WOLUBAH C. & CASACCIA-BONNEFIL P. Epigenetic memory loss in aging oligodendrocytes in the corpus callosum. *Neurobiol Aging*, 29(3): 452-463, 2008.

77. SPANGE S.; WAGNER T.; HEINZEL T. & KRAMER O. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1): 185-198, 2009.

78. STEFANKO D. P.; BARRETT R. M.; LY A. R.; REOLON G. K. & WOOD M. A. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(23): 9447-9452, 2009.

79. SWANK M. W. & SWEATT J. D. Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. *J Neurosci*, 21(10): 3383-3391, 2001.

80. SWEATT J. D. Epigenetics and Cognitive Aging. *Science*, 328(5979): 701-702, 2010.

81. TANIURA H.; SNG J. C. & YONEDA Y. Histone modifications in the brain. *Neurochem Int*, 51(2-4): 85-91, 2007.

82. TURNER B. M. Cellular memory and the histone code. *Cell*, 111(3): 285-291, 2002.

83. 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. *Journal of Neuroscience*, 27(23): 6128-6140, 2007.

84. WOOD M. A.; ATTNER M. A.; OLIVEIRA A. M.; BRINDLE P. K. & ABEL T. A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes. *Learn Mem*, 13(5): 609-617, 2006a.

85. WOOD M. A.; HAWK J. D. & ABEL T. Combinatorial chromatin modifications and memory storage: a code for memory? *Learn Mem*, 13(3): 241-244, 2006b.
86. WOOD M. A.; KAPLAN M. P.; PARK A.; BLANCHARD E. J.; OLIVEIRA A. M.; LOMBARDI T. L. & ABEL T. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn Mem*, 12(2): 111-119, 2005.
87. YEH S. H.; LIN C. H. & GEAN P. W. Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory. *Mol Pharmacol*, 65(5): 1286-1292, 2004.
88. YING M.; XU R.; WU X.; ZHU H.; ZHUANG Y.; HAN M. & XU T. Sodium butyrate ameliorates histone hypoacetylation and neurodegenerative phenotypes in a mouse model for DRPLA. *J Biol Chem*, 281(18): 12580-12586, 2006.
89. YU N.-K.; BAEK S. & KAANG B.-K. DNA methylation-mediated control of learning and memory. *Molecular Brain*, 4(1): 5, 2011.
90. ZHAO Z.; FAN L. & FRICK K. M. Epigenetic alterations regulate estradiol-induced enhancement of memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(12): 5605-5610, 2010.
91. ZOCCHI L. & SASSONE-CORSI P. Joining the dots: from chromatin remodeling to neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(4): 432-440, 2010.

PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DE TRABALHO

Nos estudos envolvendo a inibição de HDACs na memória, pretendemos:

- Investigar a capacidade NaB reverter o déficit de outros tipos de memória;
- avaliar quais PTMs de histonas estão alteradas no córtex insular de ratos velhos no estado basal e treinados na tarefa de NOR;
- estudar o efeito que a inibição de HDACs na BLA terá na acetilação da cromatina hipocampal.

APÊNDICE

Modificações pós-traducionais em histonas mediante estímulos ou condições específicas

PTM		Stimulus / Condition	Gene Promotor	Structure / Gene	Time (h) after Stimulus the effect was observed	Signaling Molecules and how they were studied	Reference
AcH2A	=	CBP ^{+/-} mice		Hippocampus			Alarcón <i>et al.</i> , 2004
AcH2A	=	HDAC2KO		Hippocampus			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH2B	↓	CBP ^{+/-} mice		Hippocampus			Alarcón <i>et al.</i> , 2004
AcH2B	↑	SAHA		Hipocampal Slices CBP ^{+/-}			Alarcón <i>et al.</i> , 2004
AcH2B	↑	HDAC2KO mice		Hippocampus			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH2B	↑	NIPP1 mice		Hippocampus			Koshibu <i>et al.</i> , 2009
AcH2BK5/12/15/20	↑	KCL depolarization		CA1		CaMK , ERK and	Maharana <i>et</i>

					DNMTs - Inhibitors	<i>al.</i> , 2010
Ach3	↓	HDAC2OE mice	Hippocampus in promoters			Fischer <i>et al.</i> , 2007
Ach3	↑	Food aversion memory	Neurons involved on the response	0,25	MEK - Inhibitor	Danilova <i>et al.</i> , 2010
Ach3	↑	HDAC2KO mice	Hippocampus in promoters			Fischer <i>et al.</i> , 2007
Ach3	↑	Eyeblink classical conditioning	Hippocampus	1		Fontán-Lozano <i>et al.</i> , 2008
Ach3	↑	NOR	Hippocampus	1		Fontán-Lozano <i>et al.</i> , 2008
Ach3	↑	NOR	Perirhinal cortex	1		Fontán-Lozano <i>et al.</i> , 2008
Ach3	↑	5-HT	<i>Aplysia</i> cell culture C/EBP promoter	0,25 to 4 (not latter nor 0)		Guan <i>et al.</i> , 2002
Ach3	↑	CoFC same context reexposure	CA1	1	IKK α - Inhibitor	Lubin and Sweatt, 2007
Ach3	=	CBP ^{+/-} mice	Hippocampus			Alarcón <i>et al.</i> , 2004
Ach3	=	CoFC no training, same context reexposure	CA1	1		Lubin and Sweatt, 2007
Ach3	=	New context exposure	CA1	1		Lubin and Sweatt, 2007

AcH3K9	↓	NOR NIPP1 mice	Hippocampus CREB promoter	2min#		Koshibu <i>et al.</i> , 2009
AcH3K9	↑	Environmental enrichment	Cortex	2weeks		Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH3K9	↑	Environmental enrichment	Hippocampus	24 and 2weeks (not 0 / 3)		Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH3K9	↑	CoFC old animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010
AcH3K9	↑	CoFC young adult animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010
AcH3K9	=	NOR	Hippocampus CREB promoter	2min#		Koshibu <i>et al.</i> , 2009
AcH3K9	=	NIPP1 mice	Hippocampus			Koshibu <i>et al.</i> , 2009
AcH3K14	↑	CoFC	CA1	1 (not 0,25 / 0,5 / 2 / 4 / 24)	MEK - Inhibitor	Chwang <i>et al.</i> , 2006
AcH3K14	↑	CoFC	CA1	1 (not 0,25 / 0,5 / 2 / 4 / 24)	MEK - Inhibitor	Chwang <i>et al.</i> , 2006
AcH3K14	↑	Foskolin or PDA	CA1		MEK - Inhibitor	Chwang <i>et al.</i> , 2006
AcH3K14	↑	Foskolin or PDA	CA1		MEK - Inhibitor	Chwang <i>et al.</i> , 2006
AcH3K14	↑	CuFC	Hippocampus	1	Reversed by MSK1 KO	Chwang <i>et al.</i> , 2007
AcH3K14	↑	Foskolin or PDA	Hippocampal Slice		Reversed by MSK1 KO	Chwang <i>et al.</i> , 2007
AcH3K14	↑	Environmental	Hippocampus	3 and 24 (not 0		Fischer <i>et al.</i> ,

		enrichment		or 2weeks)		2007
AcH3K14	↑	5-HT	<i>Aplysia</i> cell culture C/EBP promoter			Guan <i>et al.</i> , 2002
AcH3K14	↑	NOR	Hippocampus CREB promoter	2min#		Koshibu <i>et al.</i> , 2009
AcH3K14	↑	NIPP1 mice	Hippocampus			Koshibu <i>et al.</i> , 2009
AcH3K14	↑	NOR NIPP1 mice	Hippocampus CREB promoter	2min#		Koshibu <i>et al.</i> , 2009
AcH3K14	↑	CoFC	Hippocampus	1 (not 24)	NMDAr and MEK - Inhibitors	Levenson <i>et al.</i> , 2004
AcH3K14	↑	NMDA	Hipocampal Slice		MEK - Inhibitors	Levenson <i>et al.</i> , 2004
AcH3K14	↑	Foskolin or PDA	Hipocampal Slice		MEK - Inhibitors	Levenson <i>et al.</i> , 2004
AcH3K14	↑	PDA	Hippocampal Slice		DNMTs - Inhibitors	Levenson <i>et al.</i> , 2006
AcH3K14	↑	CoFC same context reexposure	CA1 Zif268 promotor	1	IKK α - Inhibitor	Lubin and Sweatt, 2007
AcH3K14	↑	Extinction of Cocaine CPP + NaB ip	Nucleus Accumbens	0.5		Malvaez <i>et al.</i> , 2010
AcH3K14	↑	CoFC	Hippocampus	1	DNMTs - Inhibitors	Miller <i>et al.</i> , 2008
AcH3K14	↑	CoFC old animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010

AcH3K14	↑	CoFC young adult animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010
AcH3K14	↑	NOR (weak training) + Corticosterone	Hippocampus	1		Roosendaal <i>et al.</i> , 2010
AcH3K14	↑	NOR (weak training) + Corticosterone	Insular Cortex	1		Roosendaal <i>et al.</i> , 2010
AcH3K14	=	Glutamate	Striatum neuronal culture	0.5	ERK and MSK1 - Inhibitors	Brami-cherrier <i>et al.</i> , 2007
AcH3K14	=	Latent Inhibition	CA1	1		Chwang <i>et al.</i> , 2006
AcH3K14	=	Latent Inhibition	CA1	1		Chwang <i>et al.</i> , 2006
AcH3K14	=	Environmental enrichment	Cortex			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH3K14	=	HDAC1OE mice	Hippocampus and other brain areas			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH3K14	=	HDAC2KO mice	Hippocampus			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH3K14	=	HDAC2OE mice	Hippocampus and other brain areas			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH3K14	=	Latent Inhibition	Hippocampus	1 and 24		Levenson <i>et al.</i> , 2004
AcH3K14	=	PCAF KO mice	Hippocampus			Maurice <i>et al.</i> , 2007
AcH3K9/14	↑	NOR + 17 β -estradiol	Hippocampus	0,5	MEK - Inhibitor	Zhao <i>et al.</i> ,

						2010
AcH3K9/14	=	CuFC Weak Extinction session + VPA	Prefrontal Cortex BDNF P1	2		Bredy and Barad, 2008
AcH3K9/14	=	CuFC Weak Extinction session + VPA	Prefrontal Cortex BDNF P4	2		Bredy and Barad, 2008
AcH3K9/14	=	CuFC Extinction session	Prefrontal Cortex BDNF P4	2		Bredy and Barad, 2008
AcH3K9/K14	↓	CuFC Extinction session	Prefrontal Cortex BDNF P1	2		Bredy and Barad, 2008
AcH3K9/K14	↑	New Context*	Prefrontal Cortex BDNF P1	2		Bredy and Barad, 2008
AcH3K9/K14	↑	New Context*	Prefrontal Cortex BDNF P4	2		Bredy and Barad, 2008
AcH3K9/K14	↑	Context-signal memory (strong training)	<i>Chasmagnathus</i> Central Brain	1 (not 0 / 6 / 24)		Federman <i>et al.</i> , 2009
AcH3K9/K14	=	Context-signal memory (weak training)	<i>Chasmagnathus</i> Central Brain	0, 1, 6, and 24		Federman <i>et al.</i> , 2009
AcH4	↓	HDAC2OE mice	Hippocampus in promoters			Fischer <i>et al.</i> , 2007

Ach4	↓	FMRFa alone or in combination with 5-HT	<i>Aplysia</i> cell culture C/EBP promoter			Guan <i>et al.</i> , 2002
Ach4	↑	HDAC2KO mice	Hippocampus-promoters			Fischer <i>et al.</i> , 2007
Ach4	↑	5-HT	<i>Aplysia</i> cell culture C/EBP promoter	0,25 to 4 (not latter nor 0)		Guan <i>et al.</i> , 2002
Ach4	↑	TSA + FMRFa alone or in combination with 5-HT	<i>Aplysia</i> cell culture C/EBP promoter			Guan <i>et al.</i> , 2002
Ach4	=	CBP ^{+/-} mice	Hippocampus			Alarcón <i>et al.</i> , 2004
Ach4	=	HDAC1OE mice	Hippocampus and other brain areas			Fischer <i>et al.</i> , 2007
Ach4	=	HDAC2OE mice	Hippocampus and other brain areas			Fischer <i>et al.</i> , 2007
Ach4	=	CoFC no training, same context reexposure	CA1	1		Lubin and Sweatt, 2007
Ach4	=	New context exposure	CA1	1		Lubin and Sweatt, 2007
Ach4	=	NOR + 17β-estradiol	Hippocampus	0,5		Zhao <i>et al.</i> , 2010
Ach4K5	↓	HDAC2OE mice	Hippocampus			Fischer <i>et al.</i> ,

			and other brain areas			2007
AcH4K5	↓	NOR NIPP1 mice	Hippocampus CREB promoter	2min#		Koshibu <i>et al.</i> , 2009
AcH4K5	↑	Environmental enrichment	Cortex	24 and 2weeks (not 0 / 3)		Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K5	↑	Environmental enrichment	Hippocampus	3, 24 and 2weeks (not 0)		Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K5	↑	HDAC2KO mice	Hippocampus			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K5	↑	NIPP1 mice	Hippocampus			Koshibu <i>et al.</i> , 2009
AcH4K5	↑	CoFC old animals	Hippocampus	0,5 and 1 (not 0,16 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010
AcH4K5	↑	CoFC young adult animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010
AcH4K5	=	NOR	Hippocampus CREB promoter	2min#		Koshibu <i>et al.</i> , 2009 2009
AcH4K8	↓	FMRFa alone or in combination with 5-HT	<i>Aplysia</i> cell culture C/EBP promoter			Guan <i>et al.</i> , 2002
AcH4K8	↑	Environmental enrichment	Hippocampus	24		Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K8	↑	5-HT	<i>Aplysia</i> cell culture C/EBP promoter	0,25 to 4 (not latter nor 0)		Guan <i>et al.</i> , 2002
AcH4K8	↑	CoFC old animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5		Peleg <i>et al.</i> ,

				/ 24)		2010
AcH4K8	↑	CoFC young adult animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010
AcH4K8	=	Environmental enrichment	Cortex			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K8	=	PCAF KO mice	Hippocampus			Maurice <i>et al.</i> , 2007
AcH4K12	↓	HDAC2OE mice	Hippocampus and other brain areas			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K12	↑	Environmental enrichment	Hippocampus	24		Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K12	↑	HDAC2KO	Hippocampus			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K12	↑	CoFC young adult animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010
AcH4K12	=	Environmental enrichment	Cortex			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K12	=	HDAC1OE	Hippocampus and other brain areas			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K12	=	CoFC old animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010
AcH4K16	=	Environmental enrichment	Cortex			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K16	=	Environmental enrichment	Hippocampus			Fischer <i>et al.</i> , 2007

AcH4K16	=	CoFC old animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010
AcH4K16	=	CoFC young adult animals	Hippocampus	1 (not 0,16 / 0,5 / 24)		Peleg <i>et al.</i> , 2010
AcH4K5/8/12/16	↑	CuFC Weak Extinction session + VPA	Prefrontal Cortex BDNF P1	2		Bredy and Barad, 2008
AcH4K5/8/12/16	↑	CuFC Weak Extinction session + VPA	Prefrontal Cortex BDNF P4	2		Bredy and Barad, 2008
AcH4K5/8/12/16	↑	CuFC Extinction session	Prefrontal Cortex BDNF P4	2		Bredy and Barad, 2008
AcH4K5/8/12/16	↑	Latent Inhibition	Hippocampus	1 (not 24)		Levenson <i>et al.</i> , 2004
AcH4K5/8/12/16	=	CuFC Extinction session	Hippocampus and amygdala BDNF P1	2		Bredy and Barad, 2008
AcH4K5/8/12/16	=	CuFC Extinction session	Hippocampus and amygdala BDNF P4	2		Bredy and Barad, 2008
AcH4K5/8/12/16	=	CuFC Extinction session	Prefrontal Cortex BDNF P1	2		Bredy and Barad, 2008
AcH4K5/8/12/16	=	New Context*	Prefrontal Cortex BDNF P1	2		Bredy and Barad, 2008

AcH4K5/8/12/16	=	New Context*	Prefrontal Cortex BDNF P4	2		Bredy and Barad, 2008
AcH4K5/8/12/16	=	CuFC	Hippocampus	1		Chwang <i>et al.</i> , 2007
AcH4K5/8/12/16	=	Foskolin or PDA	Hippocampal Slice			Chwang <i>et al.</i> , 2007
AcH4K5/8/12/16	=	Environmental enrichment	Cortex			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K5/8/12/16	=	Environmental enrichment	Hippocampus			Fischer <i>et al.</i> , 2007
AcH4K5/8/12/16	=	CoFC	Hippocampus	1 and 24		Levenson <i>et al.</i> , 2004
AcH4K5/8/12/16	=	NMDA	Hippocampal Slice			Levenson <i>et al.</i> , 2004
AcH4K5/8/12/16	=	Foskolin or PDA	Hippocampal Slice			Levenson <i>et al.</i> , 2004
AcH4K5/8/12/16	=	CoFC same context reexposure	CA1 Zif268 promotor	1		Lubin and Sweatt, 2007
AcH4K5/8/12/16	=	CoFC	Hippocampus	1		Miller <i>et al.</i> , 2008
H3K4me	↑	Environmental enrichment	Cortex	24 and 2weeks (not 0 / 3)		Fischer <i>et al.</i> , 2007
H3K4me	=	Environmental enrichment	Hippocampus	0, 3, 24 and 2weeks		Fischer <i>et al.</i> , 2007
H3K4me2	↑	CoFC	CA1	1		Gupta <i>et al.</i> , 2010

H3K4me2	=	NIPP1 mice	Hippocampus			Koshibu <i>et al.</i> , 2009
H3K4me3	↑	CoFC	CA1	1		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K4me3	↑	CoFC	CA1 BDNF P1	0,5		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K4me3	↑	CoFC	CA1 Zif268 promoter	0,5		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K4me3	=	CoFC	CA1	24		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K4me3	=	CoFC	CA1 BDNF P4	0,5		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K4me3	=	CoFC + NaB	CA1	1		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K4me3	=	Latent Inhibition	CA1	1		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K4me3	=	New Context	CA1	1		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K4me3	=	New Context	CA1	24		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K9me2	↓	CoFC	CA1	24		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K9me2	↓	CoFC + NaB	CA1	1		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K9me2	↓	New Context	CA1	24		Gupta <i>et al.</i> , 2010
H3K9me2	↑	New Context	CA1	1		Gupta <i>et al.</i> , 2010

						2010
H3K9me2	=	CuFC	Hippocampus	1		Chwang <i>et al.</i> , 2007
H3K9me2	=	Foskolin or PDA	Hippocampal Slice			Chwang <i>et al.</i> , 2007
H3K36me3	↑	NIPP1 mice	Hippocampus			Koshibu <i>et al.</i> , 2009
H3K36me3	↑	NOR NIPP1 mice	Hippocampus CREB promoter	2min#		Koshibu <i>et al.</i> , 2009
H3K36me3	=	NOR	Hippocampus CREB promoter	2min#		Koshibu <i>et al.</i> , 2009
P-H3	↑	CoFC same context reexposure	CA1	1	IKK α - Inhibitor	Lubin and Sweatt, 2007
P-H3	=	CoFC no training, same context reexposure	CA1	1		Lubin and Sweatt, 2007
P-H3	=	New context exposure	CA1	1		Lubin and Sweatt, 2007
P-H3S10	↑	Haloperidol	Striatal medium spiny neurons		ERK/MSK1 Independent	Bertran <i>et al.</i> , 2009
P-H3S10	↑	Glutamate	Striatum neuronal culture	0,5	ERK and MSK1 - Inhibitors	Brami-cherrier <i>et al.</i> , 2007
P-H3S10	↑	CoFC	CA1	1 (not 0,25 / 0,5 / 2 / 4 / 24)	MEK - Inhibitor	Chwang <i>et al.</i> , 2006
P-H3S10	↑	CoFC	CA1	1 (not 0,25 / 0,5 / 2 / 4 / 24)	MEK - Inhibitor	Chwang <i>et al.</i> , 2006
P-H3S10	↑	Foskolin or PDA	CA1		MEK - Inhibitor	Chwang <i>et al.</i> ,

						2006
P-H3S10	↑	Foskolin or PDA	CA1		MEK - Inhibitor	Chwang <i>et al.</i> , 2006
P-H3S10	↑	CuFC	Hippocampus	1	Reversed by MSK1 KO	Chwang <i>et al.</i> , 2007
P-H3S10	↑	Foskolin or PDA	Hippocampal Slice		Reversed by MSK1 KO	Chwang <i>et al.</i> , 2007
P-H3S10	↑	NOR	Hippocampus CREB promoter	2min#		Koshibu <i>et al.</i> , 2009
P-H3S10	↑	NIPP1 mice	Hippocampus			Koshibu <i>et al.</i> , 2009
P-H3S10	↑	NOR NIPP1 mice	Hippocampus CREB promoter	2min#		Koshibu <i>et al.</i> , 2009
P-H3S10	=	Latent Inhibition	CA1	1		Chwang <i>et al.</i> , 2006
P-H3S10	=	Latent Inhibition	CA1	1		Chwang <i>et al.</i> , 2006
P- H3S10/AcH3K14	↑	CoFC same context reexposure	CA1 Zif268 promoter	1	IKK α - Inhibitor	Lubin and Sweatt, 2007
P-H3S28	=	NIPP1 mice	Hippocampus			Koshibu <i>et al.</i> , 2009 2009
P-H3T11	=	NIPP1 mice	Hippocampus			Koshibu <i>et al.</i> , 2009
P-H3T3	=	NIPP1 mice	Hippocampus			Koshibu <i>et al.</i> , 2009
H1 PolyADP-ribo.	↑	NOR	Cortex and Hippocampus	5min	PARP-1 - Inhibitor	Goldberg <i>et al.</i> , 2009

Tabela 2: PTMs em histonas mediante estímulos ou condições específicas. Estrutura cerebral analisada e promotor (quando houver), tempo após o estímulo que foi observado em horas (exceções especificadas). Moléculas envolvidas nas PTMs e como foram abordadas. PTMs separadas por “/” significa que o anticorpo reconhece todas. Os símbolos =, ↓ e ↑ significam não houve alteração, diminuição e aumento (respectivamente) da PTM. “*Weak*” sessão na qual não se observa alteração comportamental no teste de longa duração, enquanto “*Strong*” se observa. #KOSHIBU *et al.* (2009) utilizam 5 sessões de treino de 5 minutos e, 2 minutos após a última sessão, os animais foram sacrificados. *BREDY *et al.* (2008) treinaram animais em CuFC e 24 horas após os animais foram expostos a um novo contexto.

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

REOLON G.K

DADOS PESSOAIS

Nome: Gustavo Kellermann Reolon

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil – 14/12/1982

Endereço profissional:

- Rua Sarmento Leite n. 500, sala 211, Campus do Centro da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Centro (CEP 90050-170) Porto Alegre, RS, Brasil;

- Avenida Bento Gonçalves, Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, n. 9500. Agronomia (CEP 91501-970), Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone profissional: (51)3308-3654

E-mail: gkreolon@gmail.com

FORMAÇÃO

Graduação

Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Título: Caracterização do fenótipo comportamental de camundongos *Idua* $^{-/-}$, um modelo genético de mucopolissacaridose do tipo I.

Professor orientador: Dr. Rafael Roesler

Período: março/2000 a dezembro/2005

Mestrado

PPGBCM, UFRGS

Título: Avaliação de Parâmetros Comportamentais e Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Camundongos *idua-/-*, um Modelo Genético de Mucopolissacaridose do tipo I

Professor orientador: Dr. Rafael Roesler

Período: março/2005 a Fevereiro/2007

Doutorado

PPGBCM, UFRGS

Título: Modificações Pós-traducionais da Cromatina e Formação da Memória: Modulação por Inibição de Histonas Desacetilases

Professor orientador: Dr. Rafael Roesler

Professor coorientador: Dr. Marcelo A. Wood

Período: Março/2007 a Abril/2011

PRÊMIOS, DISTINÇÕES E BOLSAS

2010 **Seleção para o Pan American Studies Institute: Function and Regulation of the Cytoskeleton and V International Symposium of Myosin V** - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

2010 **Seleção para o V Curso de Inverno: Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular** – Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

2009 **Membro da Society for Neuroscience.**

2009 **Ricardo Miledi Neuroscience Training Award** - Society for Neuroscience, Universidad Autonoma de México, Queretaro.

2009 **Hugo Arechiga Fellowship** - Society for Neuroscience.

2009 **5 Artigos com Maior Impacto de Pós-Graduandos de 2009** - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS.

2008 **Friends of the Center for the Neurobiology of Learning and memory Foreign Graduate Student Award and the Renée Harwick Visiting Scholars Award** - Center for the Neurobiology of Learning and Memory, University of California, Irvine.

2007-2011 **Bolsa de Doutorado** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2005-2007 **Bolsa de Mestrado** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2004-2004 **Bolsa de Iniciação Científica** - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, UFRGS.

2001-2002 **Bolsa de Iniciação Científica** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul.

ARTIGOS PUBLICADOS

1. **REOLON, G. K.**; MAURMANN, N.; WERENICZ, A.; GARCIA, V. A.; SCHRÖDER, N. & ROESLER, R. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behavioural Brain Research*, 221(1): 329-332, 2011.
2. GOULART, B. K.; DE LIMA, M. N.; DE FARIAS, C. B.; **REOLON, G. K.**; ALMEIDA, V. R.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; SCHRÖDER, N. & ROESLER R. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, 167(4): 969-73, 2010.
3. PARDO ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; **REOLON G.K.**; DE FARIAS, C. B.; SCHWARTSMANN, G.; DELGADO, R. & ROESLER R. (2010) Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *European Journal of Pharmacology*. 635(1-3): 124-128.
4. MAURMANN, N.; **REOLON, G.K.**; RECH, S. B.; FETT-NETO, A. G. & ROESLER R. A valepotriate fraction of *Valeriana glechomifolia* shows sedative and anxiolytic properties and impairs recognition but not aversive memory in mice. *Evidence-based complement and alternative Medicine*, 2010.

5. LIEDKE, P. E.; **REOLON, G.K.**; KILPP, B.; BRUNETTO, A. L.; ROESLER, R. & SCHWARTSMANN, G. Systemic administration of doxorubicin impairs aversively motivated memory in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 94(2): 239-243, 2009.
6. STEFANKO, D. P.; BARRETT, R. M.; LY, A. R.; **REOLON, G.K.** & WOOD, M. A. Persistent modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23): 9447-9452, 2009.
7. **REOLON, G. K.**; REINKE, A.; DE OLIVEIRA, M. R.; BRAGA, L. M.; CAMASSOLA, M.; ANDRADES, M. E.; MOREIRA, J. C.; NARDI, N. B.; ROESLER, R. & DAL-PIZZOL, F. Alterations in Oxidative Markers in the Cerebellum and Peripheral Organs in MPS I Mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 29(4): 443-48, 2008.
8. MACHADO, M. S.; ROSA, R. M.; DANTAS, A. S.; **REOLON, G. K.**; APPELT H. R.; BRAGA, A. L.; HENRIQUES, J. A. & ROESLER, R. An organic selenium compound attenuates apomorphine-induced stereotypy in mice. *Neuroscience Letters*, 27;410(3):198-202, 2006.
9. REIRIZ, A. B.; **REOLON, G. K.**; PREISLER T.; ROSADO, J. O.; HENRIQUES, J. A.; ROESLER, R. & SCHWARTSMANN G. Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. *Clinical Cancer research*, 15;12(16):5000, 2006.

10. REOLON, G. K.; BRAGA L. M.; LUFT, T.; HENRIQUES, J. A.; NARDI, N. B. & ROESLER, R. Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua(-/-)* mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I. *Brain Research*, 1076(1):225-230, 2006.

11. ROESLER, R.; **REOLON, G. K.;** LUFT, T.; MARTINS, M. R.; SCHRODER, N.; VIANNA, M. R. & QUEVEDO J. NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. *Neurochemical Research*, 30(11):1407-1411, 2005.