

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA FURTADO BERGMANN

MECANISMOS EPIGENÉTICOS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO SÃO NECESSÁRIOS
PARA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

CURITIBA
2022

MARIANA FURTADO BERGMANN

MECANISMOS EPIGENÉTICOS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO SÃO NECESSÁRIOS
PARA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de graduação em
Farmácia, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^aDr^a Cristina Aparecida
Jark Stern

CURITIBA
2022

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me deram suporte para ter uma formação e me apoiam e orientam em todas as minhas decisões. A minha mãe, pelo exemplo de perseverança, para não desistir. Ao meu pai, pelo exemplo de serenidade, para lidar com diferentes situações. E ainda, para minha irmã como um exemplo para ela sempre seguir seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Acredito que tenho muito a agradecer aos que sempre estiveram me apoiando não apenas durante a realização do trabalho de conclusão de curso, mas também durante todo este percurso. Seria injusto que os primeiros a receberem meus agradecimentos não fossem meus pais, que me acompanharam, apoiaram e estimularam desde a entrada do curso a continuar persistindo por mais difícil e cansativo que fosse o caminho.

A minha família, em especial as minhas avós Melanda e Maria, minha bisavó Luisa, meus padrinhos Iris e Osni e meus padrinhos de coração Vilberto e Karline, que sempre acreditaram nesse sonho de se formar em uma Universidade Federal.

Aos que me deram todo apoio e estiveram comigo compartilhando cada momento do dia-a-dia durante a formação, sejam momentos bons e ruins, Thales, Ana, Gabriel e Júlia. Vocês contribuíram não apenas na minha jornada acadêmica, mas também na minha formação como pessoa.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, por toda colaboração e amizade construída desde 2019, quando entrei para o FearMemory Lab. Sem vocês eu não teria chegado até aqui, e espero que trilhemos ainda muitos caminhos juntos.

Por último, mas não menos importante gostaria de agradecer a minha orientadora, Prof^aDr^o Cristina, por ter me proporcionado toda orientação, dedicação, apoio técnico e paciência durante o desenvolvimento deste projeto, servindo como inspiração na carreira acadêmica. Saiba que desejo toda prosperidade pela qualidade de sua docência, pesquisa e amizade.

RESUMO

Memórias traumáticas são críticas para o desenvolvimento do transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Avançar no entendimento da neurobiologia dessas memórias é importante para o desenvolvimento de tratamentos para o TEPT. A consolidação e reconsolidação da memória depende de mecanismos como modificações epigenéticas que podem durar até 6 h. Os inibidores da histona acetiltransferase (HAT) administrados sistemicamente ou diretamente na amígdala (BLA) ou no hipocampo dorsal (DH) prejudicaram a consolidação e reconsolidação da memória auditiva e contextual do medo, respectivamente. O córtex pré-límbico (PL) está interligado com o BLA e o DH. Além disso, a atividade PL está subjacente à reconsolidação da memória contextual do medo. No entanto, se e por quanto tempo a atividade HAT no PL contribui para a reconsolidação da memória contextual do medo ainda deve ser determinado. O objetivo deste estudo é avaliar se a atividade da enzima HAT p300/CBP no PL em diferentes momentos após a reativação da memória está envolvida na reconsolidação da memória contextual de medo em ratos. Ratos Wistar machos (3 meses de idade) foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas guia bilateralmente visando o córtex PL. Após 10 dias de recuperação, os animais foram expostos ao condicionamento contextual de medo, que consistiu em familiarização (3 min), condicionamento (3 choques nas patas de 0,8 mA/3 s), evocação da memória (3 min), Teste A1 (3 min), realizado com intervalo de 24 h, e Teste A2 (3 min) realizada após 7 dias. Em todos os experimentos, os grupos receberam infusão no PL de veículo (VEH) ou C646 (inibidor de HAT p300/CBP; 5 ou 50 ng/0,2 μ L). Nos experimentos 1, 2 e 3, os ratos receberam tratamento no PL imediatamente, 1 ou 6 h após a reativação da memória, respectivamente. Nos experimentos 4 e 5, os animais receberam tratamento no PL imediatamente ou 1 h após a exposição a um Contexto B neutro, para evitar a evocação da memória. Para análise estatística, utilizou-se a ANOVA de medidas repetidas seguida do teste post hoc de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. da porcentagem do tempo de congelamento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética local, CEUA #1209. A infusão de C646 50 ng, mas não 5 ng, imediatamente ou 1 h após a reativação da memória diminuiu significativamente o comportamento de congelamento quando comparado ao controle durante o Teste A1. Esse efeito persistiu após 7 dias, sugerindo um prejuízo duradouro na reconsolidação da memória (É importante ressaltar que nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada durante a reativação da memória. Não foram observados efeitos significativos entre os grupos quando o tratamento foi administrado 6 h após a reativação. Além disso, não foram observados efeitos significativos quando C646 foi administrado imediatamente ou 1 h após exposição a um contexto neutro B. Em conclusão, os resultados sugerem que a atividade HAT p300/CBP no PL é necessária para reconsolidação até 1 h após a reativação, sugerindo que a reconsolidação da memória contextual de medo no PL está sob controle de mecanismos epigenéticos.

PALAVRAS CHAVE: Reconsolidação, Epigenética, Córtex pré-límbico, Histona acetiltransferase, Memória de medo.

ABSTRACT

Traumatic memories are critical to the development of post-traumatic stress disorder (PTSD). Advancing the knowledge about the neurobiology of fear memories is important for the development of treatments for PTSD. Long-term memory consolidation and reconsolidation relies on mechanisms such as epigenetic modifications and both processes are suggested to last up to 6 h. Inhibitors of histone acetyltransferase (HAT) administered either systemically or directly into the amygdala (BLA) or the dorsal hippocampus (DH) impaired auditory and contextual fear memory consolidation and reconsolidation, respectively. The prelimbic cortex (PL) is interconnected with BLA and the DH. In addition, PL activity underlies contextual fear memory reconsolidation. However, whether and how long HAT activity in the PL contributes to contextual fear memory reconsolidation remains to be determined. The objective of this study is to evaluate whether the activity of HAT enzyme p300/CBP in the PL at different time points after memory reactivation is involved in contextual fear memory reconsolidation in rats. Male Wistar rats (3 months old) underwent stereotaxic surgery to implant guide-cannulas bilaterally targeting the PL cortex. After 10 days of recovery, the animals were exposed to contextual fear conditioning. It consisted of familiarization (3 min), conditioning (3 footshocks of 0.8 mA/3 s), memory reactivation (3 min), Test A1 (3 min), all performed with an interval of 24 h, and Test A2 (3 min) performed after 7 days. In all experiments, independent groups of rats received intra-PL infusion of vehicle (VEH) or C646 (inhibitor of HAT p300/CBP; 5 or 50 ng/0.2 μ L). In experiment 1, 2 and 3, the rats received intra-PL treatment immediately, 1 or 6 h after memory reactivation, respectively. In experiment 4 and 5, the animals received intra-PL treatment immediately or 1 h after exposure to a neutral Context B, to avoid memory reactivation, respectively. Repeated measures ANOVA followed by the Newman-Keuls post hoc test was used. The results were expressed as mean $\pm$ SEM of the percentage of freezing time. All procedures were approved by the local ethics committee, CEUA #1209. The infusion of C646 50 ng, but not 5 ng, immediately or 1 h after memory reactivation significantly decreased freezing behavior when compared to control during Test A1. This effect persisted after 7 days, suggesting a long-lasting impairment in memory reconsolidation. Importantly, no significant difference among groups was observed during memory reactivation. No significant effects were observed among groups when treatment was given 6 h after reactivation. In addition, no significant effects were observed when C646 was administered immediately or 1 h after exposure to a neutral context B. In conclusion, the present results suggest that HAT p300/CBP activity in the PL is required for reconsolidation up to 1 h after reactivation, suggesting that reconsolidation of contextual fear memory in PL is under control of epigenetic mechanisms.

Keyword: Reconsolidation, Epigenetic, Prelimbic Cortex, Histone acetyltransferase, Fear memory.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- MECANISMOS MOLECULARES DA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA	20
FIGURA 2	- MECANISMO DE ACETILAÇÃO DE HISTONAS	24
FIGURA 3	- RESULTADO PREVISTO DA MODULAÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS	25
FIGURA 4	- PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO	31
FIGURA 5	- PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS 1H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO	32
FIGURA 6	- PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS 6H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO	32
FIGURA 7	- PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS IMEDIATAMENTE APÓS A OMISSÃO DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO	33
FIGURA 8	- PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS 1H APÓS A OMISSÃO DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO	33
FIGURA 9	- REPRESENTAÇÃO DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL	34
FIGURA 10	- EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO	37
FIGURA 11	- EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO 1 HORA APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO	39
FIGURA 12	- EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO 6 HORA APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO	41

FIGURA 13	- EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO IMEDIATAMENTE APÓS A OMISSÃO DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO	42
FIGURA 14	- EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO 1H APÓS A OMISSÃO DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO	43

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	-	Serotonina
ABL	-	Amígdala basolateral
ACTH	-	Acetilcolina
ARC	-	<i>Activity-dependent cytoskeleton associated protein</i>
BDNF	-	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAMK	-	Proteínas cinase cálcio/calmodulina dependentes
CBP	-	<i>CREB-bindingprotein</i>
CC	-	Córtex cingulado
CPF	-	Córtex pré-frontal
CPF-m	-	Córtex pré-frontal medial
CREB	-	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
ERK	-	Proteína cinase ativável extracelularmente
DA	-	Dopamina
GABA	-	Ácido gama-aminobutírico
HAT	-	Histona acetiltransferase
HDAC	-	Histona desacetilase
IKKα	-	Sinalizador I κ B quinase alfa.
IL	-	Infra-límbico
LTP	-	Potenciação de longa duração
MAPK	-	<i>Mitogen-activatedprotein kinase</i>
NA	-	Noradrenalina
NF-κB	-	<i>Factor nuclear kappa B</i>
NO	-	Óxido nítrico
NT	-	Neurotransmissor
P300	-	<i>E1A-associated protein</i>
PAF	-	Fator de ativação plaquetário
PCAF	-	Associação entre p300/CBP
PKA	-	Proteínas cinase dependentes do AMPc
PKC	-	Proteínas cinase cálcio dependentes
PKG	-	Proteínas cinase dependentes do GMPc

- PKM ζ** - Proteína quinase M ζ
- PL** - Pré-Límbico
- TEPT** - Transtorno de Estresse Pós-Traumático
- VEH** - Veículo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo Geral	14
1.1.2 Objetivo Específico	14
2. REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA	16
2.1 MEMÓRIAS	16
2.2 BASES CELULARES DA MEMÓRIA	17
2.3 FORMAÇÃO DA MEMÓRIA	18
2.3.1 Reconsolidação da Memória	21
2.3.2 Mecanismos Epigenéticos Envolvidos com a Formação e Manutenção das Memórias	22
2.4 TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS TRAUMÁTICO	26
3. METODOLOGIA	28
3.1 ANIMAIS	28
3.2 DROGAS	28
3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	28
3.4 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO	29
3.5 EXPERIMENTOS	31
3.5.1 Experimento 1: Avaliação do efeito da inibição da acetilação de histonas no córtex pré-límbico imediatamente após a evocação da memória de medo ...	31
3.5.2 Experimento 2: Avaliação do efeito da inibição da acetilação de histonas no córtex pré-límbico 1h após a evocação da memória de medo	31
3.5.3 Experimento 3: Avaliação do efeito da inibição da acetilação de histonas no córtex pré-límbico 6h após a evocação da memória de medo	32

3.5.4 Experimento 4: Avaliação do efeito da inibição da acetilação de histonas no córtex pré-límbico imediatamente após a omissão da evocação da memória de medo	32
3.5.5 Experimento 5: Avaliação do efeito da inibição da acetilação de histonas no córtex pré-límbico 1h após a omissão da evocação da memória de medo	33
3.6 HISTOLOGIA	33
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4 RESULTADOS	36
4.1 A ADMINISTRAÇÃO DE C646 NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO IMEDIATAMENTE APÓS A SESSÃO DE EVOCAÇÃO PREJUDICA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA	36
4.2 A ADMINISTRAÇÃO DE C646 1H APÓS A SESSÃO DE EVOCAÇÃO PREJUDICA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA	38
4.3 A INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NÃO ALTERA A MEMÓRIA DE MEDO 6H APÓS A SESSÃO DE EVOCAÇÃO	40
4.4 O EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS DEPENDE DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA	42
4.5 O EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS A APÓS 1H DEPENDE DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA	43
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é desenvolvido a partir de um evento traumático que pode desencadear respostas de medo inadequadas e dificultar a extinção da memória. Acredita-se que o TEPT é desenvolvido após um processo de “superconsolidação” durante a formação da memória, gerando uma memória mais persistente (HILL, *et al*, 2018). O processamento destas memórias aversivas está relacionado com estruturas como o hipocampo, o córtex pré-frontal medial (CPFm) e a amígdala, podendo ser as alterações nessas regiões as responsáveis pelos prejuízos cognitivos e emocionais da doença. (UGHES, SHIN, 2011; HAYES, VANELZAKKER, SHIN, 2012).

As terapias cognitivas recomendadas para o TEPT apresentam altas taxas de abandono, e o tratamento farmacológico do TEPT é pouco eficaz (RESSLER; MAYBERG, 2007). Sendo assim a busca por fármacos que interfiram com essa memória traumática podem ser consideradas uma estratégia para o tratamento da doença.

A janela de consolidação da memória dura cerca de 6 horas, no entanto como é observado na clínica, a maioria dos pacientes com TEPT procuram ajuda médica após essa memória ter se tornado remota, ou seja, uma memória mais estável e menos suscetível a intervenções. A evocação/reativação da memória leva a um novo processo de estabilização conhecido como reconsolidação. Durante este processo, assim como na consolidação, são necessárias etapas de transcrição e tradução gênica para síntese de proteínas a fim de estabilizar a memória. Portando a busca por drogas que prejudicam a reconsolidação de memórias traumáticas pode ter um impacto clínico bastante importante (NADER, EINARSSON, 2010).

A expressão gênica, têm um papel crucial para formação de novas proteínas e receptores. Entre os mecanismos epigenéticos relacionados ao controle da transcrição gênica, as modificações pós-traducionais da estrutura da cromatina se destacam por estarem envolvidas na formação da memória e plasticidade sináptica (LEVENSON, SWEATT, 2005). Dentre as modificações de cromatina já conhecidas, uma das mais estudadas é a acetilação de histonas, regulada pelas enzimas histona acetiltransferase (HAT) e histona deacetilase (HDAC) (KOUZARIDES, 2007).

Desde o início do século é observado o envolvimento da acetilação de histonas na formação de diferentes tipos de memória (SWANK; SWEATT, 2001; LEVENSON *et al.* 2004). Lubin e Sweatt (2007) demonstraram que a acetilação ocorre após a reativação da memória contextual do medo na região CA1 do hipocampo. Enquanto que Maddox, Watts e Schafe (2013) demonstraram que a expressão da acetilação da histona H3 é aumentada após reativação da memória de medo ao som na região da amígdala.

Poucos estudos têm focado nos efeitos da acetilação de histonas na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial (CPFm), e como podem interferir na memória de medo. Desta forma sabendo que o TEPT está relacionado com o CPFm e ainda que a região do PL é importante para reconsolidação após sessão de reativação de uma memória aversiva, o objetivo foi avaliar se a atividade da enzima HAT p300/CBP no PL em diferentes momentos após a evocação da memória está envolvida na reconsolidação da memória contextual de medo em ratos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar se a atividade das enzimas histona acetiltransferases (HATs) p300/CBP no córtex pré-límbico após a evocação da memória de medo ao contexto está envolvida com a reconsolidação e persistência da memória.

1.1.2 Objetivo Específico

- Avaliar o efeito da inibição da HAT p300/CBP na reconsolidação e persistência da memória, através da administração de C646 no córtex pré-límbico imediatamente após a sessão de evocação;
- Avaliar o efeito da inibição da HAT p300/CBP na reconsolidação e persistência da memória, através da administração de C646 no córtex pré-límbico 1 hora após a sessão de evocação;

- Avaliar o efeito da inibição da HAT p300/CBP na reconsolidação e persistência da memória, através da administração de C646 no córtex pré-límbico 6 horas após a sessão de evocação;
- Avaliar se o efeito da inibição da HAT p300/CBP no córtex pré-límbico na reconsolidação e persistência da memória, depende da evocação da memória de medo.

2. REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA

2.1 MEMÓRIAS

Existem muitas classificações das memórias, de acordo com função, tempo e conteúdo. Podemos classificar as memórias em dois grandes grupos, sendo uma para gerenciar a realidade e determinar riscos conhecida como memória de trabalho e outra que produz arquivos (IZQUIERDO, 2011).

A memória de trabalho é uma memória imediata processada principalmente pelo córtex pré-frontal, e depende simplesmente da atividade elétrica dos neurônios, sem requisitar alterações bioquímicas importantes ou deixar traços neuroquímicos e comportamentais.(IZQUIERDO, 2011).

Já as memórias que registram fatos, eventos e acontecimentos podem ser subdivididas em memórias explícitas ou implícitas. Memórias procedurais são geralmente adquiridas de maneira implícita enquanto que memórias declarativas por exemplo, podem ser adquiridas de forma explícita. As memórias declarativas dependem da interação entre o hipocampo e córtex que trabalham de maneira associadas com outras regiões, como amígdala, *locus coeruleus* e núcleos da rafe. Estas regiões associadas possuem importância quando as memórias estão envolvidas com componentes emocionais (IZQUIERDO, 2018).

As memórias que registram fatos, na maioria das vezes são associativas, e são evocadas a partir de dicas onde um estímulo condicionado é relacionado a um estímulo incondicionado. Pavlov, foi o primeiro fisiologista a estabelecer que nos aprendizados associativos, um estímulo novo é pareado com um outro estímulo biologicamente significativo, podendo este ser prazeroso (recompensas) ou dolorosos, gerando uma resposta pareada e condicionada (IZQUIERDO *et al.*, 2013).

As memórias que ficam registradas levam a modificações da estrutura e função das sinapses. Estas alterações sinápticas levam à formação, persistência e evocação das memórias. A capacidade de formar e armazenar memórias, é responsável por modular o comportamento, caráter e a personalidade individual em consequência de experiências passadas, portanto é importante reconhecer as bases

celulares que levam a formação da memória. (IZQUIERDO *et al.*, 2013; ALBERINI, KANDEL, 2014).

2.2 BASES CELULARES DA MEMÓRIA

O sistema nervoso representa o nível mais complexo de organização do corpo humano, estando envolvido na regulação das mais diferentes funções. Nele estão compreendidos dois tipos diferentes de células, células nervosas (neurônios) e células da glia (neuroglia). Os neurônios constituem as células específicas e especializadas do tecido nervoso, responsáveis por receber, processar e transmitir informações de célula a célula, e ainda armazenar informações. Em contraste as células da glia protegem e dão suporte para os neurônios durante diferenciação neuronal e perigos externos (MCGAUGH; WEINBERGER; LYNCH, 1990).

Grupos de neurônios interagem a partir de conexões conhecidas como sinapses, para regular contrações de músculos, secreção de glândulas e formação de memória. Existem 3 tipos de sinapses: sinapses receptoras que facilitam a inervação sensorial, para transmitir um estímulo recebido; sinapses interneuronais que conduzem um estímulo recebido pelo neurônio receptor para o neurônio efector; e sinapses efetores que inervam as células para a geração de um efeito, como por exemplo a inervação de células glandulares e musculares (MCGAUGH; WEINBERGER; LYNCH, 1990; RAHMANN; RAHMANN, 1992).

As sinapses podem ser ainda classificadas como sinapses elétricas e sinapses químicas que se diferem morfológicamente pelas áreas de contato, função e transmissão de impulsos (RAHMANN; RAHMANN, 1992).

Sinapses elétricas se comunicam rapidamente e para todas as direções, uma vez que a membrana possui uma resistência elétrica reduzida, se interligando a outras células através de junções gap, onde o sinal passa diretamente da célula pré-sináptica para a pós-sináptica (RAHMANN; RAHMANN, 1992).

Já as sinapses químicas, que são predominantes em mamíferos, são transmitidas em uma única direção de maneira especializada e auto-regulada. As pré-sinapses são equipadas com vesículas sinápticas contendo neurotransmissores (NT) específicos e canais e receptores pré-sinápticos. Já os neurônios pós-

sinápticos contêm receptores e canais iônicos pós-sinápticos (RAHMANN; RAHMANN,1992).

Quando há a ativação de canais voltagem dependentes na pré-sinapse, ocorre o influxo de Ca^{2+} que interage com proteínas presentes na membrana das vesículas sinápticas. Em seguida, a vesícula se transloca liberando os neurotransmissores na fenda sináptica, que por sua vez, se difundem até os receptores pós-sinápticos podendo causar mudança na permeabilidade de íons a membrana pós-sináptica e iniciar cascatas de reação (LOPES *et al.*,1999)

Muitos neurotransmissores podem agir nestes mecanismos de maneira excitatória ou inibitória. Neurotransmissores excitatórios, como acetilcolina (ACTH), noradrenalina (NA) e glutamato causam a despolarização da membrana pós-sináptica permitindo que o impulso elétrico seja conduzido até a próxima sinapse. Os neurotransmissores inibitórios, como ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina causam a hiperpolarização da membrana pós-sináptica, inibindo a condução do impulso (RAHMANN; RAHMANN,1992).

Os receptores pós-sinápticos também podem ser classificados. Quando sua ativação leva a passagem de íons pode ser denominado como ionotrópico. De maneira diferente quando a ativação do receptor estimula processos metabólicos intracelulares, pode ser denominado como metabotrópico (IZQUIERDO, 2011).

Entre os principais neurotransmissores (NT) excitatórios ou inibitórios envolvidos nos processos de memória, estão a NA, o glutamato, o GABA, a dopamina (DA), a serotonina (5-HT) e a acetilcolina. Estes processos, no entanto, não se limitam a ação de NT, mas podem ser ativados por neuromoduladores como beta-endorfina, óxido nítrico (NO), hormônios esteroides, prostaglandinas e outros agonistas e antagonistas (IZQUIERDO, 2011).

2.3 FORMAÇÃO DA MEMÓRIA

O primeiro contato com uma nova experiência gera o aprendizado, e essa etapa é denominada de aquisição da memória. Após a aquisição é formada uma memória de curta duração disponível para uso. Concomitantemente são iniciados mecanismos de estabilização, que tornam a memória suscetível a interferências.

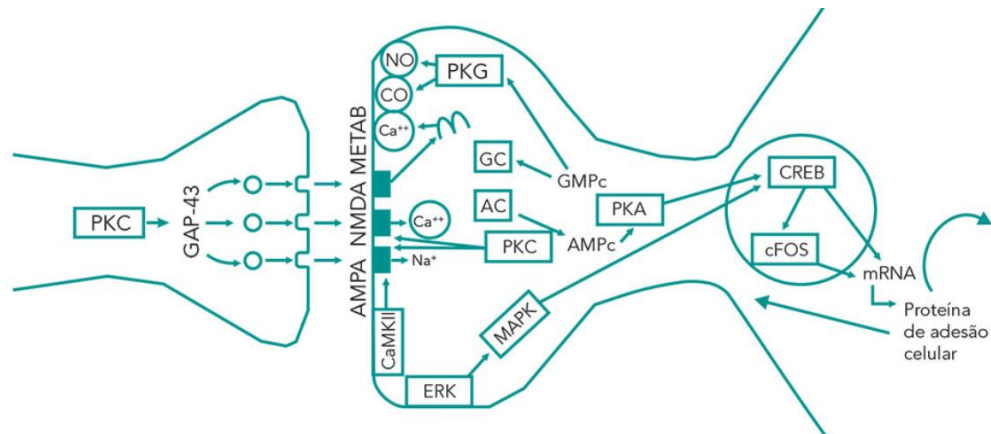
Esta etapa é reconhecida como consolidação, e podem levar até 6 horas para formar a memória de longa duração (DUDAI, 2004).

A consolidação pode ser dividida em 2 momentos: Uma fase mais inicial, em que há aumento de proteínas, NT's e receptores envolvidos na transmissão do sinal, já a fase mais tardia, inicia-se aproximadamente 3 horas após a aquisição, é iniciada a fase tardia de consolidação onde há maior envolvimento nos mecanismos que participam do remodelamento sináptico (QUEVEDO, et al, 1999; IGAZ, et al, 2002).

Entre os mecanismos importantes envolvidos na etapa de consolidação está a potenciação de longa duração (LTP). Após um estímulo relevante ocorre a excitação das células hipocâmpais através de receptores AMPA, essa excitação leva a uma despolarização persistente da célula que gera a ativação de receptores do tipo NMDA e influxo de cálcio a célula, podendo ativar ainda receptores glutamatérgicos metabotrópicos. O aumento do cálcio intracelular estimula uma série de enzimas como proteínas cinase cálcio/calmodulina dependentes (CAMK), proteínas cinase cálcio dependentes (PKC), proteínas cinase dependentes do AMPc (PKA) e as proteínas cinases ativáveis extracelularmente (ERKs). A ativação dessas proteínas levam a fosforilação de outras proteínas, fatores de transcrição e receptores, levando a uma amplificação e manutenção da ativação destas sinapses. Um mecanismo ilustrativo pode ser observado na Figura 1 (IZQUIERDO, 2011).

Entre os fatores de transcrição importantes nestas vias está o CREB (*cAMP responsive element binding protein*). O CREB ativado de 2 a 6 horas após a LTP leva a formação de RNAs mensageiros e formação de proteínas, como c-Fos e Zif-268 que podem atuar novamente como FTs, ou ainda outras proteínas de adesão celular que irão atuar na superfície da célula promovendo o aumento ou diminuição da função (IZQUIERDO, 2011).

FIGURA 1: MECANISMOS MOLECULARES DA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA



LEGENDA: A figura ilustra uma sinapse glutamatérgica que está envolvida na LTP. A excitação repetida de receptores AMPA, NMDA e metabotrópicos levam ao aumento da concentração de cálcio intracelular. O cálcio leva a ativação direta ou indireta de proteinoquinases que podem atuar fosforilando outras proteínas, fatores de transcrição e receptores, levando a uma amplificação e manutenção da ativação destas sinapses. FONTE: IZQUIERDO, 2018.

Além dos mecanismos mencionados durante a LTP na fase mais inicial, a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, AMPA e NMDA, e consequente influxo de cálcio e ativação de PKG. A ação da PKG em três enzimas pós-sinápticas, óxido nítrico sintase, heme oxigenase e enzima que produz o fator de ativação plaquetário (PAF), levam a produção de NO, monóxido de carbono e PAF. Estas substâncias levam ao aumento de glutamato e eficiência sináptica, não estando relacionados aos mecanismos de LTP, mas necessários para a formação da memória na região CA1 do hipocampo (IZQUIERDO, 2011).

Já a fase mais tardia está envolvida com a ativação da MAPK aumento de p-CREB e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Deste modo, neurônios pré e pós-sinápticos são ativados ao mesmo tempo levando a plasticidade sináptica (IZQUIERDO, 2011; KANDEL, 2001).

As memórias de longa duração são todas as que duram mais de 6 horas, porém existem memórias que duram dois a três dias, e memórias que duram meses ou anos. Isso pode ser explicado pelo nível emocional envolvido com a memória, mas também pelos mecanismos de persistência que se iniciam na fase final da consolidação até 12 horas depois da aquisição (IZQUIERDO, 2011).

Entre estes mecanismos podem ser citados a ativação de receptores dopaminérgicos, síntese de BDNF e envolvimento da proteína quinase Mζ (PKMζ),

uma isoforma atípica da proteína quinase C (PKC) expressa no cérebro. Até o momento acredita-se que a PKM ζ atua regulando o movimento de receptores AMPA após a formação de LTP, prevenindo sua endocitose e difusão lateral. (KATCHE *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2020).

Além dos mecanismos celulares, para que ocorra a formação das memórias, estruturas cerebrais específicas atuam em diferentes fases. Estudos baseados nas diferenças entre memórias recentes e remotas concordam que as memórias recentes estão relacionadas a atividade hipocampal, e com o passar do tempo, com a progressão da estabilização da memória, este traço de memória se torna mais dependente do neocortex (QUINN *et al.*, 2008). Além disso, já é comprovado que regiões sub-corticais como a amígdala também participam do processo de formação das memórias (MADDOX, WATTS, SCHAFE, 2013)

O córtex pré-frontal medial (CPFm), região do neocortex em ratos, possui três sub-regiões de grande importância para o controle dos comportamentos de medo, sendo elas o córtex cingulado (CC), o pré-límbico (PL) e o infra-límbico (IL) (HEIDBREder e GROENEWEGEN, 2003). Enquanto o CC e o PL estimulam a resposta de medo, a atividade do IL faria o papel de desativar o comportamento de medo (PETERS, KALIVAS, QUIRK, 2009).

Após a aquisição da memória de medo, o hipocampo envia estímulos sensoriais, através de projeções glutamatérgicas, para a amígdala basolateral (ABL) que ativam neurônios piramidais do PL. O PL, em resposta, ativa sinapses inibitórias no IL e excitatórias na amígdala, sendo assim responsável por estimular a resposta de medo (CAREAGA, GIRARDI, SUCHEKI, 2016).

2.3.1 Reconsolidação da Memória

A evocação de uma memória de longa duração requer a reativação de receptores AMPA, NMDA e metabotrópicos, além de estado funcional das vias da PKA, PKC e MAPK através de mecanismos próprios. Essa reativação pode levar a reconsolidação da memória (IZQUIERDO, 2011).

Acreditava-se inicialmente que a fase molecular da consolidação da memória ocorria apenas uma vez, e após consolidada uma memória se tornava fixa e impossível de ser modificada. Em 1997, Przybylski e Sara mostraram que uma

memória consolidada poderia ser prejudicada quando administrado um antagonista do receptor glutamatérgico do tipo NMDA após a sua evocação, propondo que a evocação causa a reativação da memória e um novo processo de estabilização.

Durante as primeiras 6 horas após a reativação, assim como na consolidação, são necessárias etapas de transcrição e tradução gênica para síntese de proteínas a fim de estabilizar a memória. O processo de estabilização pós-reativação é conhecido como reconsolidação da memória (NADER, EINARSSON, 2010; ALBERINI, 2011).

Este estado de labilidade criado durante a re-estabilização, torna a memória passível de atualizações. Corroborando com esta informação, pesquisas utilizando drogas benzodiazepínicas, canabidiol e o propranolol administradas imediatamente após a reativação da memória mostraram redução na expressão de medo em ratos, utilizando o modelo de condicionamento ao contexto, prejudicando a reconsolidação (DEBIEC, LEDOUX, NADER, 2002; BUSTOS, MALDONADO, MOLINA, 2006; STERN *et al.*, 2012).

Durante a consolidação de memórias aversivas, foi demonstrado que o córtex PL participa da etapa de consolidação da memória, e é importante para a evocação de memórias aversivas em ratos (GONZALEZ *et al.*, 2013).

Stern *et al.* (2014) demonstrou que a inativação do PL logo após uma sessão de reativação de uma memória aversiva foi capaz de reduzir o comportamento de medo de ratos, reforçando o envolvimento dessa região cerebral durante a reconsolidação de memórias aversivas.

2.3.2 Mecanismos Epigenéticos Envolvidos com a Formação e Manutenção das Memórias

Como já mencionado, a formação de memórias depende de mecanismos de estabilização onde há síntese de proteínas. A expressão gênica, portanto, têm um papel crucial para formação de novas proteínas e receptores. O primeiro passo da expressão gênica, é a transcrição, mecanismo que copia uma sequência de DNA em RNA. Devido à importância e complexidade deste processo, cerca de 5 a 10% do genoma humano é responsável por codificar reguladores de transcrição, dentre eles estão: fatores de transcrição, cofatores que interagem com fatores de transcrição,

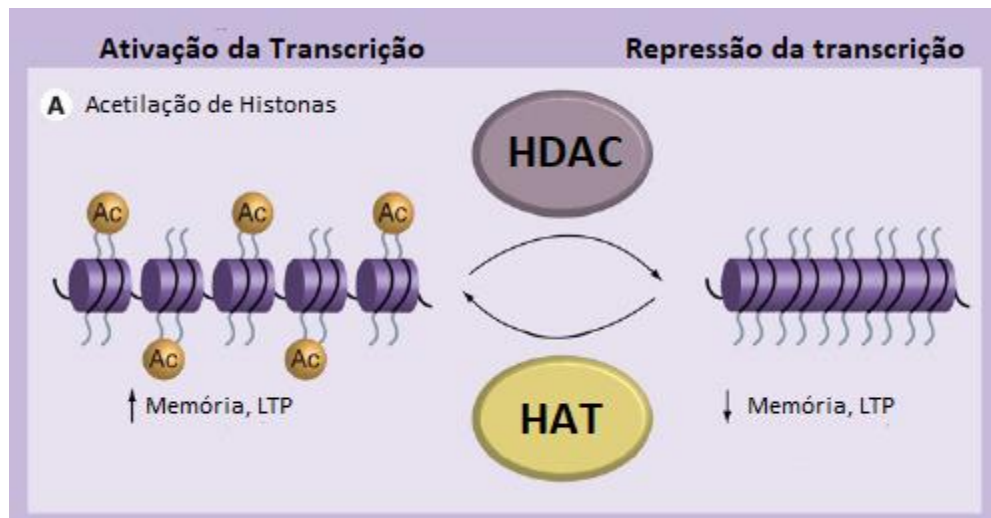
reguladores de cromatina, mecanismo de transcrição geral e seus reguladores (ALBERINI, KANDEL, 2014).

A epigenética permite uma maior compreensão das alterações na expressão gênica independente de alterações na sequência do DNA. Entre os diferentes mecanismos epigenéticos, dois se destacam por estarem envolvidos na formação da memória e plasticidade sináptica: a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais da estrutura da cromatina (LEVENSON, SWEATT, 2005).

A cromatina é constituída de DNA firmemente compactado em torno de 8 proteínas histonas: dois pares de H2A, H2B, H3 e H4. Cada histona possui uma cauda N-terminal capaz de sofrer modificações como acetilações e metilações. As alterações nestas porções terminais das histonas controlam a maneira como o DNA é empacotado. A partir disto, a estrutura da cromatina é encontrada de duas maneiras, como eucromatina, forma “relaxada” que permite o acesso e ligações de fatores de transcrição, e como heterocromatina, forma “compacta” resistente à ligação de fatores de transcrição (LEVENSON, SWEATT, 2005; ALBERINI, KANDEL, 2014).

Dentre as modificações de cromatina já conhecidas, uma das mais estudadas é a acetilação de histonas (KOUZARIDES, 2007). A proporção entre eucromatina e heterocromatina é mediada através das enzimas histona acetiltransferases (HATs) e histona desacetilases (HDACs). As HATs são responsáveis por neutralizar os resíduos de lisina carregados positivamente nas porções n-terminais, deste modo, a acetilação promove o relaxamento da cromatina, tornando possível a ligação de fatores de transcrição. Já a HDAC, é responsável por remover os grupos acetil dos resíduos de lisina, tornando a estrutura da cromatina novamente condensada e resistente aos fatores de transcrição (FIGURA 2) (VARGA-WEISZ, BECKER, 1998; YANG, SETO, 2007).

FIGURA 2: MECANISMO DE ACETILAÇÃO DE HISTONAS.



LEGENDA: Mecanismos de acetilação e desacetilação de histonas. As HAT's podem atuar acetilando as caudas N-terminais das histonas, alterando a conformação da cromatina para uma forma "relaxada" e permitindo a ativação da transcrição, um mecanismo necessário para que ocorra LTP e formação da memória. Este estado da cromatina pode ser modificado pela ação de HDAC's que irão desacetilar as caudas das histonas, mudando para conformação da cromatina condensada, estado onde ocorre repressão da transcrição, inibindo a LTP e formação da memória. FONTE: ADAPTADO DE PUCKETT; LUBIN, 2011.

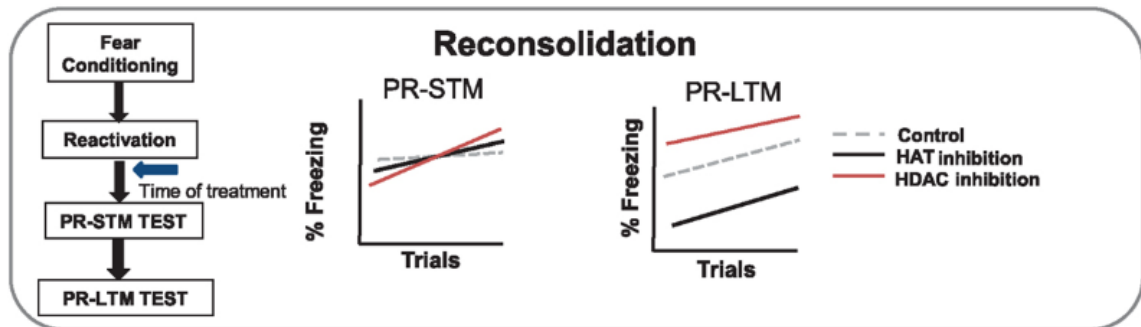
Swank e Sweatt (2001) foram os primeiros a mostrarem o envolvimento da acetilação de histonas na formação da memória de longo prazo após a ativação de ERK, durante o aprendizado do paladar. Em seguida Levenson e colaboradores (2004) confirmaram que a ativação de ERK, levou ao aumento dos níveis de acetilação de histonas H3, além da indução da potenciação de longo prazo contribuindo para a formação da memória.

Reul (2014) demonstrou que após um evento estressante o aumento de hormônios glicocorticóides no hipocampo leva a um aumento de genes de expressão imediata através do aumento da acetilação de histonas. Desta forma o manejo das enzimas modificadoras de histonas pode ser interessante para o controle da memória de medo.

O diagrama esquemático ilustrado na FIGURA 3, demonstra o resultado previsto da inibição farmacológica das enzimas modificadoras de histona durante a reconsolidação. Quando o inibidor da HAT é administrado após a reativação da memória é previsto a diminuição da resposta de medo durante a expressão da

memória de longo prazo. Em contrapartida, quando administrado o inibidor HDAC, espera-se que a resposta de medo aumente (MADDOX, SCHAFE, RESSLER, 2013).

FIGURA 3: RESULTADO PREVISTO DA MODULAÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS.



LEGENDA: Resultado previsto da modulação da acetilação de histonas. A modulação da reconsolidação pode levar a atualização da memória original, podendo ainda enfraquecer ou fortalecer esta memória. Maddox, Schafe e Ressler (2013) propõem que a utilização de um inibidor da HAT após a evocação da memória pode prejudicar a memória de longo prazo reconsolidada, o que poderia ser observado pela redução do tempo de congelamento. Em contrapartida a utilização de um inibidor da HDAC após a evocação da memória pode fortalecer a memória de longo prazo reconsolidada, o que poderia ser observado pelo aumento do tempo de congelamento. FONTE: ADAPTADO DE MADDOX, SCHAFE, RESSLER, 2013.

Embora muitas enzimas tenham mostrado possuir atividade HAT, as mais estudadas no contexto de processos de memória, são: *CREB-binding protein* (CBP), a *E1A-associated protein* (p300) e a associação entre p300/CBP (PCAF) (MADDOX, WATTS, SCHAFE, 2013).

Em camundongos transgênicos em que a atividade HAT foi eliminada de CBP, foi verificado que houve um prejuízo na estabilização da memória. Isso foi verificado ainda em outras proteínas com atividade HAT (KORZUS; ROSENFELD; MAYFORD, 2004).

O papel da associação p300/CBP na estabilização de memórias aversivas foi estudado por Maddox, Watts e Schafe (2013), utilizando o inibidor seletivo da p300/CBP, o C646, através de sua infusão intra-ABL. O C646 foi capaz de gerar uma redução na acetilação da histona H3 na ABL, prejudicando tanto a consolidação quanto a reconsolidação de memórias aversivas dependentes dessa região cerebral.

Apesar de já ser reconhecido o envolvimento da acetilação de histonas na formação da memória de medo de longa duração, a maioria dos estudos envolvem protocolos de reconhecimento de objetos e condicionamento de medo relacionado as áreas do hipocampo.

2.4 TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS TRAUMÁTICO

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é uma doença psiquiátrica adquirida após a exposição a um trauma ou estressor que pode ameaçar a vida de um indivíduo (BRASIL, 2019). O TEPT está presente na categoria de Transtornos Relacionados a Trauma e Estressores pela 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V). Entre as manifestações clínicas o evento traumático pode ser revivenciado através de lembranças recorrentes involuntárias e intrusivas, como pesadelos e flashbacks e identificado através de sinais e sintomas como esquiva, excitabilidade aumentada, e alterações negativas na cognição e humor, como o aumento da ansiedade (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2014).

O processamento destas memórias aversivas está relacionado com o hipocampo, o córtex pré-frontal medial (CPFm) e a amígdala. Em pacientes com TEPT a amígdala e o CC anterior – região homóloga ao córtex pré-límbico de ratos – encontram-se hiperativadas, em contrapartida, o hipocampo e o córtex pré-frontal ventromedial – região homóloga ao córtex infra-límbico – encontram-se hipoativados. (HUGHES, SHIN, 2011; HAYES, VANELZAKKER, SHIN, 2012). Estas alterações estão relacionadas com os prejuízos cognitivos e emocionais da doença.

Acredita-se que o TEPT é desenvolvido após um processo de “superconsolidação” durante a formação da memória, gerando uma memória mais persistente. Atualmente é claro que hormônios de estresse como catecolaminas e glicocorticóides, assim como o sistema endocanabinóide, participam da regulação do processo de consolidação. Uma causa provável para a consolidação exacerbada seria o desajuste neuroquímico entre a tríade de interação noradrenérgica-endocanabinóide-glicocorticóide. Sugere-se que a presença reduzida de endocanabinóides leve a um aumento da secreção de NTs na fenda sináptica. Isto,

junto ao aumento de glicocorticóides e noradrenalina durante o estresse são um fator contribuinte primário no TEPT (HILL *et al.*, 2018; HAUER *et al.*, 2014).

A prevalência do TEPT está envolvida com o tipo de evento traumático vivenciado, sendo as maiores taxas encontradas entre sobreviventes de estupro, combate e captura militar, em sobreviventes de campo de concentração e genocídio (DSM-5, 2013). Creamer e colaboradores (2001) mostram que cerca de 50% das mulheres que foram vítimas de abuso sexual desenvolvem o TEPT. Além disso, vítimas de crime violento possuem cerca de 19 a 75% de desenvolver TEPT (JAVIDI; YADOLLAHIE, 2012). Desta forma, torna-se importante o estudo de mecanismos envolvidos na formação da memória de medo que possam ser utilizadas para o tratamento do TEPT.

Entre os tratamentos, o mais recomendado são as psicoterapias, podendo ainda ser utilizado como farmacoterapia inibidores da receptação de serotonina. No entanto, as terapias cognitivas apresentam altas taxas de abandono, e o tratamento farmacológico do TEPT é pouco eficaz (RESSLER; MAYBERG, 2007). Sendo assim a busca por fármacos que interfiram com essa memória traumática podem ser consideradas uma estratégia para o tratamento da doença.

3. METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 13 a 15 semanas de vida, com pesos entre 350 e 400 g, obtidos no biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e alojados em caixas de polipropileno (60 x 25 x 25 cm) em grupos de 4 a 5 animais. Até o término dos experimentos, eles foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (23 ± 2 °C) e com livre acesso à comida e água, sob um ciclo de claro/escuro de 12h. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética local para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil (autorização nº 1209). Todos os experimentos foram elaborados visando minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

3.2 DROGAS

Foi utilizado nos experimentos o C646 (inibidor da p300/CBP; Sigma, USA) em concentração de 5 ng e 50ng/0,2 µL/lado. Foi preparado uma solução mãe de C646 em 50% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 50% de solução salina (NaCl a 0,9%) de concentração 2,5 µg/µL. Para injeção da dose de 5, 50 ng, a solução-mãe foi diluída em 50% DMSO afim de atingir concentração de 0,25 µg/µL e 0,025 µg/µL. O veículo (VEH) utilizado foi solução de 50% DMSO diluído em salina.

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

A cirurgia estereotáxica foi realizada para implante de cânulas-guia bilaterais direcionadas ao PL seguindo as coordenadas descritas por Paxinos e Watson (2009). Através dessas cânulas a droga ou seu veículo foram infundidos.

Inicialmente, os animais foram pesados e anestesiados utilizando uma associação de quetamina (75 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg). Em seguida, foram colocados no aparelho estereotáxico com as cabeças fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após remoção dos pêlos e assepsia do local com uma

solução de álcool iodado a 2%, foi aplicado anestesia local (lidocaína 3,0% com norepinefrina 1: 50000).

Após isso, foi realizada uma incisão para exposição da calvária e remoção do periósteo por raspagem. Com auxílio de uma broca odontológica, foram perfurados dois orifícios intra-craniais para fixação de micro-parafusos de aço inoxidável, que serviram de suporte para uma prótese de acrílico posteriormente aplicada sobre a calota craniana do animal. Para introdução das cânulas, foram perfurados outros dois orifícios orientados a partir das coordenadas descritas por Paxinos e Watson (2009), sendo elas: +3,0 mm (relativo ao bregma), +0,5 mm (relativo ao eixo lateral) e -1,8 mm (relativo ao eixo dorso-ventral).

As cânulas-guia foram previamente confeccionadas a partir de agulhas (25,0 x 7,0 mm), e tendo um tamanho de 11 mm. Estas foram fixadas na calota craniana a partir de uma resina acrílica autopolimerizável, cobrindo toda a extensão craniana exposta pela cirurgia. Afim de prevenir o entupimento das cânulas, foram introduzidos mandris de aço inoxidável nas mesmas e após esse procedimento os animais foram retirados do aparelho e permaneceram sob observação por pelo menos 1 hora. Após esse período, retornaram a sala de manutenção do biotério setorial até a realização dos experimentos.

3.4 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO

Após dez dias de recuperação, os animais foram submetidos ao protocolo comportamental. Primeiramente, os animais foram mantidos em uma sala adjacente à de experimentação para ambientação por trinta minutos antes do início de cada sessão experimental. No dia 1, os animais foram submetidos a uma sessão de familiarização, sendo mantidos por 3 min em uma caixa (Contexto A; 26 x 31.5 x 21 cm; Insight, Brasil) de alumínio, com a parede frontal e teto de polipropileno e piso gradeado, conectado a uma fonte de choque. A sala de experimentação foi mantida com temperatura (22 ± 1 °C) e luminosidade de 70 lux controladas durante todos os experimentos.

No dia 2, foi realizada a sessão de condicionamento, onde os animais foram novamente colocados no Contexto A e receberam 3 choques nas patas (estímulo incondicionado; 0,8 mA/3s), com 30s de intervalo entre eles. Após o último choque,

o animal permaneceu por mais 30s na caixa, sendo o tempo total da sessão 2 minutos.

Vinte e quatro horas após o treino (dia 3), os animais passaram pela sessão de evocação da memória, onde foram re-expostos ao Contexto A por 3 min, ou ainda pela sessão de omissão da evocação da memória, onde foram re-expostos ao Contexto B (33 x 34 x 26 cm) por 3 min, ambos sem a presença do estímulo incondicionado. Todas sessões foram analisadas e a porcentagem de tempo de congelamento (caracterizado pela ausência completa de movimentos, exceto os respiratórios) foi registrada e utilizada como medida de retenção da memória aversiva.

Após o término da sessão, cada animal recebeu (imediatamente, após 1 h ou após 6h da evocação da memória) injeções bilaterais intracerebrais de C646 (5 ou 50 ng/lado) ou veículo a partir da inserção de uma agulha odontológica de 13,5 mm nas cânulas-guia, com o objetivo de atingir o PL. As agulhas foram conectadas a microseringas de 5 µL a partir de tubos de polietileno, encaixadas em uma bomba de infusão digital, permitindo uma taxa de infusão constante de 0,2 µL/min/lado.

No dia seguinte (dia 4), os animais foram re-expostos ao Contexto A para avaliação do efeito do tratamento farmacológico (Teste A1). Após um dia (dia 5) os animais foram testados em contextos neutros, caixa de polipropileno transparente (Contexto B), por 3 min, afim de verificar generalização da memória (Teste B1). Sete dias após a evocação (dia 11) os animais foram re-expostos ao Contexto A para avaliação do efeito do tratamento farmacológico na persistência da memória (Teste A2). No dia seguinte (dia 12) os animais foram re-expostos ao Contexto B (Teste B2).

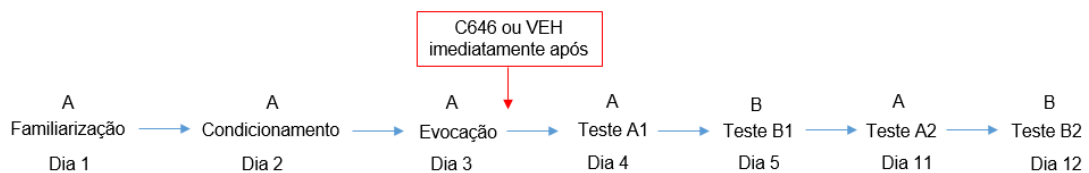
O comportamento de congelamento, definido como a ausência total de movimentos do corpo e da cabeça, exceto aqueles associados à respiração, foi usado como um índice da memória do medo. O comportamento dos animais foi registrado e o tempo de congelamento foi quantificado em segundos, e expresso como a porcentagem do tempo total da sessão.

3.5 EXPERIMENTOS

3.5.1 Experimento 1: Avaliação do efeito da inibição da acetilação de histonas no córtex pré-límbico imediatamente após a evocação da memória de medo

Como esquematizado na Figura 4, Para avaliar os efeitos da inibição da acetilação de histonas imediatamente após a sessão de evocação da memória, um dia após o condicionamento os animais foram expostos a sessão de evocação em Contexto A por 3 min, e imediatamente após a sessão receberam injeções bilaterais direcionadas ao PL, de C646 5 ou 50 ng/lado ou veículo. A avaliação do tratamento farmacológico foi realizada pelos testes A1, B1, A2 e B2.

FIGURA 4: PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

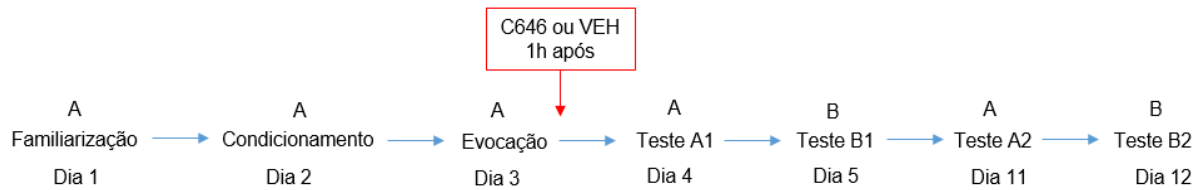


FONTE: O AUTOR (2022).

3.5.2 Experimento 2: Avaliação do efeito da inibição da acetilação de histonas no córtex pré-límbico 1h após a evocação da memória de medo

Como esquematizado na Figura 5, para avaliar os efeitos da inibição da acetilação de histonas 1h após a sessão de evocação da memória, um dia após o condicionamento os animais foram expostos a sessão de evocação em Contexto A por 3 min, e 1h após a sessão receberam injeções bilaterais direcionadas ao PL, de C646 5 ou 50 ng/lado ou veículo. A avaliação do tratamento farmacológico foi realizada pelos testes A1, B1, A2 e B2.

FIGURA 5: PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS 1H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

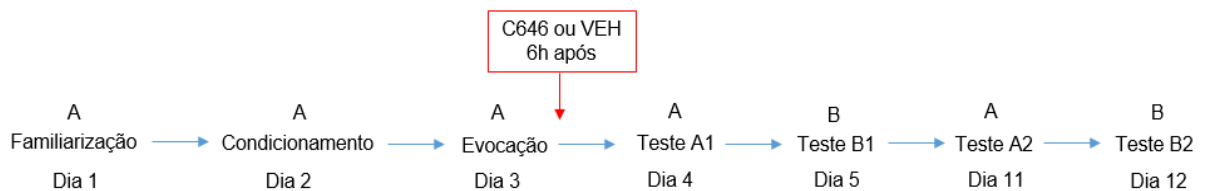


FONTE: O AUTOR (2022).

3.5.3 Experimento 3: Avaliação do efeito da inibição da acetilação de histonas no córtex pré-límbico 6h após a evocação da memória de medo

Como esquematizado na Figura 6, para avaliar os efeitos da inibição da acetilação de histonas 6h após a sessão de evocação da memória, um dia após o condicionamento os animais foram expostos a sessão de evocação em Contexto A por 3 min, e 6h após a sessão receberam injeções bilaterais direcionadas ao PL, de C646 5 ou 50 ng/lado ou veículo. A avaliação do tratamento farmacológico foi realizada pelos testes A1, B1, A2 e B2.

FIGURA 6: PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS 6H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO



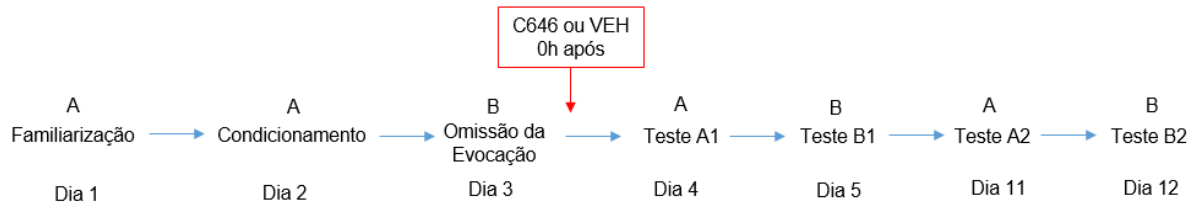
FONTE: O AUTOR (2022).

3.5.4 Experimento 4: Avaliação do efeito da inibição da acetilação de histonas no córtex pré-límbico imediatamente após a omissão da evocação da memória de medo

Como esquematizado na Figura 7, para avaliar os efeitos da inibição da acetilação de histonas imediatamente após a omissão da sessão de evocação da memória, um dia após o condicionamento os animais foram expostos a sessão de evocação em Contexto B por 3 min, e imediatamente após a sessão receberam

injeções bilaterais direcionados ao PL, de C646 50 ng/lado ou veículo. A avaliação do tratamento farmacológico foi realizada pelos testes A1, B1, A2 e B2.

FIGURA 7: PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS IMEDIATAMENTE APÓS A OMISSÃO DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

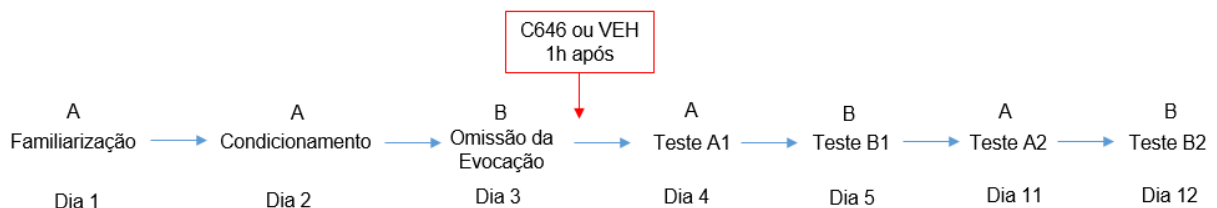


FONTE: O AUTOR (2022).

3.5.5 Experimento 5: Avaliação do efeito da inibição da acetilação de histonas no córtex pré-límbico 1h após a omissão da evocação da memória de medo

Como esquematizado na Figura 8, para avaliar os efeitos da inibição da acetilação de histonas 1h após a omissão da sessão de evocação da memória, um dia após o condicionamento os animais foram expostos a sessão de evocação em Contexto B por 3 min, e 1h após a sessão receberam injeções bilaterais direcionados ao PL, de C646 50 ng/lado ou veículo. A avaliação do tratamento farmacológico foi realizada pelos testes A1, B1, A2 e B2.

FIGURA 8: PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS 1H APÓS A OMISSÃO DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO



FONTE: O AUTOR (2022).

3.6 HISTOLOGIA

Após o término dos experimentos comportamentais, os animais passaram por uma análise histológica, com o objetivo de verificar a posição de suas cânulas e

as exposições ao Teste B1 e Teste B2 foram submetidas separadamente a análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) após assegurar a distribuição de normalidade dos dados. Os fatores avaliados foram o tratamento e a sessão (exposições ao contexto A ou contexto B). O nível de significância estatística foi estabelecido em $P \leq 0,05$. O teste de Newman-Keuls foi utilizado para múltiplas comparações quando houve significância estatística. O teste “t” de Student foi adotado para a comparação de dois grupos independentes, quando necessário.

4 RESULTADOS

4.1 A ADMINISTRAÇÃO DE C646 NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO IMEDIATAMENTE APÓS A SESSÃO DE EVOCAÇÃO PREJUDICA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

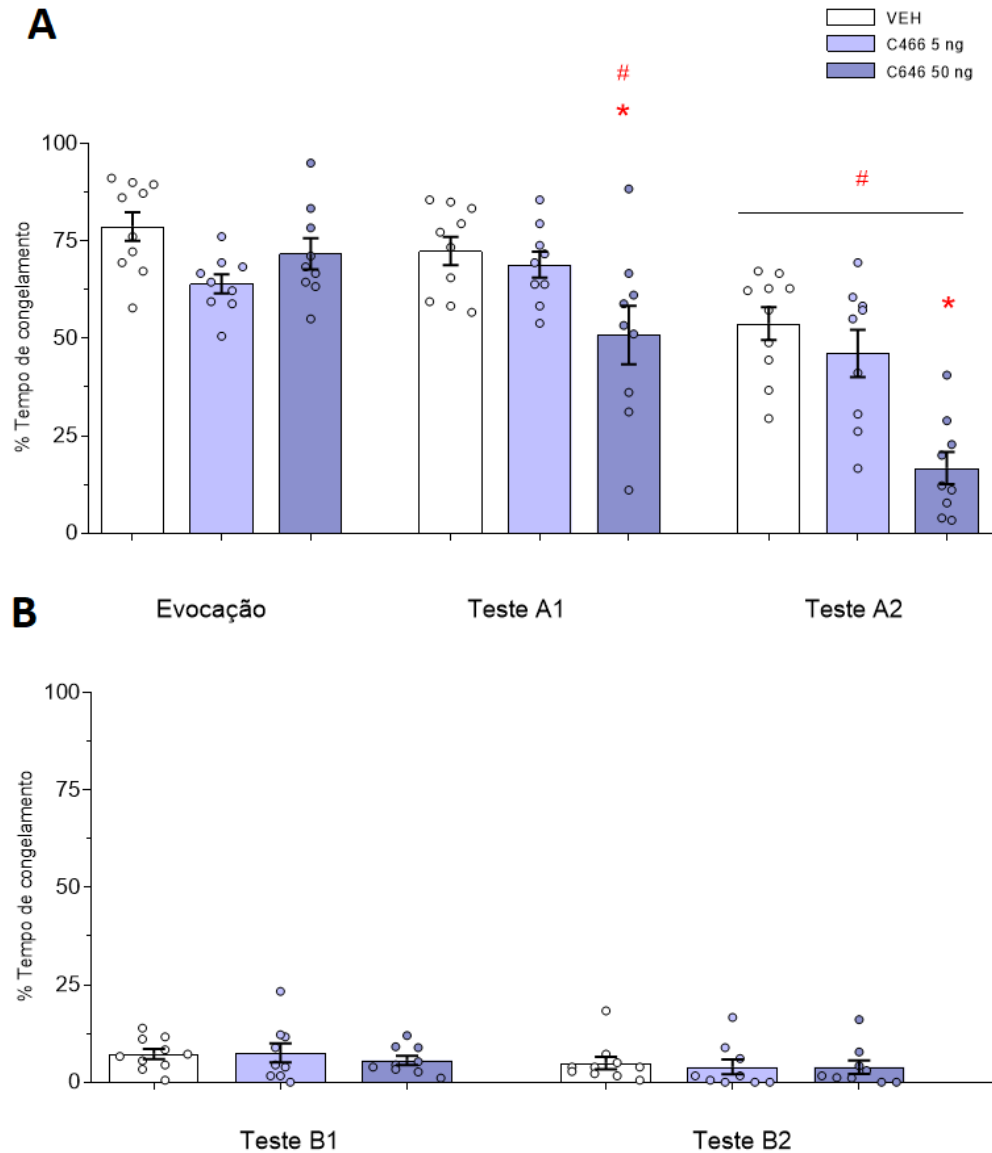
Para investigar se a inibição da acetilação de histonas prejudica a reconsolidação ou persistência da memória de medo, foi infundido C646 no PL imediatamente após a sessão de evocação da memória. Os animais após a sessão de evocação em contexto A foram randomizados em 3 grupos, sendo VEH (n=10), C646 5 ng (n=9) e C646 50 ng (n=9).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento [$F(2,24)=9,85$, $p=0,00075$], da reexposição ao contexto [$F(2,48)=62,54$, $p<0,0001$], e da interação entre o tratamento e a exposição ao Contexto A [$F(4,48)=6,88$, $p=0,00018$].

Como demonstrado na FIGURA 10A, o teste post hoc de Newman-Keuls mostrou que o grupo tratado com dose de C646 50 ng apresentou tempo de congelamento estatisticamente menor durante o teste A1 ($p=0,042$) e A2 ($p=0,00011$) em relação ao grupo controle. Isso sugere que a inibição de CBP/p300 no córtex PL imediatamente após a evocação prejudica a reconsolidação da memória de medo.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma ausência de efeitos estatisticamente significativos do tratamento, reexposição e interação entre o tratamento e a exposição ao Contexto B nos Testes B1 e Teste B2 que podem ser observados na figura 10B [$F(2,24)=0,14$; $p=0,87$; $F(1,24)=1,34$; $p=0,26$; e $F(2,24)=0,78$; $p=0,47$, respectivamente].

FIGURA 10: EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO



LEGENDA: **A:** Indica a porcentagem de congelamento da evocção, teste A1 e A2. Os animais tratados com C646 50ng expressaram uma redução da porcentagem de congelamento nos testes A1 e A2 em comparação ao grupo veículo. Houve uma redução da porcentagem de tempo de congelamento do grupo C646 50ng no teste A1 em comparação com a evocção. Houve uma redução da porcentagem de tempo de congelamento de todos os grupos no teste A2 em comparação com a evocção. **B:** Indica a porcentagem do tempo de congelamento nos testes B1 e B2. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados estão expressos pela média da porcentagem do tempo de congelamento $\pm$ E.P.M na evocção, Teste A1 e Teste A2. O * ($p < 0,05$) representa diferença estatística em relação ao grupo veículo. O # ($p < 0,05$) representa diferença estatística

quando comparados com o seu respectivo grupo. VEH (n=10), C646 5 ng (n=9) e C646 50 ng (n=9). C646: Inibidor da HAT p300/CBP. VEH: veículo (DMSO 50%).

4.2 A ADMINISTRAÇÃO DE C646 1H APÓS A SESSÃO DE EVOCAÇÃO PREJUDICA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

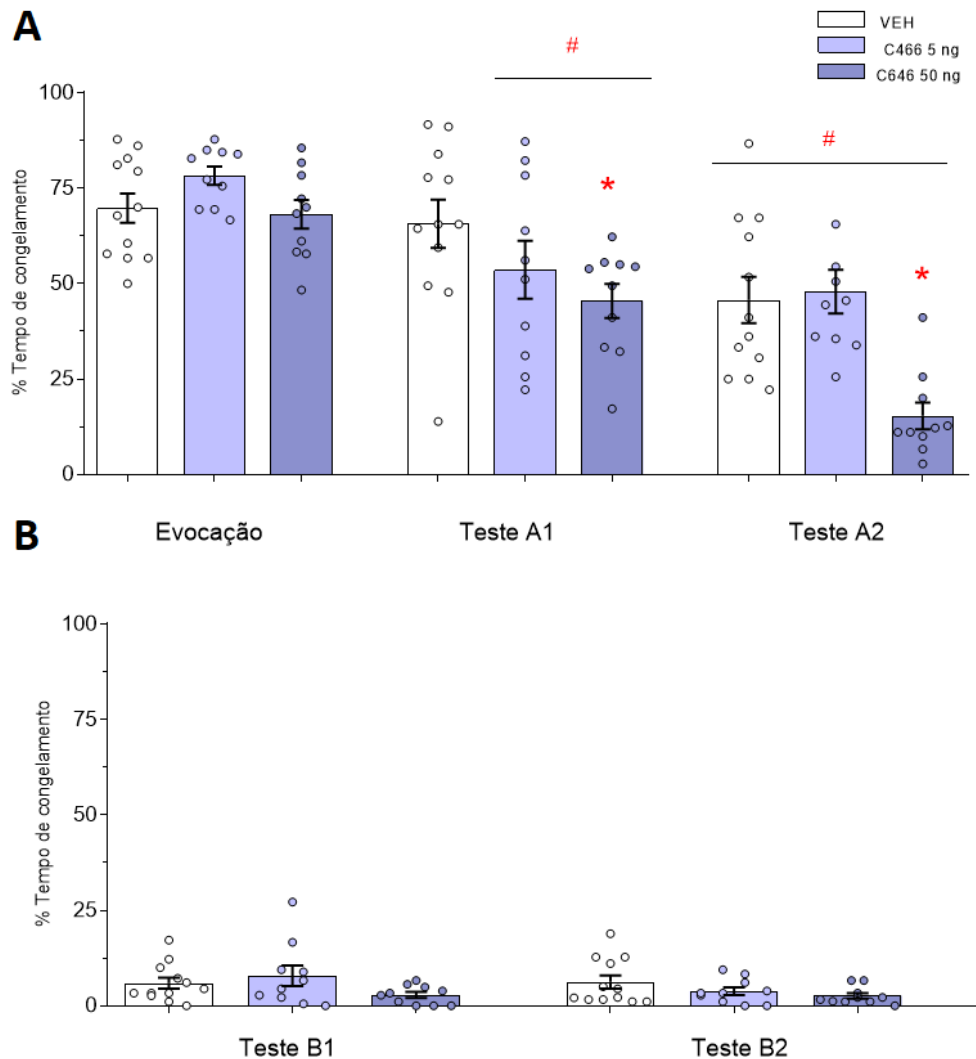
Como a janela de reconsolidação dura até 6 h, investigou-se se a inibição da acetilação de histonas era capaz de prejudicar a reconsolidação ou persistência da memória de medo em outros momentos da janela de reconsolidação. Portanto foi infundido C646 no PL 1h após a sessão de evocação da memória. Os animais foram randomizados em 3 grupos, sendo VEH (n=12), C646 5 ng (n=10) e C646 50 ng (n=10).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento [$F(2,30)=7,84$, $p=0,0018$], da reexposição ao contexto [$F(2,60)=65,60$, $p<0,0001$], e da interação entre o tratamento e a exposição ao Contexto A [$F(4,60)=4,72$, $p=0,0022$].

Como demonstrado na FIGURA 11A, o teste post hoc de Newman-Keuls mostrou que o grupo tratado com a maior dose de C646 (50 ng) apresentou tempo de congelamento estatisticamente menor durante o teste A1 ($p=0,012$) e A2 ($p=0,00037$) em relação ao grupo controle. Isso sugere que a inibição de CBP/p300 no córtex PL 1h após a evocação também é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória de medo.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma ausência de efeitos estatisticamente significativos do tratamento, reexposição e interação entre o tratamento e a exposição ao Contexto B nos Testes B1 e Teste B2 podem ser observados na Figura 11B [$F(2,30)=0,55$; $p=0,55$, $F(1,30)=0,004$; $p=0,95$, e $F(2,30)=2,34$; $p=0,12$, respectivamente].

FIGURA 11: EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO 1 HORA APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO



LEGENDA: **A:** Indica a porcentagem de congelamento da evocação, teste A1 e A2. Os animais tratados com C646 50ng expressaram uma redução da porcentagem de congelamento nos testes A1 e A2 em comparação ao grupo veículo. Houve uma redução da porcentagem de tempo de congelamento dos grupos tratados com C646 no teste A1 em comparação com a evocação. Houve uma redução da porcentagem de tempo de congelamento de todos os grupos no teste A2 em comparação com a evocação. **B:** Indica a porcentagem do tempo de congelamento nos testes B1 e B2. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados estão expressos pela média da porcentagem do tempo de congelamento $\pm$ E.P.M na evocação, Teste A1 e Teste A2. O * ($p < 0,05$) representa diferença estatística em relação ao grupo veículo. O # ($p < 0,05$) representa diferença estatística quando comparados com o seu respectivo grupo. VEH (n=12), C646 5 ng (n=10) e C646 50 ng (n=10). C646: Inibidor da HAT p300/CBP. VEH: veículo (DMSO 50%).

4.3 A INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NÃO ALTERA A MEMÓRIA DE MEDO 6H APÓS A SESSÃO DE EVOCAÇÃO

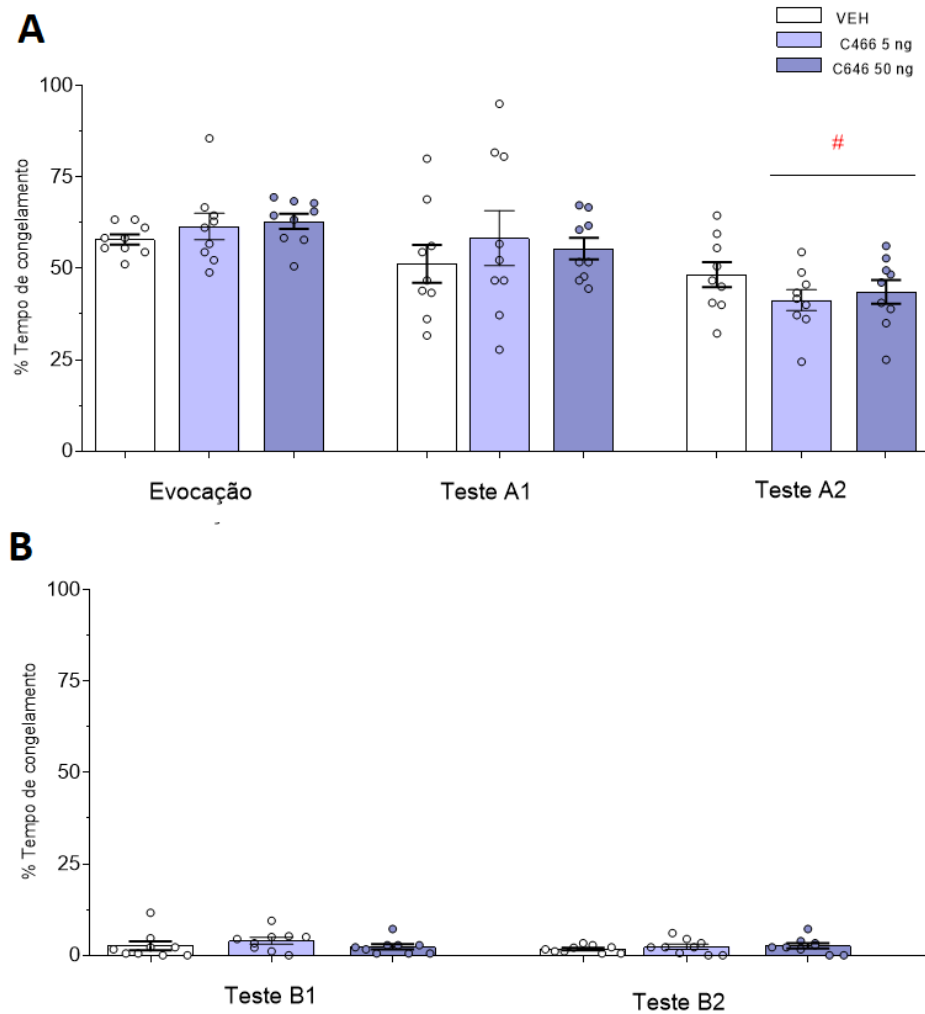
Como mencionada, a janela de reconsolidação pode durar até 6 horas, e a janela de persistência mais de 24 horas, para tanto investigou-se se a inibição da acetilação de histonas era capaz de prejudicar a reconsolidação ou persistência da memória de medo 6h após a evocação da memória de medo. Portanto foi infundido C646 no PL 6h após a sessão de evocação da memória. Os animais após a sessão de evocação em contexto A foram randomizados em 3 grupos, sendo VEH (n=9), C646 5 ng (n=9) e C646 50 ng (n=9).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo da reexposição ao contexto [$F(2,48)=18,97$, $p<0,0001$]. No entanto não houveram efeitos significativos do tratamento [$F(2,24)=0,87$, $p=0,43$], e da interação entre o tratamento e a exposição ao Contexto A [$F(4,48)=1,09$, $p=0,37$].

Na FIGURA 12A, é observado que o tempo de congelamento não é alterado de acordo com o tratamento realizado. Isso sugere que a inibição de CBP/p300 no córtex PL 6h após a evocação não é capaz de prejudicar a reconsolidação e persistência da memória de medo.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma ausência de efeitos estatisticamente significativos do tratamento, reexposição e interação entre o tratamento e a exposição ao Contexto B nos Testes B1 e Teste B2, como pode ser observado na Figura 12B [$F(2,24)=1,09$; $p=0,36$, $F(1,24)=0,83$; $p=0,37$, e $F(2,24)=0,54$; $p=0,59$, respectivamente].

FIGURA 12: EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO 6 HORA APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO



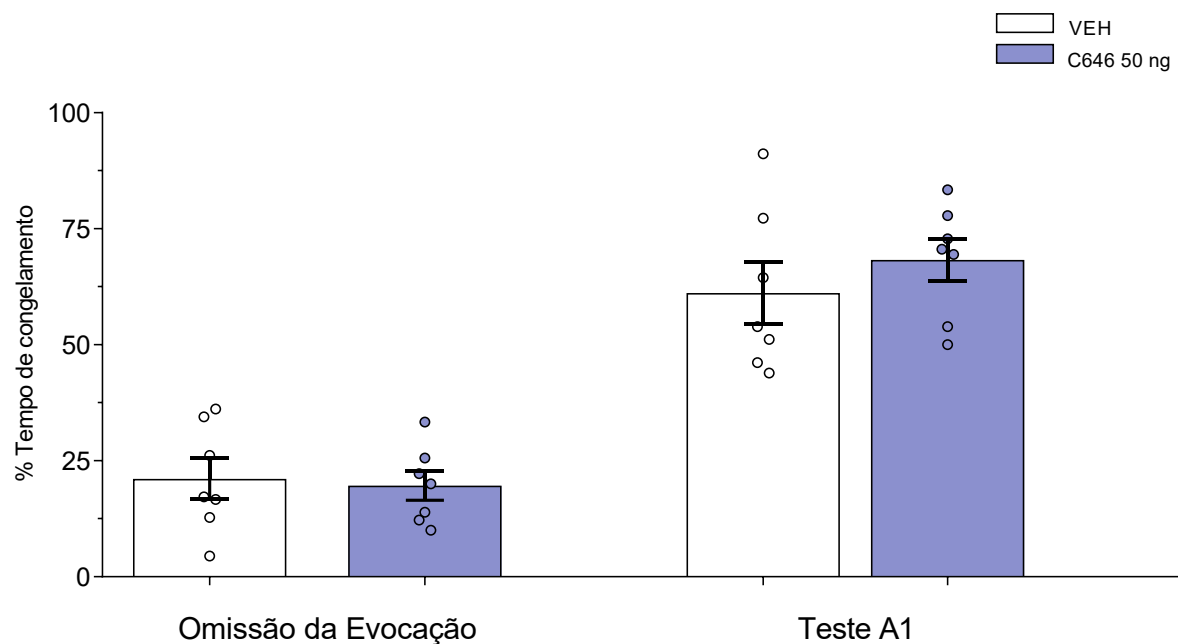
LEGENDA: **A:** Indica a porcentagem de congelamento da evocação, teste A1 e A2. Não houve diferença significativa entre os grupos em comparação ao grupo veículo. Houve uma redução da porcentagem de tempo de congelamento dos grupos tratados com C646 no teste A2 comparado com a evocação. **B:** Indica a porcentagem do tempo de congelamento nos testes B1 e B2. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados estão expressos pela média da porcentagem do tempo de congelamento $\pm$ E.P.M na evocação, Teste A1 e Teste A2. O # ($p < 0,05$) representa diferença estatística quando comparados com o seu respectivo grupo. VEH ($n=9$), C646 5 ng ($n=9$) e C646 50 ng ($n=9$). C646: Inibidor da HAT p300/CBP. VEH: veículo (DMSO 50%).

4.4 O EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS DEPENDE DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA

Para verificar se os efeitos observados no item 4.1 são dependentes da sessão de evocação, investigou-se a partir de um experimento controle se a inibição da acetilação de histonas após a omissão da evocação, por exposição no Contexto B era capaz de prejudicar a reconsolidação ou persistência da memória. Os animais após a sessão de omissão da evocação em contexto B foram randomizados em 2 grupos, sendo VEH (n=7) e C646 50 ng (n=7).

O teste t de student mostrou uma ausência de diferença entre os grupos durante a omissão da evocação ($t_{12} = -0,27$; $p = 0,78$). Além disso, o teste t de student mostrou que não houve diferença estatística no teste A1 ($t_{12} = 0,89$; $p = 0,39$), como pode ser observado na Figura 13.

FIGURA 13: EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO IMEDIATAMENTE APÓS A OMISSÃO DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO



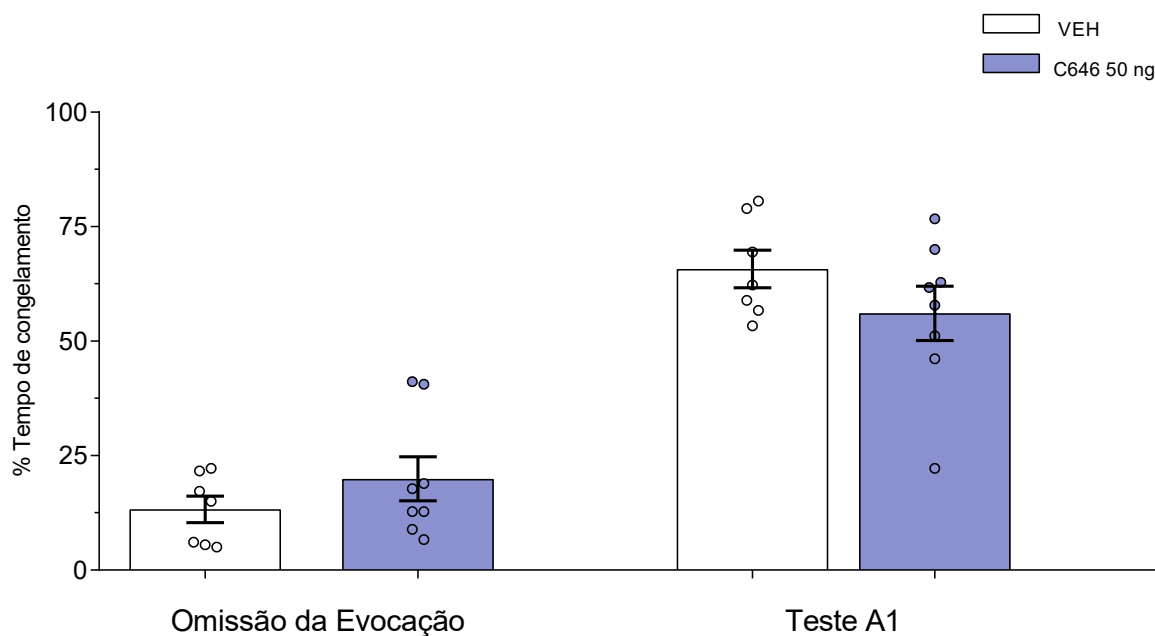
LEGENDA: Indica a porcentagem de congelamento da omissão da evocação, teste A1 e A2. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados estão expressos pela média da porcentagem do tempo de congelamento $\pm$ E.P.M na evocação, Teste A1 e Teste A2. VEH (n=7) e C646 50 ng (n=7). C646: Inibidor da HAT p300/CBP. VEH: veículo (DMSO 50%).

4.5 O EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS A APÓS 1H DEPENDE DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA

Para verificar se os efeitos observados no item 4.2 são dependentes da sessão de evocação investigou-se a partir de um experimento controle se a inibição da acetilação de histonas após a omissão da evocação, por exposição no Contexto B era capaz de prejudicar a reconsolidação ou persistência da memória. Os animais após a sessão de omissão da evocação em contexto B foram randomizados em 2 grupos, sendo VEH (n=7) e C646 50 ng (n=8).

O teste t de student mostrou uma ausência de diferença entre os grupos durante a omissão da evocação ($t_{13}=1,15$; $p=0,27$). Além disso, o teste t de student mostrou que não houve diferença estatística no teste A1 ($t_{13}= -1,30$; $p= 0,21$), como pode ser observado na Figura 14.

FIGURA 14: EFEITO DA INIBIÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO 1H APÓS A OMISSÃO DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO



LEGENDA: Indica a porcentagem de congelamento da omissão da evocação, teste A1 e A2. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados estão expressos pela média da porcentagem do tempo de congelamento $\pm$ E.P.M na evocação, Teste A1 e Teste A2. VEH (n=7) e C646 50 ng (n=8). C646: Inibidor da HAT p300/CBP. VEH: veículo (DMSO 50%).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigado se os efeitos do C646, um inibidor da HAT, alterariam a memória de medo ao contexto quando administrado diretamente na região do pré-límbico (PL) no córtex pré-frontal medial (CPFm), após uma sessão de reativação. Foi observado que o PL é uma estrutura importante que participa da reconsolidação da memória, imediatamente e após 1 hora da sessão de evocação, através de mecanismos epigenéticos. Este prejuízo na manutenção da memória ocorreu apenas quando as memórias foram evocadas, visto que não foram observados nenhum déficit de memória nos controles realizados. Além disso, a acetilação de histonas não parece ser um mecanismo recrutado nas fases tardias do processo de reconsolidação, visto que a sua modulação após 6 horas da sessão de evocação não afetou a memória de medo.

Apesar de dois processos diferentes, Izquierdo (2011) mostra que o processo de reconsolidação possui semelhanças com o processo de consolidação da memória. Estudos tem demonstrado que a acetilação de histonas H3 é aumentada após um estímulo, participando dos mecanismos de consolidação da memória (LEVENSON *et al.*, 2004). Federman, Fustinana e Romano (2013) mostrou em um modelo de invertebrados que a acetilação de H3 é induzida 1 hora após treino, e também após uma sessão de evocação, retornando aos níveis basais posteriormente.

Estudos em vertebrados, como o de Lubin e Sweatt (2007) demonstraram que esse mecanismo de acetilação também ocorre após 1 hora da reativação da memória contextual do medo na região CA1 do hipocampo. De maneira semelhante Maddox, Watts e Schafe (2013) demonstraram que a expressão da acetilação da histona H3 é aumentada após 90 minutos da reativação da memória de medo ao som na região da amígdala.

Apesar das alterações epigenéticas estarem sendo estudadas em várias regiões importantes para a formação da memória, como hipocampo e amígdala, poucos estudos tem demonstrado como esses mecanismos no CPFm podem interferir na memória de medo. Neste estudo foi observado que assim como no hipocampo (LUBIN; SWEATT, 2007), a modulação da acetilação de histonas no PL, também é capaz de modular a força da memória quando testada após 24 horas. E

ainda, que este efeito se estende por pelo menos 8 dias. Este efeito duradouro é relevante, já que estudos como o de Lattal e Abel (2004) demonstram que a inibição da síntese de proteínas no processo de reconsolidação podem causar prejuízos temporários na memória contextual de medo.

Até o momento sabe-se que um dos mecanismos de indução da acetilação de histonas após a reconsolidação da memória contextual de medo é através da via do NF- κ B, pela ativação de IKK α . O modelo proposto por Lubin e Sweatt (2007) demonstra que a proteína IKK α por meio da interação com p300/CBP induz a acetilação das histonas, levando a mudanças da conformação da cromatina, e consequentemente, ligação de fatores de transcrição como o NF- κ B.

Puckett e Lubin (2011) sugerem que as modificações em histonas podem levar a expressão de genes necessários para a plasticidade sináptica rapidamente após contato com um estímulo, causando impactos importantes para formação e manutenção das memórias.

A acetilação de H3 por IKK α -P300/CBP induz a ativação de Zif268. O Zif268 é considerado um gene importante para LTP, observado após a evocação em regiões do hipocampo e amígdala. Stern e colaboradores (2014) demonstraram ainda que há um aumento de Zif268 após a evocação da memória na região do PL e córtex cingulado. Lee e *et al.* (2004) mostrou que quando um *antisense* para o gene Zif268 foi injetado logo após a evocação da memória, a reconsolidação da memória foi prejudicada. Portanto, o prejuízo na reconsolidação observado quando houve a inibição de HAT imediatamente e 1h após a evocação, neste estudo, podem indicar um bloqueio da expressão de Zif268.

Monsey, Ruiz e Taylor (2019) propõem outros genes que podem estar sendo bloqueados pela inibição de HAT, como Arc. que desempenha um papel crítico nos processos de consolidação e reconsolidação de memórias associativas.

Vários estudos são abordados ainda por Maddox, Schafe e Ressler (2013), indicando que a modulação de HAT e HDAC podem levar a alteração nos níveis de BDNF, um mediador chave na formação e manutenção da memória de medo.

Pesquisas anteriores demonstraram que a modulação epigenética da acetilação das histonas contribui para o processo de reconsolidação em outros modelos de formação da memória, como a memória de reconhecimento de objetos, memória de medo ao som e a memória associada a cocaína.

Ameneiro *et al.* (2022) demonstraram que uma memória fraca de reconhecimento a objetos pode ser aprimorada após a inibição de HDAC imediatamente após a reativação. Maddox, Watts e Schafe (2014) demonstraram que o C646 infundido ABL 1 hora após a exposição é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória de medo ao som. E ainda, Monsey, Ruiz e Taylor (2019) mostraram que o garcinol, inibidor inespecífico de HAT, administrado na amígdala lateral após a reativação da memória associada a cocaína, prejudicou significativamente a reconsolidação.

Neste estudo foi demonstrado que assim, como em outros modelos a reconsolidação da memória contextual do medo também é afetada pela modulação epigenética de acetilação de histonas, imediatamente e 1 hora após a evocação.

A reconsolidação é um processo gradual que dura aproximadamente 6 horas, enquanto que mecanismos de persistência, podem durar até 12 horas (IZQUIERDO, 2011). Nesta janela temporal é possível que a memória se torne susceptível a ação de interferentes. Neste trabalho foi observado efeito do C646, quando administrado no PL imediatamente e 1 hora após a evocação, no entanto, não foi observado efeito quando administrado 6 horas após a evocação da memória. Este efeito sugere que a acetilação de histonas não interfere a fase final de reconsolidação, nem na persistência da memória.

A generalização pode ser caracterizada como a expressão de comportamentos de defesa em um ambiente neutro. Como apresentado nos resultados, não foi observado um aumento no tempo de congelamento dos animais quando expostos ao Contexto B, sugerindo que nas doses utilizadas o tratamento não interfere com a generalização da memória de medo.

6 CONCLUSÃO

Sugere-se que o papel da HAT p300/CP no PL contribui para a reconsolidação da memória de medo ao contexto, imediatamente e 1 h, após sessão de evocação, mas não 6 horas depois. A inibição da acetilação de histonas nas primeiras horas após a evocação pode influenciar na expressão de fatores de transcrição como NF- κ B e vários genes importantes para a re-estabilização da memória como o Zif268, Arc, e BDNF. Em investigações futuras, é necessário compreender ainda se os efeitos observados neste estudo permanecem ou se pode ocorrer reinstalação da memória com o passar do tempo, e ainda se a inibição de HAT pode modificar memórias remotas, que são mais estáveis e menos suscetíveis a intervenções.

Desta forma este trabalho contribui para o entendimento de como os mecanismos epigenéticos atuam no PL na regulação da memória e plasticidade sináptica, assim como caracterizam a acetilação de histonas como um alvo farmacológico promissor no tratamento da memória de medo, através das suas ações sobre a reconsolidação.

REFERÊNCIAS

- ALBERINI, C. M., KANDEL, E. R. The regulation of transcription in memory consolidation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 1, 2014.
- ALBERINI, C.M. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. **Front Behav Neurosci**. v. 5, n.12, 2011.
- AMENEIRO, L. *et al.* Characteristics of the Reminder that Triggers Object Recognition Memory Reconsolidation in Mice. **Neuroscience**, v. 497, p. 206–214, 2022.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - APA. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: **DSM-V**. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- BRASIL. Ministério da Justiça e Segurança Pública. Secretaria Nacional de Segurança Pública – SENAP. **Caderno técnico de tratamento do transtorno de estresse pós-traumático – TEPT**. Brasília, 2019.
- BUSTOS, S. G.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. **Neuroscience**, v. 139, p. 831–842, 2006.
- CAREAGA, M. B. L., GIRARDI, C. E. N., SUCHECKI, D. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 71, p. 48-57, 2016.
- CREAMER, M.; BURGESS, P.; MCFARLANE, A. C. Post-traumatic stress disorder: findings from the Australian National Survey of Mental Health and Well-being. **Psychological medicine**, v. 31, n.7, p. 1237-1247, 2001.
- DEBIEC, J.; LEDOUX J. E.; NADER K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**. v.36, p. 527-538, 2002.
- DUDAI, Y. The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram? **Annu Rev Psychol**. v. 55, p. 51-86. 2004.
- HAUER, D., *et al.*. The role of glucocorticoids, catecholamines and endocannabinoids in the development of traumatic memories and posttraumatic stress symptoms in survivors of critical illness. **Neurobiology of learning and memory**, v. 112, p. 68–74, 2014.
- HAYES, J. P.; VANELZAKKER, M. B.; SHIN, L. M. Emotion and cognition interactions in PTSD: a review of neurocognitive and neuroimaging studies. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 6, n. 89, 2012.
- HEIDBREDER, C.A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neurosci Biobeh Rev**. v. 27, p. 555-579, 2003.

HILL, M. N., *et al.* Integrating Endocannabinoid Signaling and Cannabinoids into the Biology and Treatment of Posttraumatic Stress Disorder. **Neuropsychopharmacology**. v. 43, n. 1, p. 80–102, 2018.

HUGHES, K. C., SHIN, L. M. Functional neuroimaging studies of posttraumatic stress disorder. **Expert Rev Neurother**. v.11, p. 275-285, 2011.

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

IZQUIERDO I. *et al.*, Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. **Revista USP**. n. 98, p. 9-16, 2013.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

JAVIDI, H., & YADOLLAHIE, M. Post-traumatic Stress Disorder. **The international journal of occupational and environmental medicine**, 2012.

KATCHE, C. *et al.* Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 1, p. 349-54, 2010.

KORZUS, E.; ROSENFELD, M. G.; MAYFORD, M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. **Neuron**, v. 42, n. 6, p. 961–972, 2004.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p.693-705, 2007.

LATTAL, K. M.; ABEL, T. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. **Proc Natl Acad Sci**. v. 101, p.4667-4672, 2004.

LEE, J. L. *et al.* Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science**. v. 304, p. 839-843. 2004.

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

LEVENSON, J. M.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in memory formation. **Nat. Rev. Neurosci**. v. 6, p. 108–118, 2005.

LOPES, A. C. P. *et al.* Aspectos moleculares da transmissão sináptica. **Medicina**. v. 32, p. 167-188, 1999.

LUBIN, F. D.; SWEATT, J. D. The I κ B kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. **Neuron**. V. 55, p. 942-957, 2007.

MADDOX, S. A., SCHAFE, G. E., RESSLER, K. J. Exploring epigenetic regulation of fear memory and biomarkers associated with post-traumatic stress disorder. **Front. Psychiatry**. v. 4, n. 62, 2013.

MADDOX, S. A.; WATTS, C. S.; SCHAFE, G. E. P300/CBP histone acetyltransferase activity is required for newly acquired and reactivated fear memories in the lateral amygdala. **Learning & Memory**, v. 20, n. 2, p.109-119, 2013.

MCCAUGH, J. L.; WEIBERGER, N. M.; LYNCH, G. **Brain organization and Memory** – cells, systems, and circuits. 1^a ed. NewYork: Oxford University Press, 1990.

MONSEY, M. S.; RUIZ, S. G.; TAYLOR, J. R. Regulation of Garcinol on Histone Acetylation in the Amygdala and on the Reconsolidation of a Cocaine-Associated Memory. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 13, n. 281, 2019

NADER, K., EINARSSON, E. O. Memory reconsolidation: An update. **Ann NY Acad Sci**. v.1191, p. 27–41, 2010.

PAXINOS G, WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Compact 6th ed. San Diego, CA: Academic Press. 2009.

PETERS, J., KALIVAS, P. W., QUIRK, G. J. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. **Learn Mem**. v. 16, p. 279-288, 2009.

PRZYBYSLAWSKI, J., SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Beh Brain Resear**. v. 84, p. 241-246, 1997.

PUCKETT, R. E.; LUBIN, F. D. Epigenetic mechanisms in experience-driven memory formation and behavior. **Epigenomics**. v. 3, n. 5, p. 649-664, 2011.

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

QUINN, J. J. *et al*. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Lear. Mem**. v. 15, p. 368-372, 2008.

RAHMANN, H.; RAHMANN, M. **The neurobiological basis of memory and behavior**. 1^a ed. New York: Library of Congress, 1992.

RESSLER, K. J., & MAYBERG, H. S. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nature neuroscience*, 2007.

REUL, J. M.; CHANDRAMOHAN, Y. Epigenetic mechanisms in stress-related memory formation. **Psychoneuroendocrinology**. v. 32, n. 1, p. 21-25, 2007.

SILVA, T. R. da, *et al.* Role of prelimbic cortex PKC and PKM ζ in fear memory reconsolidation and persistence following reactivation. **Scientific Reports**. v.10, n.4076, p. 1-12, 2020.

STERN, C. A. J.*et al.* On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, p. 2132-2142, 2012.

STERN, C. A. J.*et al.* Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. **Learn Mem.** v. 21, n. 1, p. 14-20, 2013.

SWANK, M. W.; SWEATT, J. D. Increased Histone Acetyltransferase and Lysine Acetyltransferase Activity and Biphasic Activation of the ERK/RSK Cascade in Insular Cortex During Novel Taste Learning. **The Journal of Neuroscience**. v. 21, n. 10, p. 3383-3391, 2001.

VARGA-WEISZ, P. D., BECKER, P. B. Chromatin-remodeling factors: machines that regulate? **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 10, p. 346–353, 1998.

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