



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

***“Análisis de los eventos moleculares inducidos por la inhibición de la HDAC1 que modifican la memoria”***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Doctor en Ciencias**

Presenta

**M. en C. Gerardo Ramírez Mejía**

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Federico Bermúdez Rattoni**

Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. Julio Morán Andrade**

Instituto de Fisiología Celular

**Dr. Ernesto Soto Reyes Solís**

Universidad Autónoma Metropolitana

Ciudad Universitaria, CD. MX., Marzo, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## TESIS

### ***Análisis de los eventos moleculares inducidos por la inhibición de la HDAC1 que modifican la memoria***

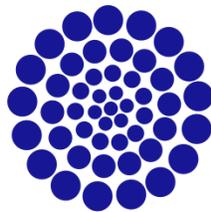


Laboratorio de  
Neurobiología del  
Aprendizaje y la Memoria

Los estudios conductuales, histológicos y bioquímicos se realizaron en el **Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria** del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del **Dr. Federico Bermúdez Rattoni**.

Con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT grant **250870**, CONACyT grant **FOINS 474**) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (DGAPA-PAPIIT-UNAM grant **IN212919**).

También se contó con el apoyo del técnico académico Dr. Luis F. Rodríguez Durán.



**CONACYT**

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*

El alumno **Gerardo Ramírez Mejía** agradece al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgar la Beca Nacional con el **No. de registro de becario 308739** (número de apoyo **429560**, número de CVU **588333**) del periodo de Febrero de 2016 a Enero de 2020.

A mis padres, Carlos Enrique y María Bernardita, por ser los pilares más importantes en mi vida les agradezco quién soy.

A mis hermanos, Raquel y José Carlos, por todo lo que hemos vivido juntos y porque siempre están ahí.

A mi hermano postizo, Luis Andrés, por ser la voz crítica que ayudó en mi formación.

A mis grandes amigos Alondra, Elvi y Óscar porque creyeron en mí cuando yo dejé de hacerlo.

## AGRADECIMIENTOS

Cero y van tres... por tercera ocasión me encuentro sentado frente a mi computadora tratando de escribir la parte más difícil de todo este documento...

A **Dios** y a la **vida** por ponerme grandes retos personales, pero sobre todo por poner a gente tan valiosa en mi camino, personas que ni en los mejores sueños hubiera podido imaginar y que me han apoyado de maneras innumerables e indescriptibles.

A mis modelos de vida, mis padres **Carlos Enrique Ramírez Arizpe** y **María Bernardita Mejía Pérez**, porque siempre me han apoyado en mis locuras y me han demostrado que el amor no tiene límites. A mi hermana **Raquel** porque siempre estás en los mejores eventos, jeje, apoyándome absolutamente en todo y haber usado las palabras exactas, precisas y preciosas para demostrar tu amor hacia mí. A mi hermano **José Carlos**, gracias por apoyarme y cuidarme en varias ocasiones, así también por hacerme reír en los momentos menos pensados, también gracias por las palabras para demostrar tu amor hacia mí. A mi hermano **Luis Andrés Gonzaga** por hacerme reír y tener la entera disposición de escucharme cuando lo he necesitado. Sé que caí en la mejor familia, los amo.

A mis amigos **Alondra**, **Elvi** y **Óscar** porque han estado junto a mí para escucharme, regañarme, aconsejarme y apoyarme; me hacen reír más y fuerte y hacen que mis días sean mejores. De verdad que siento pena por aquellas personas que no tienen a gente como ustedes. "Larga vida a los amigos que nos han visto por los suelos y aun así nunca se cansan de seguir levantándonos".

Al **Dr. Federico Bermúdez Rattoni** por todo el apoyo que he recibido durante tantos años, desde que este pequeño viaje inició con un “sí” de su parte, muchas gracias también por la paciencia que me ha tenido y por ser una persona ejemplar.

A los miembros del comité tutor, al **Dr. Ernesto Soto Reyes Solís** y al **Dr. Julio Morán Andrade** por todo el apoyo que me brindaron, la amabilidad y la disponibilidad prestada en las reuniones donde aportaron muchísimo para este proyecto.

A los miembros del comité revisor:

**Dra. María de Lourdes Massieu Trigo**

**Dra. Gina Lorena Quirarte**

**Dra. Angélica Zepeda Rivera**

**Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez**

**Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez**

Por todos los comentarios y observaciones que ayudaran a nutrir el trabajo y a organizar mis ideas para mejorar el análisis de la información.

A la **MVZ Claudia Rivera Cerecedo** y al **MVZ Héctor Malagón** por proporcionar los animales para la realización de los experimentos, así también por la amabilidad y la atención recibida cada vez que necesité de su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria (BL-201), ya que en todos los seminarios que tuvimos pude aprender mucho de ustedes.

*“Todo tiene su tiempo y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora”*

*Eclesiatés 3, 1*

*“Everything that has a beginning has an end...”*

*The Oracle, Matrix Revolutions*



## Índice

RESUMEN.....	A
ABSTRACT .....	B
ÍNDICE DE FIGURAS .....	C
Lista de abreviaturas .....	E
1. Introducción.....	1
1.1 Aprendizaje y memoria .....	2
1.2 Mecanismos moleculares y celulares del aprendizaje y la memoria de reconocimiento .....	5
1.3 La corteza insular y la memoria de reconocimiento .....	7
1.4 Modificaciones de la cromatina asociadas al aprendizaje y la memoria... 11	
1.5 Inhibidores de las desacetilasas de histona y mejora cognitiva.....	21
1.6 Factor neurotrófico derivado del cerebro.....	22
1.7 Modificaciones en la plasticidad neuronal por la inhibición de las HDACs .....	29
2. Justificación.....	34
3. Hipótesis .....	36
4. Objetivos .....	36
4.1 Objetivo general .....	37
4.2 Objetivos particulares .....	37
5. Materiales y métodos .....	38
5.1 Sujetos experimentales.....	39
5.2 Cirugía estereotáxica .....	39
5.3 Fármacos .....	39
5.4 Inyecciones intracerebrales .....	40
5.5 Reconocimiento del objeto novedoso (ORM) .....	40
5.6 Condicionamiento aversivo al sabor (CTA) .....	41



5.7	Extracción y cuantificación de proteínas .....	41
5.8	Electroforesis e inmunoblot.....	42
5.9	Tinción de Nissl.....	43
5.10	Análisis estadístico .....	44
6.	Resultados .....	45
6.1	El entrenamiento fuerte, pero no el débil, induce formación de memoria de reconocimiento asociado al incremento en BDNF .....	46
6.2	La inhibición de las HDACs de clase I en la corteza insular favorece la consolidación en el entrenamiento débil, pero impide la consolidación en el entrenamiento fuerte.....	48
6.3	La inhibición de las HDACs de clase I induce incremento en la acetilación de histonas y en los niveles de BDNF de manera dependiente de la intensidad del estímulo .....	50
6.4	La inhibición de la actividad de los receptores TrkB revierte el efecto inducido por la inhibición de las HDACs de clase I de manera dependiente del tiempo .....	52
6.5	La inhibición de las HDACs de clase I modifica el establecimiento del condicionamiento aversivo al sabor de manera dependiente de la intensidad del estímulo .....	54
7.	Discusión.....	57
8.	Conclusiones.....	65
9.	Perspectivas.....	67
10.	Referencias .....	69
11.	Anexos.....	82
11.1	Publicación .....	83



## RESUMEN

La formación de la memoria se refiere a un proceso en el cual la información pasa de corto a largo plazo a través de la consolidación, evento en el cual se requiere la expresión génica y la síntesis de proteínas. Se ha demostrado que las modificaciones epigenéticas como la acetilación de histonas regulan la expresión de genes como el factor neurotrófico derivado del cerebro (*Bdnf*); la proteína resultante de este gen, BDNF, está estrechamente asociada a la consolidación. Diversos estudios indican que las desacetilasas de histona (HDACs) regulan negativamente la formación y el mantenimiento de la memoria y que el proceso es afectado por la intensidad del estímulo. En este aspecto, se ha demostrado que la inhibición de las HDACs en el hipocampo puede generar un efecto positivo en la formación de la memoria, sin embargo poco se ha estudiado la participación de estas enzimas en otras áreas cerebrales. El objetivo del presente proyecto fue analizar los efectos de la inhibición de las HDACs en la corteza insular, así como su papel en la regulación de la abundancia de BDNF y la asociación al proceso de formación de la memoria. Se usaron ratones de la cepa C57BL6 de 2 a 3 meses de edad. Se realizaron inyecciones en la corteza insular anterior de vehículo o de MS-275 (inhibidor de las HDACs de clase I) previo al entrenamiento de diferentes duraciones, denominadas como débil (3 min) y fuerte (10 min) de la tarea de reconocimiento de objetos; se inyectó además K252a (inhibidor del receptor TrkB) posterior al entrenamiento débil y fuerte de la tarea de reconocimiento de objetos, con el objetivo de inhibir la actividad del receptor TrkB y analizar su relación temporal con la consolidación de la memoria. Con la finalidad de analizar las modificaciones en la acetilación de histonas y en la expresión de BDNF, diversos grupos de animales fueron sacrificados a diferentes tiempos posteriores al entrenamiento de la tarea de reconocimiento de objetos. Además otro grupo de animales fue evaluado un día después para la evaluación de la memoria de largo plazo (LTM).

Los resultados mostraron que la inhibición de las HDACs de clase I en la corteza insular incrementa la acetilación de histonas (analizado con la marca H4K12ac) en condiciones fuertes y débiles de aprendizaje, así como en los niveles de BDNF de acuerdo con la intensidad de los estímulos, con un patrón temporal claramente distinto. Además en condiciones débiles de aprendizaje, la inhibición de las HDACs de clase I potencia la formación de la memoria, pero se bloquea en condiciones fuertes de aprendizaje. La inhibición de la actividad de los receptores TrkB revierten estos eventos en momentos específicos posteriores al entrenamiento, lo cual indica que los efectos de la inhibición de las HDACs ocurren a través de una fina regulación temporal sobre la activación del receptor TrkB por el BDNF.

El presente trabajo muestra que las alteraciones sobre la regulación epigenética pueden alterar la temporalidad de los eventos asociados a la consolidación de la memoria y que dicha modificación depende de las condiciones de entrenamiento.



## ABSTRACT

The memory formation is a process to establish short-term information to long-term through consolidation, where gene expression and protein synthesis are pivotal for this process. Epigenetic modifications such as histone acetylation regulate the expression of genes like brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*); the translation of this gene is the BDNF, a protein related to consolidation. Several studies showed that histone deacetylases (HDACs) negatively regulate memory formation and maintenance. In this sense, it has been shown that hippocampal HDACs inhibition favors memory formation; however the role of the HDACs on memory formation for different brain areas remains poorly understood. The aim of this project was to analyze the effects of the class I HDACs inhibition on the insular cortex over BDNF abundance and the association with memory formation. Two- to three-months old female and male C57BL6/J were used for all experiments. Mice were injected into the insular cortex with vehicle or MS-275 (class I HDACs inhibitor) before training; mice also received intracortical injections of K252a (inhibitor of the TrkB receptor) after training for object recognition memory task, the objective to inhibit the TrkB receptor activity was to analyze the temporal relation between TrkB activity and memory consolidation. In order to analyze the histone acetylation levels and the BDNF abundance timeline, different groups of mice were sacrificed at different time points after the object recognition training. A different group of mice were analyzed to assess long-term memory (LTM).

The results showed that class I HDAC inhibition in the insular cortex increases the histone acetylation (assessed by the H4K12ac) for the weak and strong training; the BDNF abundance was increased, and the BDNF timeline was different and it depends of the class I HDAC inhibition and the training intensity. The class I HDAC inhibition enhances the memory consolidation for the weak training conditions; however the class I HDAC inhibition impairs the memory consolidation for strong training conditions. The inhibition of TrkB receptors after training reverses the effects of class I HDAC inhibition over memory consolidation. This result suggests that potentiation and blockade of memory consolidation induced by class I HDAC inhibition occur because of a specific temporal regulation for TrkB receptors by the BDNF.

All in all, this work shows that modifications in the epigenetic regulation affects the temporal regulation for the events associated with memory consolidation and it depends on the training conditions.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos asociados al aprendizaje y la memoria .....	3
Figura 2. Comunicación neuronal y plasticidad .....	6
Figura 3. Comunicación nerviosa en el ORM .....	9
Figura 4. Comunicación nerviosa en el CTA .....	10
Figura 5. Metilación del DNA .....	12
Figura 6. Metilación de histonas .....	17
Figura 7. Acetilación de histonas .....	19
Figura 8. Equilibrio de acetilación-desacetilación de histonas .....	21
Figura 9. Producción y procesamiento del BDNF en el sistema nervioso central..	24
Figura 10. Vías de señalización canónicas activadas por BDNF a través del receptor TrkB.....	27
Figura 11. Organización del gen de BDNF .....	28
Figura 12. Efecto de la inhibición de las HDACs de clase I sobre la inducción de LTP en animales viejos anestesiados.....	30
Figura 13. La inhibición de las HDACs de clase I mejora la formación de memoria en el CTA y el ORM en animales viejos .....	31
Figura 14. La inhibición de las HDACs de clase I no modifica la expresión del mRNA <i>Bdnf</i> a las 4 h post-adquisición del CTA .....	32
Figura 15. La formación de la memoria de largo plazo (LTM) depende de la intensidad del entrenamiento .....	47
Figura 16. La expresión de BDNF depende de la intensidad del entrenamiento...	48
Figura 17. La inhibición de las HDACs de clase I potencia la formación de memoria en condiciones débiles, mientras que bloquea la formación de memoria en condiciones fuertes .....	49
Figura 18. La inhibición de las HDACs de clase I modifica la acetilación de histonas y la expresión de BDNF en un patrón temporal diferente .....	51



Figura 19. La potenciación de la formación de la memoria en el entrenamiento débil, inducida por la inhibición de las HDACs de clase I, depende de la actividad de los receptores Trk a las 4 hrs post entrenamiento..... 53

Figura 20. El bloqueo de la formación de la memoria en el entrenamiento fuerte, inducido por la inhibición de las HDACs de clase I, depende de la actividad de los receptores Trk 1 hora post entrenamiento..... 54

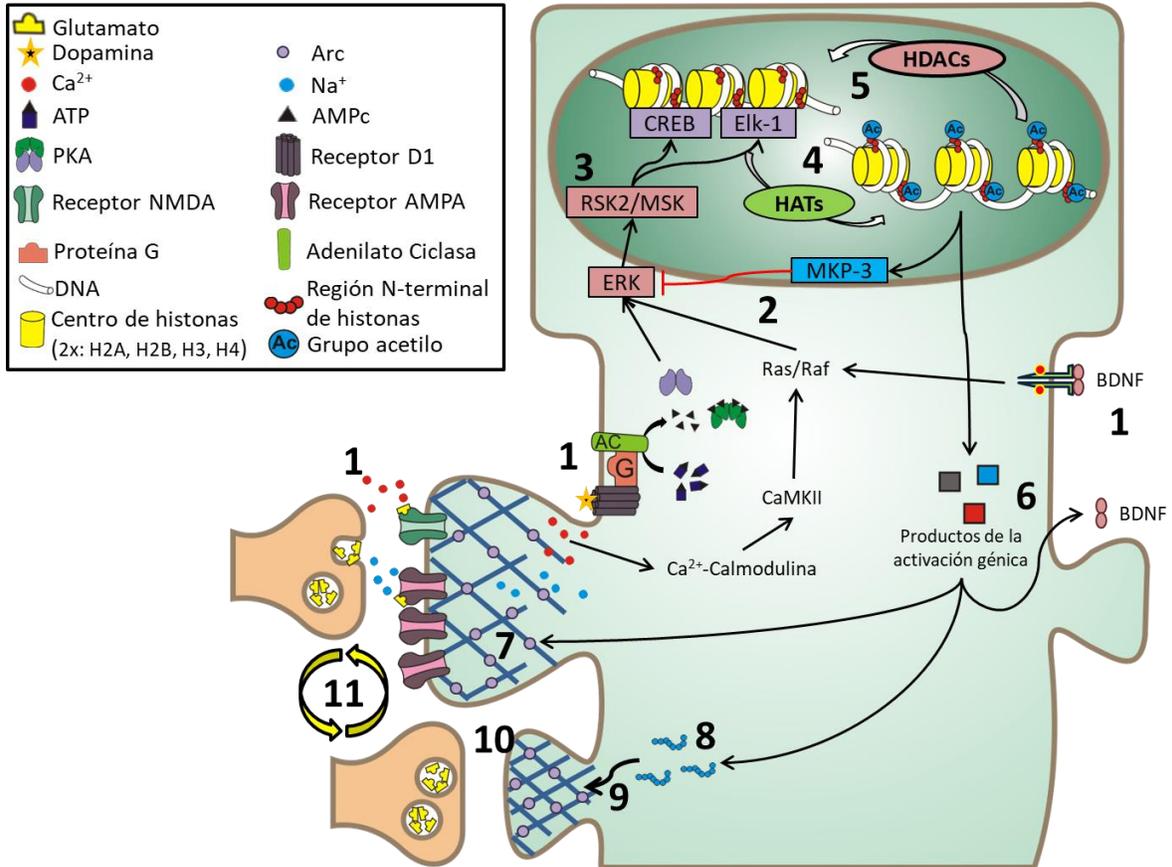
Figura 21. La inhibición de las HDACs de clase I ocasiona un efecto diferencial, dependiente de la intensidad del estímulo, sobre la formación de la aversión condicionada al sabor ..... 55

Figura 22. La inhibición de las HDACs de clase I incrementa la abundancia de BDNF (4h) posterior al entrenamiento débil y favorece la consolidación, pero induce el incremento temprano de BDNF (1h) posterior al entrenamiento fuerte e impide la consolidación ..... 62



## Lista de abreviaturas

<i>Bdnf</i>	Gen o mRNA del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro.
BDNF	Proteína Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
CTA	Condicionamiento aversivo al sabor (por sus siglas en inglés <i>conditioned taste aversión</i> )
H4K12ac	Lisina 12 acetilada de la histona 4
HDACs	Desacetilasas de histona
IC	Corteza insular (por sus siglas en inglés <i>insular cortex</i> )
LTM	Memoria de largo plazo (por las siglas en inglés <i>long-term memory</i> )
ORM	Memoria de reconocimiento de objetos
STM	Memoria de corto plazo (por las siglas en inglés <i>short-term memory</i> )
TrkB	Receptor Tirosina cinasa B



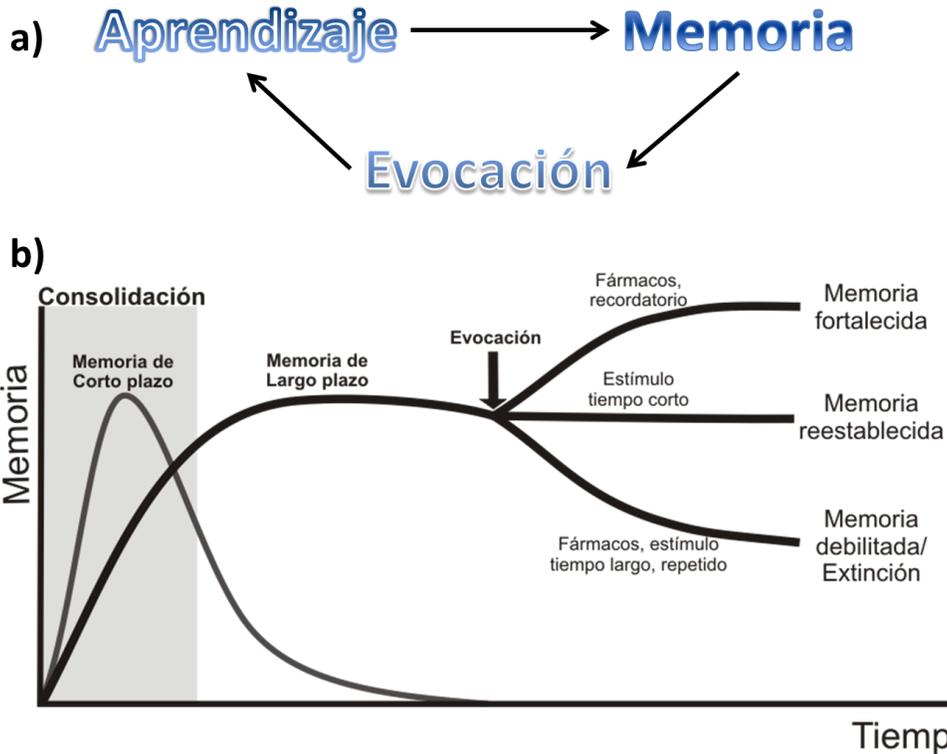
# 1. Introducción



## 1.1 Aprendizaje y memoria

El aprendizaje y la memoria son el medio a través del cual los seres vivos se adaptan al ambiente para su supervivencia. El aprendizaje se define como la adquisición de nueva información, mientras que la memoria es la codificación y el almacenamiento de la información adquirida (Kandel y Pittenger, 1999). La memoria puede clasificarse, de acuerdo a la duración, en memoria de corto (STM, por sus siglas en inglés *short-term memory*) y de largo plazo (LTM, por sus siglas en inglés *long-term memory*) (Abel y Lattal, 2001). La STM es una retención de la información durante un tiempo breve y se basa en cambios efímeros, eléctricos o moleculares de las redes neuronales implicadas que, dependiendo de las características del estímulo, pueden generar cambios persistentes y llevar a un proceso denominado consolidación de la memoria que se evidencia por la síntesis de nuevas proteínas y cambios estructurales (Goelet *et al.*, 1986).

El resultado de la consolidación de la memoria es el establecimiento de la LTM, basada en cambios estructurales persistentes, por ejemplo la formación de nuevas espinas dendríticas, aumento en el número de vesículas o de terminales presinápticas para la estabilización de la sinapsis y el fortalecimiento de la comunicación neuronal (Abel y Kandel, 1998). Así, la diferencia fundamental entre la STM y la LTM es la síntesis de proteínas que ocurre para el establecimiento de la LTM (Barco *et al.*, 2006). Una etapa más es denominada evocación, se trata de la recuperación de la información y es observable por un cambio conductual en el sujeto. La evocación ocasiona la modificación de la información almacenada, de tal manera que la memoria puede debilitarse, fortalecerse o mantenerse; a estos últimos eventos se les ha denominado en conjunto como actualización de la memoria (Figura 1) (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 2017; Dudai, 2004; Morgado, 2005).



**Figura 1. Procesos asociados al aprendizaje y la memoria.** a) El aprendizaje es la adquisición de nueva información e induce la formación de la memoria que es la codificación y almacenamiento de la información. El proceso de evocación es la recuperación de la información almacenada, y se evidencia por un cambio conductual. La evocación puede conducir a la modificación de la información almacenada. b) De acuerdo a la temporalidad, se distinguen dos tipos de memoria: corto y largo plazo, la diferencia entre estos tipos está determinado por el proceso de consolidación, en el cual ocurre síntesis de proteínas con la intención de establecer una memoria más duradera. Una vez que ocurre la evocación, dependiendo de las condiciones de evocación, la memoria puede fortalecerse (debido a fármacos que favorecen la comunicación neuronal o a un recordatorio), reestablecerse (al presentarse un estímulo de tiempo corto) o debilitarse (extinguirse, por fármacos o agentes amnésicos, un estímulo de tiempo largo o repetido). (Modificado de Dudai, 2004 y Bermúdez-Rattoni, 2017).

La saliencia es una característica que facilita que un estímulo se consolide, esta es señalizada por diversos factores que incluyen las propiedades físicas y químicas propias del estímulo, el valor hedónico y el estado fisiológico del organismo, así los estímulos salientes se priorizan para ser consolidados (Cowan et al., 2021; Hyman, 2005). La intensidad y duración del estímulo determina la probabilidad de que la información sea almacenada, así también un mayor número de ensayos incrementa la probabilidad de que la información se consolide y



genere la LTM (Bailey *et al.*, 1996; Kandel, 2001; Riley y Tuck, 1985; Uchida *et al.*, 2017).

La memoria también puede ser clasificada en declarativa y no declarativa. La memoria declarativa o explícita se refiere a la información que es evocada de manera consciente y puede ser subdividida en episódica (autobiográfica o para eventos específicos) y semántica (de tipo más abstracta, sobre hechos) (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2008; Engelmann *et al.*, 2011). Mientras que la memoria no declarativa o implícita es evocada de manera inconsciente y puede ser dividida en no asociativa (habitación y sensibilización), asociativa (condicionamiento clásico y operante) y hábitos (Engelmann *et al.*, 2011; Kandel y Pittenger, 1999; Morgado, 2005).

La memoria declarativa se refiere a la capacidad de recordar conscientemente el pasado y depende de la integridad del lóbulo temporal medial (que comprende el hipocampo, la circunvolución dentada, el complejo subicular, así como las cortezas entorrinal, perirrinal e insular) (Balderas, *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017). Uno de los ejemplos más ampliamente estudiados de la memoria declarativa es el reconocimiento: la capacidad de juzgar un elemento encontrado recientemente como si se hubiera presentado previamente. Se considera que la memoria de reconocimiento consta de dos componentes: recuerdo y familiaridad (Brown y Aggleton, 2001). En la siguiente sección, se revisarán algunos de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el aprendizaje y la memoria de reconocimiento en la IC, aunque estos procesos no son exclusivos de esta estructura, si parecen estar muy involucrados.



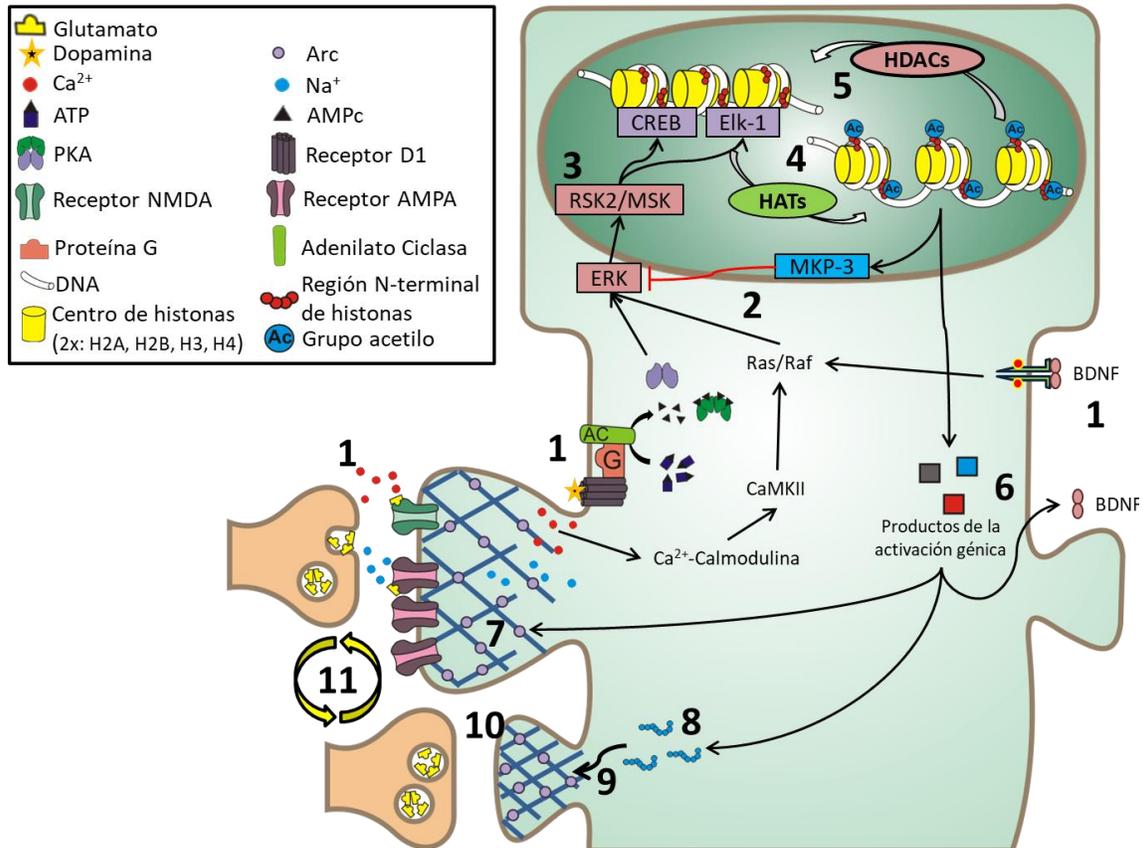
## 1.2 Mecanismos moleculares y celulares del aprendizaje y la memoria de reconocimiento

La base fundamental de la capacidad de adaptación (plasticidad) neural es la comunicación sináptica entre neuronas y tiene como consecuencia la modificación de la frecuencia e intensidad de dicha comunicación (postulado de Hebb) (citado por Escobar-Rodríguez, 2008). En la memoria de corto plazo, los cambios asociados son observables por la facilitación en la comunicación neuronal, que en caso de ser mantenidos, se induce la consolidación de la memoria. Cuando una neurona es estimulada a altas frecuencias por una segunda neurona, se fortalece la comunicación entre ellas, generando lo que se denomina potenciación a largo plazo (*long term potentiation*, LTP) que ha sido un mecanismo estrechamente asociado a la consolidación y persistencia de la memoria.

Para la formación de la memoria, la comunicación neuronal tiene un papel central, el proceso inicia con la liberación de neurotransmisores excitadores, como el glutamato. Una vez que este neurotransmisor se libera, activa a sus receptores glutamatérgicos ionotrópicos (AMPA y NMDA). Como consecuencia de la activación de dichos receptores hay entrada de iones  $Ca^{2+}$ , a través principalmente del receptor NMDA; esto sumado a la activación de receptores a neuromoduladores (como dopamina) y receptores de neurotrofinas y factores de crecimiento, modulan un equilibrio entre cinasas y fosfatasa. El equilibrio hacia la actividad de cinasas (donde destaca la vía de MAPK – ERK) induce el transporte retrógrado de la información de la sinapsis al núcleo y la activación de factores de transcripción; esta activación de factores de transcripción recluta modificadores de la cromatina (como las acetiltransferasas de histona, HATs) asociados a la expresión génica. Existen mecanismos de regulación inmediatos (como las desacetilasas de histona, HDACs) que están asociados a la regulación negativa de los genes previamente activados. Una vez que se expresan los genes implicados en la consolidación, estos productos de activación génica viajan a la sinapsis y fortalecen las sinapsis pre-existentes o inducen la formación de nuevas sinapsis. Este fortalecimiento en las conexiones neuronales ha sido asociado a los



procesos de consolidación. El modelo clásico para la formación de la memoria se ilustra en la Figura 2. La alteración de alguno de estos puntos del proceso induce modificaciones a los procesos del aprendizaje y la memoria (Barco et al., 2006; Day y Sweatt, 2011; Kandel y Pittenger, 1999; Wetzell et al., 2015).



**Figura 2. Comunicación neuronal y plasticidad.** Se han identificado algunos puntos para la formación de la memoria. **1)** Liberación del neurotransmisor, neuromoduladores y neurotrofinas que activan a los receptores postsinápticos; **2)** Activación de diferentes vías de señalización; **3)** Transporte retrógrado de la información de la sinapsis al núcleo, mediada principalmente por la vía de las MAPK (ERK); **4)** La activación de factores de transcripción y de acetilasas de histona (HATs); **5)** Activación de las desacetilasas de histona (HDACs) para el silenciamiento génico; **6)** Generación de productos de la activación génica; **7)** Llegada a la sinapsis de productos génicos; **8)** Síntesis local de proteínas en sinapsis activas; **9)** Formación y crecimiento de nuevas sinapsis; **10)** Activación de sinapsis silenciosas preexistentes y **11)** Mecanismos de perpetuación y persistencia de la memoria.  $Ca^{2+}$ /calmodulina proteína cinasa II (CaMKII); Proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK); Proteína cinasa A (PKA); Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); Proteína asociada a citoesqueleto regulada por actividad (Arc). (Tomada, modificada e integrada de Barco *et al.*, 2006; Day y Sweatt, 2011; Wetzell *et al.*, 2015).



### 1.3 La corteza insular y la memoria de reconocimiento

La corteza insular (IC, por sus siglas en inglés *Insular Cortex*) es parte de la neocorteza ubicada en el lóbulo temporal lateral en primates y humanos (Jones et al., 2010). En roedores, la IC se encuentra a lo largo del surco rinal y la arteria cerebral media. Los límites anatómicos de la IC van desde la corteza frontal hasta la corteza perirrinal en dirección rostrocaudal y desde el borde ventral de la corteza somatomotora hasta la corteza piriforme en dirección dorsoventral (Cechetto y Saper, 1987). La IC es un área de integración anatómica con gran conectividad a una extensa red de regiones cerebrales corticales y subcorticales que cumplen funciones sensoriales, emocionales, motivacionales y cognitivas. Las aferentes corticales llevan información a la IC a través de información extensa (auditiva, somatosensorial, olfativa, gustativa y visual) y a través de información interoceptiva. Varias de estas entradas proyectan a regiones sensoriales de la IC topográficamente organizadas. Es importante tener en cuenta que ninguna de estas regiones sensoriales procesa una sola entrada sensorial principal, todas las regiones de la IC reciben fuertes aferentes transmodales y son consideradas como sitios de integración multimodal (Gogolla, 2017).

Durante mucho tiempo la IC ha sido altamente relacionada con la función gustativa, almacenando información a largo plazo de estímulos apetitivos como aversivos impulsados por la novedad (Bermudez-Rattoni, 2014). Sin embargo, también se ha correlacionado con otros estímulos sensoriales como la visión, el oído, el tacto y el olfato (Augustine, 1996).

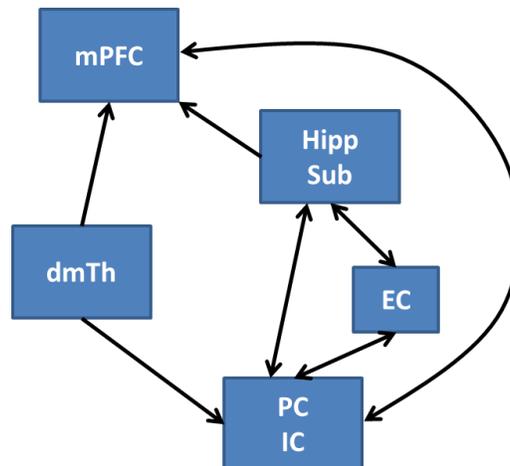
La memoria de reconocimiento es una de las habilidades de supervivencia desarrollada por los animales a lo largo de la evolución y el deterioro de esta característica es una de las principales causas de algunos síndromes amnésicos relacionados con la incapacidad para discriminar los eventos nuevos de los familiares (Bermudez-Rattoni, 2014). La memoria de reconocimiento se refiere a la capacidad de los animales y humanos para discriminar los estímulos novedosos de los familiares (Richter *et al.*, 2005).

En el área de investigación básica, los procesos de aprendizaje y memoria de reconocimiento pueden ser evaluados principalmente, a través de dos



paradigmas conductuales: memoria de reconocimiento de objetos y condicionamiento aversivo al sabor (Balderas *et al.*, 2008; Bermúdez-Rattoni, 2004). A continuación se describen brevemente estos paradigmas conductuales que fueron usados en este trabajo y están asociados al funcionamiento de la IC.

**Memoria de reconocimiento de objetos (ORM, por sus siglas en inglés *object recognition memory*).** Esta tarea se ha descrito como la habilidad de conocer algo previamente experimentado (un estímulo o todo un acontecimiento). Una parte importante de este modelo es la novedad, entendida como la alteración de lo esperado basado en la información conocida. En este modelo se aprovecha el comportamiento exploratorio innato del roedor, no requiere de manipulaciones externas (reforzadores o castigos), simplemente se necesita de una habituación previa, además que no se altera el componente motivacional del animal (debido a la privación de alimento o agua, no hay recompensa ni generación de ansiedad). Durante el aprendizaje al sujeto se le presentan dos objetos idénticos (A + A) para que los explore para finalmente en la fase de prueba o evaluación de la memoria se mantiene uno de los objetos previos (A) y se le presenta un objeto nuevo (B) en la posición que ocupaba el anterior, de esta manera el animal que haya aprendido explorará durante más tiempo al objeto novedoso (Antunes y Biala, 2012). En este tipo de memoria participan diferentes estructuras del lóbulo temporal, pero principalmente destaca la corteza perirrinal y la IC ya que inhibir la síntesis de proteínas en dichas cortezas, impide la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos (Figura 3) (Balderas *et al.*, 2008, 2015; Bermúdez-Rattoni *et al.*, 2005; Blaser y Heyser, 2015; Grayson *et al.*, 2015).

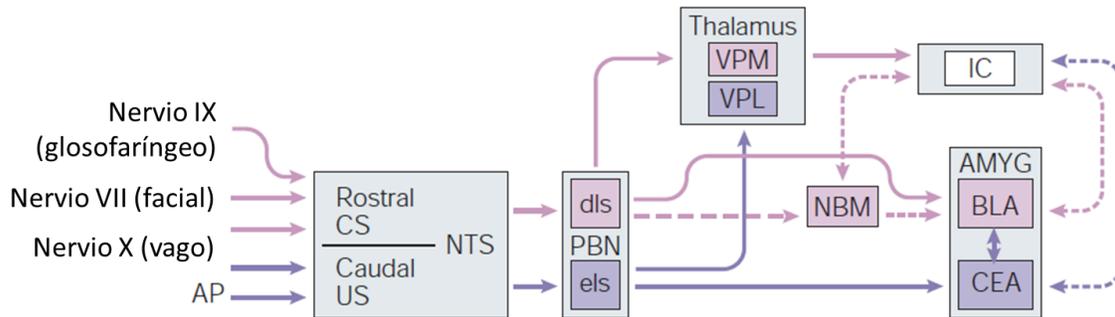


**Figura 3. Comunicación nerviosa en el ORM.** Vías neurales de transmisión de la información en la memoria de reconocimiento. mPFC, corteza media prefrontal; Hipp, hipocampo; Sub, subículo; dmTh, tálamo dorsomedial; EC, corteza entorrinal; PF, corteza perirrinal; IC, corteza insular. (Modificada de: Warburton y Brown *et al.*, 2015; Balderas *et al.*, 2008, 2015).

**Condicionamiento Aversivo al Sabor (CTA, por sus siglas en inglés *conditioned taste aversión*).** Esta memoria le permite al sujeto adaptarse al medio para evitar sustancias tóxicas y sobrevivir. Los animales aprenden a evitar alimentos con efectos negativos post-ingesta (Yamamoto y Ueji, 2011). Cuando un estímulo gustativo (estímulo condicionado) es novedoso para el sujeto, éste es cauteloso y tiene poca ingesta del estímulo condicionado; a este evento se le denomina neofobia. Las sustancias tóxicas (estímulo incondicionado, v.g. cloruro de litio, LiCl) pueden producir malestar gastrointestinal (respuesta incondicionada), asociándose al estímulo condicionado y con ello adquiere un valor hedónico negativo. De esta manera, cuando se vuelve a presentar el sabor, ocurre disminución en su ingesta, entendido como aversión (respuesta condicionada). Esta forma de aprendizaje es el denominado “efecto García” o condicionamiento aversivo al sabor (CTA) (Bermúdez-Rattoni, 2004; Reilly y Bornovalova, 2005, Yamamoto y Ueji, 2011). Las estructuras cerebrales que participan en esta memoria son numerosas (Figura 4) pero dos que han sido ampliamente estudiadas son la amígdala basolateral (BLA) y la corteza insular (IC) (Bermúdez-Rattoni, 2004). Se ha demostrado que la comunicación entre estas dos estructuras



cerebrales juega un papel importante en la consolidación de esta tarea (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000; Rodríguez-Durán *et al.*, 2011).



**Figura 4. Comunicación nerviosa en el CTA.** Vías neurales de transmisión de la información asociada al sabor y a las señales viscerales. CS, estímulo condicionado; US, estímulo no condicionado; NTS, núcleo del tracto solitario; PBN núcleo parabraquial; dls, subnúcleo dorsolateral; els, subnúcleo exterior lateral; VPM, núcleo ventral posteromedial del tálamo; VPL, núcleo ventral posterolateral del tálamo; NBM, núcleo basal magnocelular; AMYG, amígdala; BLA, amígdala basolateral; CEA, amígdala central; IC, corteza insular; las flechas rosas indican las vías de la información gustativa; las flechas moradas indican las vías de la información visceral. (Modificada de Bermúdez-Rattoni, 2004).

A pesar de que ambas tareas conductuales (CTA y ORM) subyacen a dos estímulos de diferente naturaleza (gustativo o visual), ambas dependen de la integridad funcional de la misma estructura cerebral, la IC (Balderas *et al.*, 2008, 2015; Bermúdez-Rattoni, 2004; Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000; Rodríguez-Durán *et al.*, 2011); en conjunto, ambas tareas podrían ser consideradas tareas de reconocimiento (Bermúdez-Rattoni 2014). Estos modelos conductuales han permitido evaluar cómo están afectados el aprendizaje y la memoria en diversos estados fisiológicos o patológicos, así también han permitido el análisis de las vías de señalización asociadas a la consolidación de la memoria.

Durante mucho tiempo, los mecanismos epigenéticos fueron limitados a ser estudiados en la formación de la memoria en varias áreas cerebrales, incluida la IC. Sin embargo, actualmente se ha iniciado un enfoque novedoso que estudia los mecanismos epigenéticos involucrados en la consolidación y evocación de la memoria.



## 1.4 Modificaciones de la cromatina asociadas al aprendizaje y la memoria

Estudios posteriores mostraron que la regulación en la expresión de genes es aún más compleja de lo que se creía, ya que se observó que a este nivel existen diferentes modificaciones sobre la cromatina. A continuación se describen brevemente algunos de los mecanismos para la regulación de la expresión génica.

En el núcleo, el DNA está empaquetado formando cromatina, las unidades repetidas son los nucleosomas que consisten en DNA que envuelve al octámero de proteínas histonas (dos copias de cada una de las siguientes: H2A, H2B, H3 y H4). Hasta el momento se han descubierto diversas modificaciones sobre la cromatina, a través de las cuales la expresión génica puede ser regulada. En conjunto, dichos cambios reciben el nombre de modificaciones epigenéticas que pueden clasificarse en los siguientes grandes grupos 1) metilación de DNA, 2) RNAs no codificantes, 3) modificaciones sobre histonas e incorporación de variantes. En las siguientes secciones se mencionará brevemente lo que se ha observado respecto a estas modificaciones.

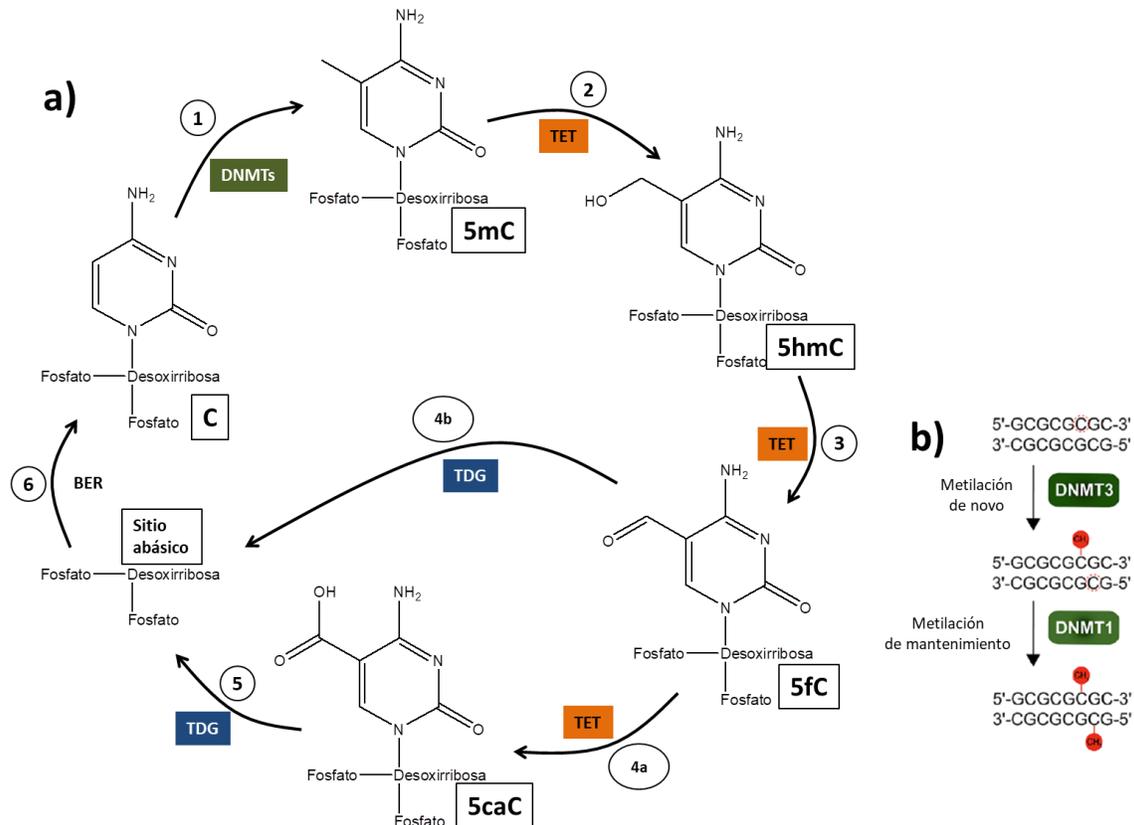
### 1.4.1 Metilación de DNA

La metilación de DNA ocurre en la posición 5 del residuo de citosina y genera 5-metilcitosina (5mC), preferencialmente en zonas denominadas islas CpG, y se trata de zonas del DNA que son ricas en citosina (C) y guanina (G) y que generalmente se encuentran en zonas próximas al promotor del gen. La metilación del DNA puede ser de *novo* (cuando ambas cadenas de DNA carecen de metilación), en este caso la metilación es generada por la metil transferasa de DNA 3A o 3B (DNMT3A/B). Además de esta forma de metilación, existe la metilación de mantenimiento (donde una de las dos cadenas de DNA está metilada), el proceso es inducido por la DNMT1 que reconoce la cadena de DNA que se encuentra metilada e induce la metilación de la cadena de DNA opuesta.

El proceso de desmetilación se compone de etapas secuenciales en que la citosina metilada es procesada a diferentes estados de oxidación (5-



hidroximetilcitosina -5hmC, 5-formil citosina -5fC, 5-carboxicitosina -5caC) que son generados por las enzimas de translocación diez once (*ten eleven translocation*, TET) (Ito *et al.*, 2011; Wu y Zhang 2017). La remoción de estos estados de oxidación es mediada por glicosilasas de timina del DNA (*thymine-DNA-glycosylase*, TDG). La remoción genera un sitio abásico que, gracias a la acción del sistema de reparación por escisión de bases, puede insertar una citosina (Figura 5). La metilación del DNA está asociada a la inactivación génica y ocurre por disminuir la unión a activadores transcripcionales. (Bayraktar *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2011).



**Figura 5. Metilación del DNA.** a) En el proceso de metilación del DNA ocurren los siguientes procesos 1) Metilación de citosina por las metil transferasas de DNA (DNMTs) que produce 5-metil citosina (5mC); 2) A través de las enzimas TET se produce 5-hidroxi metil citosina (5hmC); Las mismas enzimas TET pueden llevar a los siguientes estados de oxidación produciendo 3) 5 formil citosina (5fC) o 4a) 5 carboxi citosina (5CaC); 4b) y 5) A través de la enzima glicosilasa timina del DNA (TDG) se genera un sitio abásico; 6) Por la acción del sistema de reparación por escisión de bases (BER) se logra la reincorporación de citosina. b) La metilación (círculo rojo) puede ser inducida de novo (por DNMT3); o de mantenimiento (por DNMT1) (Modificado de Bayraktar *et al.*, 2017).



El DNA metilado es reconocido por tres familias de proteínas: 1) las proteínas MBD (por sus siglas en inglés *methyl-CpG-binding domain*), 2) las proteínas UHRF (por sus siglas en inglés *ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain*), y 3) las proteínas con dominios de dedos de zinc (Hashimoto *et al.*, 2010). La familia de proteínas MBD incluye a MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4 que reconocen y se unen a DNA metilado, así mismo reclutan diversos complejos represores que incluyen a desacetilasas de histona y metilasas de histona; una función extra para MeCP2 es el mantenimiento de la metilación del DNA al reclutar a DNMT1 hacia el DNA hemimetilado (Moore *et al.*, 2012; Nan *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 1999).

La familia de proteínas UHRF (por sus siglas en inglés *ubiquitin like with PHD and ring finger domains*) incluye a UHRF1 y UHRF2 y se tratan de proteínas con múltiples dominios que se unen a citosinas metiladas y reclutan a DNMT1 a los sitios hemimetilados para mantener la metilación del DNA, este proceso parece ser especialmente importante durante la replicación del DNA (Sharif *et al.*, 2007; Bostick *et al.*, 2007).

La tercera familia de proteínas que se unen a DNA metilado son las proteínas con dominios dedos de zinc e incluye a Kaiso, ZBTB4 (por sus siglas en inglés *zinc finger and BTB domain*) y ZBTB38 que disminuyen la expresión del gen al cual se unen (Prokhortchouk *et al.*, 2001; Fillion *et al.*, 2006).

La metilación del DNA interactúa con otras modificaciones epigenéticas para la regulación génica, por ejemplo, se ha descrito que las DNMT1 y DNMT3a se unen a metiltransferasas de histonas como SUV39H1, así como a desacetilasas de histona como HDAC1 y HDAC2, esta unión favorece la compactación de la cromatina y disminuyen la expresión del gen al cual se asocian (Fuks *et al.*, 2000; Geiman *et al.*, 2004).

Los estados de oxidación secuenciales del grupo metilo en la 5mC del DNA fueron considerados parte de un proceso de desmetilación, sin embargo los niveles relativamente altos de marcas como 5hmC en tejido nervioso, especialmente en corteza cerebral, sugieren que forman parte de un nivel más de



regulación (Globisch *et al.*, 2010; Münzel *et al.*, 2010; Nestor *et al.*, 2012). La marca de 5hmC representa *per se* un mecanismo de regulación epigenética ya que, a diferencia de la marca 5mC, la 5hmC se encuentra distribuida preferencialmente en eucromatina y ha sido asociada a la activación génica (Choiliaras *et al.*, 2012; Ficz *et al.*, 2011). La 5hmC se encuentra localizada preferencialmente en regiones funcionales del genoma como regiones potenciadoras, promotores y el cuerpo del gen lo que sugiere su participación en la regulación de la expresión génica (Nestor *et al.*, 2012; Pastor *et al.*, 2011; Putiri *et al.*, 2014; Stroud *et al.*, 2011). El reconocimiento de esta marca en el DNA se realiza por MeCP2 y UHRF2 alteraciones del reconocimiento se observan en procesos patológicos como el síndrome de Rett (Mellén *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2014).

El estudio de la metilación y su participación en la formación de la memoria se ha realizado a través del uso de inhibidores farmacológicos como 5-aza-2'-desoxicitidina, zebularina y RG108, los cuales disminuyen la metilación del DNA o inhiben directamente la actividad de las DNMTs. La disminución de la metilación no afecta la comunicación basal, sin embargo disminuye la inducción y el mantenimiento de la LTP hipocampal (Levenson *et al.*, 2006), en este mismo sentido, se sugiere que en la formación de la memoria de condicionamiento espacial y en memorias asociadas a la búsqueda de recompensa, es necesaria la actividad de las DNMTs, ya que su inhibición impide la formación de estas memorias (Miller y Sweatt, 2007; Day *et al.*, 2013).

#### **1.4.2 RNAs no codificantes**

Los RNAs no codificantes (entre los cuales se encuentran los microRNAs, miRNAs) son polirribonucleótidos de cadena sencilla que no son traducidos a proteínas, su tamaño varía entre 18 y 25 nucleótidos. Estos RNAs sirven como reguladores de la expresión génica en muchos procesos celulares tales como el desarrollo, la diferenciación, la plasticidad sináptica y la neurodegeneración. Los RNAs no codificantes son producidos como pri-miRNA gracias a la RNA



polimerasa II; después de varias etapas de maduración en que se incluye la acción de Dicer, se genera el miRNA que se une a RISC y, en conjunto, tienen la función de interactuar con mRNAs complementarios al miRNA para la degradación de dichos mRNAs y de esta manera es posible la regulación negativa sobre la expresión de genes. Los miRNAs pueden regular a otras modificaciones en histonas, por ejemplo cultivos celulares que son knockout a Dicer disminuyen la expresión de miRNAs, entre los cuales se encuentra miRNA-290 lo que directamente regula la expresión de DNMT3a y DNMT3b a través del incremento de la metilación tanto del DNA como de las histonas (Benetti *et al.*, 2008; Sinkkonen *et al.*, 2008). Los RNA no codificantes pueden regular la metilación de histonas (descrita brevemente en la siguiente sección) ya que 1) funcionan como factores de reclutamiento en *trans* de metilasas, 2) sirven como scaffold en *cis* para que metilasas y complejos reguladores de la cromatina se unan, y 3) son componentes estructurales de los complejos de metilasas de lisina (Joh *et al.*, 2014).

Estudios en ratones, han reportado que la eficacia en las sinapsis y la traducción de proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica como BDNF aumenta en los ratones knockout para Dicer 1 pero no en los ratones control, lo que demuestra la relevancia de los miRNAs en los procesos de aprendizaje y memoria (Konopka *et al.*, 2010).

Asimismo, estudios han demostrado que algunos miRNAs como miR-181a actúa como un regulador negativo en los procesos que subyacen la plasticidad sináptica y la memoria a través de los receptores glutamatérgicos AMPA (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2020). Es así, como los avances en la metodología de secuenciación como RNA-seq, ofrecen los medios para evaluar cuantitativamente las funciones de los miRNAs en todo el genoma. Esto ha permitido una amplia comprensión de los mecanismos de los miRNAs en el procesamiento cerebral, incluido el aprendizaje, la memoria, la cognición, así como los trastornos neuropsiquiátricos (Wang *et al.*, 2012).



### 1.4.3 Modificaciones a histonas

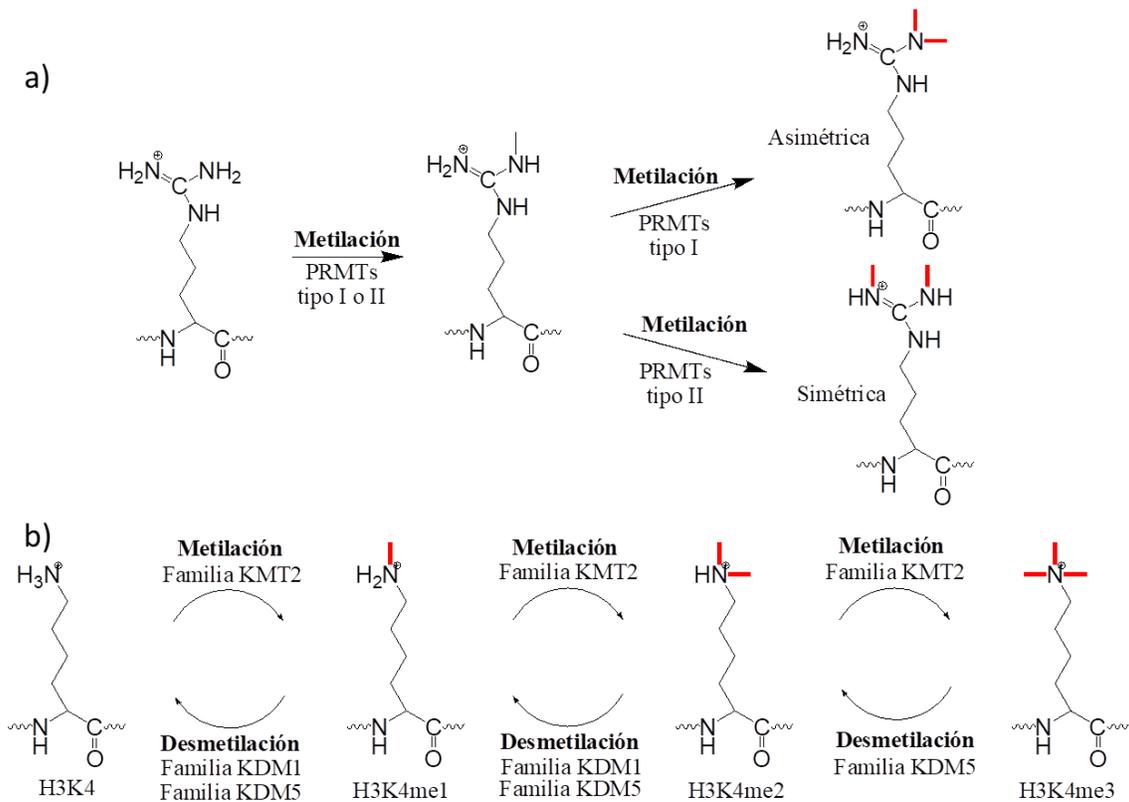
Las modificaciones que sufren las histonas son diversas, se incluyen fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, crotonilaciones, ubiquitinaciones, ADP ribosilaciones, biotinilaciones, propionilaciones, butirilaciones, citrunilaciones, formilaciones, glutatiónilaciones, 2-hidroxi isobutirilaciones, malonilaciones, O-glucosyl N-acetilaciones, hidroxilaciones, sumoilaciones y recientemente se describieron las serotonilaciones y dopaminilaciones (Allis *et al.*, 2007; Farrelly *et al.*, 2019; Fulton *et al.*, 2022; Gräff *et al.*, 2011; Lepack *et al.*, 2020; Zhao y Garcia, 2015; Zhao *et al.*, 2021). En general, las modificaciones a histonas parecen regular la sensibilidad transcripcional a estímulos sensoriales ya que los efectos observados ocurren preferentemente en estados inducidos por el incremento en la actividad celular en comparación con el estado basal (Creighton *et al.*, 2020) En esta sección se describen brevemente la metilación y acetilación de histonas.

#### 1.4.3.1 Metilación de histonas

La metilación de histonas es una marca que puede incrementar o disminuir la expresión de genes; ocurre en la región N-terminal de las histonas, específicamente en residuos de arginina que pueden ser metilaciones simétricas o asimétricas; o en residuos de lisina que pueden ser mono-, di- o trimetilados (Allis *et al.*, 2007; Lorenzo y Bedford, 2011). Las enzimas PRMTs (por sus siglas en inglés *protein arginine methyltransferases*) incluye a las PRMT1-7 clasificadas en tipo I y II, donde la PRMT5 es la única del tipo II (realizan la metilación simétrica), y PRMT7 sólo realiza la monometilación de arginina (Figura 6a). Así, las PRMTs realizan la metilación de arginina, mientras que la desaminación es realizada por las enzimas peptidilarginina deaminasas (PADIs) que convierten al residuo de metil arginina a citrulina (Allis *et al.*, 2007; Bannister y Kouzarides, 2005; Lee *et al.*, 2005). Los procesos celulares asociados a la metilación en residuos de arginina incluyen el procesamiento de RNA, regulación transcripcional, transducción de señales y reparación de DNA (Bedford y Richard, 2005).



La metilación de histonas en residuos de lisina es regulada por la actividad de metiltransferasas de lisina (KMT), y es la familia de KMT2 la que está más estrechamente implicada en la metilación. El proceso de desmetilación está mediado por las desmetilasas de lisina (KDM), en donde las familias KDM1 y KDM5 son las responsables de desmetilar. Los sitios de metilación de H3K4 se han localizado en zonas potenciadoras de la transcripción y cerca de sitios del inicio de la transcripción como es el promotor (Figura 6b) (Collins *et al.*, 2019).



**Figura 6. Metilación de histonas.** a) La metilación de histonas puede ocurrir en residuos de arginina. Las enzimas PRMTs (tipo I y tipo II) generan metilaciones secuenciales para producir metilaciones asimétricas y simétricas sobre los residuos de arginina. b) El proceso de metilación de histonas se genera por la actividad de las metil transferasas de lisina (KMT) que colocan grupos metilo en las lisinas localizadas en la región N-terminal de las histonas. En la histona 3, se ha identificado que la familia KMT2 es la principal responsable de mono-, di-, y trimetilación de la lisina 4. Para el proceso de desmetilación se requiere la participación de desmetilasas de lisina, siendo las desmetilasas de las familias KDM1 y KDM5 las responsables del proceso en la H3K4me (Modificado de Collins *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2005).

Las metilaciones de histona que se han asociado al incremento de la expresión de genes son por ejemplo las metilaciones de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me), trimetilaciones de H4K20me3, la mono y dimetilación de H3K27me1/2,



algunas otras como la trimetilación H3K27me3 se ha asociado a inhibición, mientras que la monometilación y trimetilación en H3K9me1/3 se asocian a heterocromatina; así mismo existen marcas como la monometilación de H4K20meq que se ha observado localizada en genes activos e inactivos (Collins *et al.*, 2019; Ferrari *et al.*, 2014; Loyola *et al.*, 2009; Scharf y Imhof, 2010).

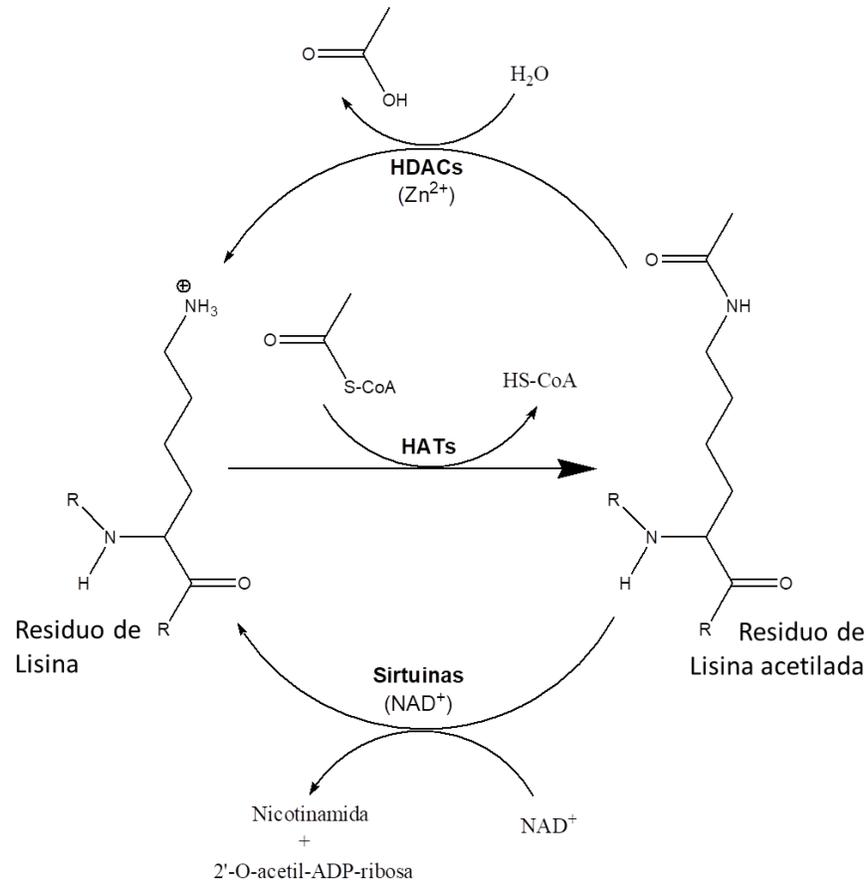
En los procesos de aprendizaje y memoria se ha mostrado que a nivel hipocampal, existe incremento de las marcas H3K4me3 y H3K9me2 en *Zif268* y *Bdnf* (genes relacionados a la consolidación de la memoria), posterior al aprendizaje de miedo condicionado; además que ratones knockout para la enzima Mll (por sus siglas en inglés *myeloid lymphoblastic leukemia*, también conocida como KMT2A) no pueden formar la memoria de miedo condicionado (Gupta *et al.*, 2010). De manera semejante, la delección de G9a/GLP (una KMT) ocasiona déficits cognitivos severos al evaluar la memoria en modelos conductuales dependientes de hipocampo (Schaefer *et al.*, 2009).

#### 1.4.3.2 Acetilación de histonas

Una de las modificaciones que ha llamado la atención es la acetilación de histonas, relacionada a la activación génica. Este proceso está catalizado por las acetiltransferasas de histona (HATs) que utilizan acetil-CoA como donador de grupos acetilo, lo que ocasiona la generación de cargas negativas en las histonas y con ello la repulsión con el DNA. Esta repulsión está asociada a la apertura de la cromatina y por ende favorece la unión de los factores de transcripción, promoviendo la transcripción. El proceso está regulado negativamente por la actividad de desacetilasas que se pueden clasificar de acuerdo al mecanismo de desacetilación en Zn<sup>2+</sup>- dependientes (desacetilasas de histona, HDACs) y en NAD<sup>+</sup>-dependientes (Sirtuinas). Estas pueden clasificarse en cuatro grandes grupos dependiendo de la similitud en su secuencia génica: clase I (HDACs 1, 2, 3, y 8), clase II (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 y 10), clase III (Sirtuinas 1-7), y clase IV (HDAC11). Al inducir la desacetilación, se favorece el proceso de interacción con



el DNA y por ende la compactación de la cromatina (Figura 7) (Choi y Howe, 2009; Marmorstein y Zhou, 2014; Seto y Yoshida, 2014).



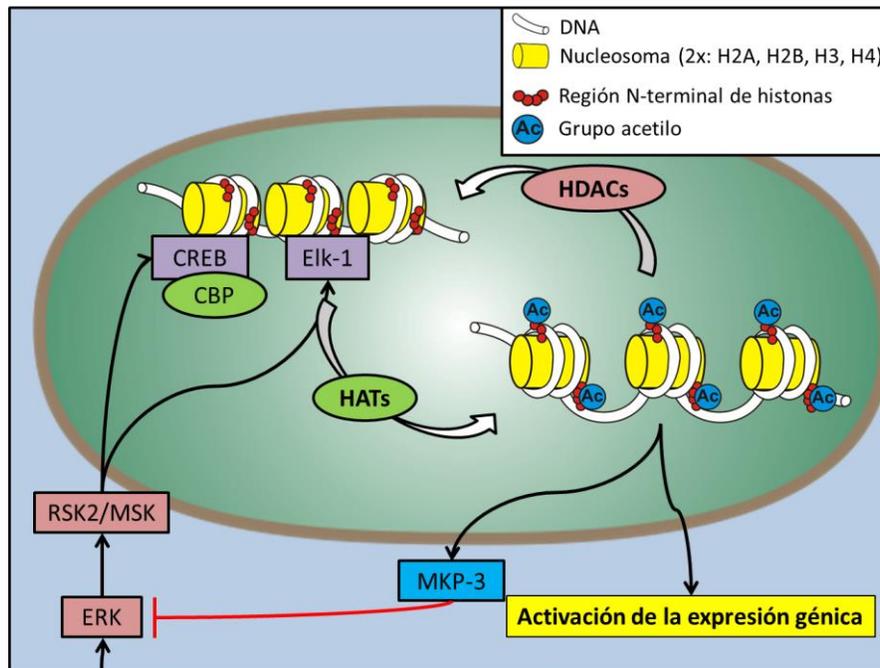
**Figura 7. Acetilación de histonas.** El proceso de acetilación de histonas se genera por la actividad de las acetil transferasas de histona (HATs) que, a partir de Acetil-CoA, colocan un grupo acetilo en el nitrógeno de la cadena lateral de la lisina, por lo que se ha sugerido que este mecanismo es el responsable de eliminar la carga positiva del nitrógeno y por ende disminuir la interacción con el DNA que tiene carga negativa. El proceso es regulado negativamente a través de la desacetilación, mediada por las desacetilasas de histona (HDACs,  $\text{Zn}^{2+}$  dependientes) o por Sirtuinas ( $\text{NAD}^+$  dependientes) (Modificado de Gil *et al.*, 2017).

Algunas marcas de acetilación de histonas que han sido asociadas al proceso de aprendizaje y memoria en roedores son H3K9ac (acetilación de la lisina 9 de la histona 3), H3K14ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, la disminución de esta última ha sido asociada a la alteración cognitiva observada en animales envejecidos y se ha sugerido como un biomarcador de la alteración en la interacción del genoma y el ambiente en el cerebro envejecido (Guan *et al.*, 2009; MacQuown *et al.*, 2011; Peleg *et al.*, 2010; Uchida *et al.*, 2017).



De acuerdo a reportes preliminares, la actividad de las desacetilasas de histona depende de la fortaleza o de la intensidad del estímulo sensorial, de tal manera que su actividad parece reducirse y favorecer el incremento en la acetilación de histonas y con ello, la expresión génica (Peleg *et al.*, 2010; Uchida *et al.*, 2017). En este mismo sentido, recientemente se ha mostrado que las HDACs de clase I parecen ser más relevantes en los procesos de formación de la memoria, ya que en diversos modelos conductuales se ha mostrado que la inhibición de éstas tiene efectos positivos en la consolidación de la memoria como consecuencia al incremento en la expresión génica (Guan *et al.*, 2009; MacQuown *et al.*, 2011; Bahari-Javan *et al.*, 2011).

A nivel celular el proceso depende directamente de la activación de vías de señalización (Figura 4). Uno de los principales puentes de comunicación entre la información recibida en la sinapsis y la respuesta nuclear es por la activación de la cinasa ERK que a su vez activa a las cinasa RSK2/MSK que a nivel nuclear inducirá la activación de factores de transcripción como el elemento de unión de respuesta a AMPc (CREB) y Elk1. La activación de estos factores de transcripción recluta a HATs (como CBP y p300) que acetilan histonas y relajan la cromatina. Una enzima importante en la regulación del proceso es la fosfatasa de MAPK 3 (MKP-3) que desfosforila a ERK, de tal manera que ERK se desactiva y de esta manera se regula rápidamente la activación génica. Otro factor importante en la regulación es la actividad que tienen las HDACs en la desacetilación de las regiones amino-terminales de las histonas, lo que favorece la compactación de la cromatina (Figura 8). De esta manera, la regulación fina del proceso acetilación-desacetilación de histonas es importante en el aprendizaje y la memoria, hecho que es necesario para la expresión génica asociada a la consolidación de la memoria (Beldjoud *et al.*, 2015; Day y Sweat, 2011; Levenson *et al.*, 2004; Swank y Sweatt, 2001).



**Figura 8. Equilibrio de acetilación-desacetilación de histonas.** Las modificaciones a nivel nuclear llegan a través de la activación de ERK, que a su vez activa a RSK2 o a MSK, éstos a su vez activan a los factores de transcripción CREB o Elk-1, los cuales reclutan a HATs como CBP o p300 que añaden grupos acetilo a las regiones amino-terminales de las histonas, este evento tiene como consecuencia la descompactación de la cromatina y el favorecimiento de la expresión génica. La regulación de esta vía de señalización es mediada por MKP-3, fosfatasa cuyo blanco es ERK que al desfosforilarlo disminuye esta señal. El proceso de desacetilación es realizado por el reclutamiento y activación de las HDACs que ocasionan compactación de la cromatina y con ello silenciamiento génico (Modificado de Day y Sweat, 2011).

### 1.5 Inhibidores de las desacetilasas de histona y mejora cognitiva

Durante el proceso de aprendizaje se ha mostrado que la panacetilación de histonas H3 y H4 incrementa en el hipocampo como consecuencia del entrenamiento de una tarea espacial (Dagnas y Mons, 2013). Por otro lado, a pesar de que se ha reportado que posterior al entrenamiento de una memoria espacial los niveles de acetilación como H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac, H4K8ac y H4K12ac incrementan, la disminución de la marca de H4K12ac ha sido asociada al deterioro cognitivo (Peleg *et al.*, 2010). Es así como diferentes estudios han demostrado el efecto positivo de los inhibidores inespecíficos de las HDACs sobre la plasticidad neuronal y en memorias asociadas con el hipocampo (Hawk *et al.*, 2011; Núñez-Jaramillo *et al.*, 2014; Peleg *et al.*, 2010; Reolon *et al.*, 2011). Sin



embargo, aún se sigue estudiando qué genes son regulados por las marcas de acetilación. Concretamente, el inhibidor específico de las HDACs de clase I, MS-275, impide el proceso de extinción de la memoria de miedo (Bahari-Javan *et al.*, 2012), mientras que mejora la memoria de localización (Hawk *et al.*, 2011) cuando es inyectado en el hipocampo, lo cual indica que la inhibición de las HDACs de clase I mediante el uso de MS-275 tiene un efecto positivo sobre la formación y el mantenimiento de memorias asociadas a hipocampo.

Se ha observado que los inhibidores de las HDACs, entre ellos el MS-275, pueden modificar la transcripción del mRNA de *Bdnf* (por sus siglas en inglés *brain derived neurotrophic factor*) a la alza, lo que podría estar relacionado a la mejora de los procesos cognitivos y de comunicación neuronal (Intlekofer *et al.*, 2013; Koppel y Timmusk, 2013).

## 1.6 Factor neurotrófico derivado del cerebro

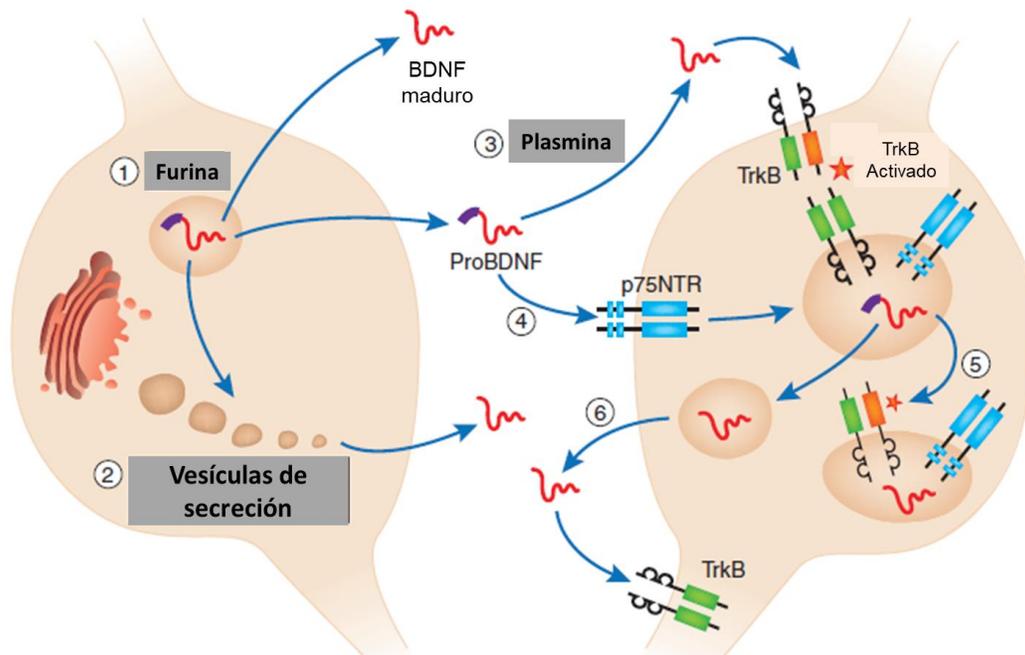
Los factores de crecimiento son proteínas que regulan varios aspectos de la función celular como la supervivencia, proliferación, migración y diferenciación. En el sistema nervioso, los factores de crecimiento se refieren a factores neurotróficos, los cuales son el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés *nerve growth factor*), neurotrofina 3 (NT3), neurotrofina 4/5 (NT4/5), y el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés *brain derived neurotrophic factor*). El gen de *Bdnf* se encuentra expresado en el cerebro desde estadios embrionarios, así también en estados postnatales y en la edad adulta se distribuye en diferentes regiones cerebrales, especialmente en regiones importantes para la memoria: hipocampo y cortezas, donde una de las regiones corticales que muestra mayor expresión de BDNF corresponde a la corteza insular (Aid *et al.*, 2007; Conner *et al.*, 1997; Friedman, 2012).

La importancia del BDNF en el sistema nervioso se debe a su participación en la modulación del crecimiento y ramificación axonal y dendrítico, mantenimiento de la sinapsis, en la neurotransmisión y en la plasticidad sináptica, eventos que



median la función y viabilidad neuronal (en Andero *et al.*, 2014; Gorski *et al.*, 2003).

El BDNF es una proteína no glicosilada que inicialmente se sintetiza como un prepro péptido de 247 aminoácidos (preproBDNF). Una vez que inicia la traducción, la secuencia señal (de 18 aminoácidos, también llamada presecuencia) se corta de manera co-traducciona para sintetizar proBDNF (de 229 aminoácidos, contiene la denominada prosecuencia de 110 aminoácidos) en el retículo endoplásmico. El proBDNF se corta para generar la secuencia madura, BDNF (de 119 aminoácidos y 15 kDa) (Figura 9) (Andero *et al.*, 2014; Lessman y Brigadski, 2009; Maisonpierre *et al.*, 1991; Pang *et al.*, 2004). En el sistema nervioso central, las células que son capaces de sintetizar y liberar BDNF son la microglía y las neuronas. En las neuronas a nivel de somas se ha observado al mRNA; el marcaje con anticuerpos muestra una marca difusa de proteína en los somas, pero una buena señal de la proteína en las dendritas y en los axones, lo que se asocia a una participación en el fortalecimiento de la sinapsis (Conner *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2007). Algunos estudios sugieren que las neuronas almacenan y secretan preferencialmente BDNF y no proBDNF (aproximadamente el 90% de BDNF en el sistema nervioso central está en su forma madura). Sin embargo, existe evidencia que sugiere que proBDNF pudiera tener participación en la modulación sináptica (Pang *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2008).



**Figura 9. Producción y procesamiento del BDNF en el sistema nervioso central.** El proBDNF madura a BDNF a través de diferentes mecanismos celulares: 1) El proBDNF se corta por la enzima furina en el retículo endoplásmico; 2) El proBDNF se corta por la enzima proconvertasa en las vesículas de secreción; 3) Si el proBDNF se libera al espacio extracelular, es madurado a BDNF por la plasmina. 4) El proBDNF puede unirse al receptor p75NTR, mientras que el BDNF activa a su receptor de alta afinidad: TrkB. 5) Una vez unidos a sus receptores, son endocitados, y el proBDNF se madura a BDNF, por lo que BDNF activa al receptor TrkB vesiculado. 6) El BDNF puede reciclarse hacia el exterior celular (Modificado de Barker, 2009).

Otro tipo celular, en el sistema nervioso, que sintetiza y libera BDNF es la microglía, principalmente ante un proceso de activación microglial (Nakajima *et al.*, 2001) sin embargo, algunos estudios muestran que el BDNF liberado por la microglía modula la sinapsis y favorece la estabilidad de espinas dendríticas a través de la regulación de la expresión de receptores glutamatérgicos (Parkhurst *et al.*, 2013) Por otro lado, se ha observado que los astrocitos no sintetizan a BDNF, sin embargo pueden internalizarlo a través de receptores TrkB truncos, los cuales no activan las vías de señalización, pero sí pueden unir a BDNF; dicho BDNF se almacena temporalmente y se libera por los astrocitos; de esta manera se sugiere que los astrocitos pueden regular los efectos neuronales del BDNF (Alderson *et al.*, 2000; Eide *et al.*, 1996; Fernández-García *et al.*, 2020; Fryer *et al.*, 1997; Rubio, 1997).



El receptor de alta afinidad para el BDNF es el receptor TrkB, mientras que el receptor de baja afinidad es p75 (Andero *et al.*, 2014). En animales jóvenes, el bloqueo de la interacción BDNF-TrkB induce la activación de la microglía, mientras que la suplementación de BDNF en animales viejos, inhibe la activación glial (Wu *et al.*, 2020). La unión de proBDNF a p75 es necesaria para la formación de la depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés *long-term depression*), mientras que la activación de TrkB por el BDNF está asociado a LTP (Pang *et al.*, 2004).

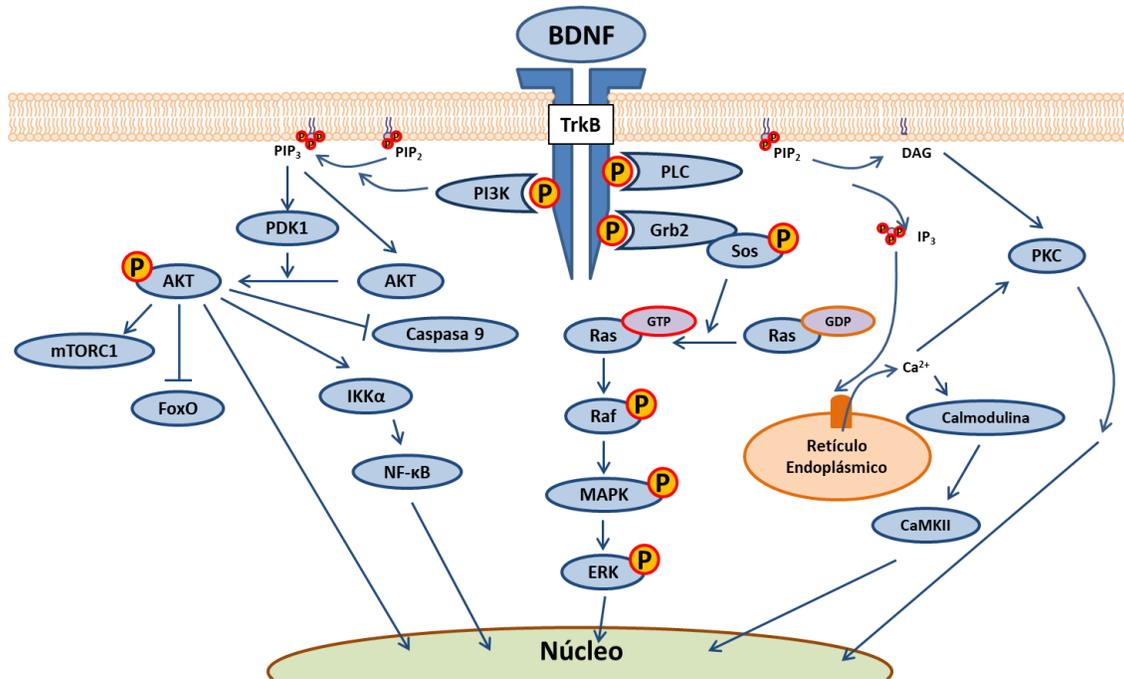
Las vías de señalización activadas por BDNF a través de su receptor de alta afinidad TrkB, son principalmente tres: 1) la vía de Ras-Raf, 2) la vía de fosfatidil inositol-3-cinasa – AKT (PI3K-AKT), y 3) la vía de fosfolipasa C –proteína cinasa C (PLC-PKC) (Berridge, 2014; Dinsmore y Soriano, 2018; Minichiello, 2009; Scott-Solomon y Kuruvilla, 2018). A continuación se describen brevemente éstas vías de señalización.

Cuando BDNF se une a su receptor de tipo 1TM con actividad tirosina cinasa (TrkB), ocurre la dimerización del TrkB, esta dimerización induce la transfosforilación del receptor, en donde una cadena induce la fosforilación de la otra; esta fosforilación (en tirosina 716 fosforilada) sirve de señal para el reclutamiento de la proteína Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) con un sitio SH2 que reconoce y se une a tirosinas fosforiladas del receptor TrkB. Una vez unido Grb2 a TrkB fosforilado, se induce la activación de la proteína Sos (*son of sevenless*) por su fosforilación en residuos de serina/treonina y esto genera cambios conformacionales en la proteína Ras (*rat sarcoma virus*) para el intercambio de nucleótidos de GDP por GTP que a su vez fosforila a Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) que fosforila y activa a la proteína MAPK (*mitogen-activated protein kinase*, también conocida como MEK: *MAPK/ERK kinase*). La activación de MAPK activa por fosforilación a ERK (*extracelular signal-regulated kinases*), el cual puede activar a diferentes factores de transcripción para la inducción de la expresión génica, las consecuencias más estudiadas de la activación de esta vía de señalización es el crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia celular (Figura 10).



La segunda vía de señalización canónica del receptor TrkB es la activación de la vía PI3K-AKT. El proceso inicia por la unión de BDNF, dimerización, activación de los receptores y unión de la subunidad p85 de la enzima fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3K) que contiene dominios SH2 (reconoce a tirosina 740 fosforilada); esta unión ocasiona cambios conformacionales sobre la PI3K, de tal manera que la subunidad catalítica de esta enzima (p110) induce la fosforilación de fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>) para transformarlo a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), la generación de PIP<sub>3</sub> ocasiona el reclutamiento hacia la parte intracelular de la membrana celular, de la cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1, *phosphoinositide-dependent kinase-1*) y de la proteína cinasa B (PKB, también llamada AKT, cuyas siglas provienen de la cepa de ratón AKR que genera timomas); la proximidad de PDK1 y AKT debido a la unión a PIP<sub>3</sub>, ocasiona la fosforilación y activación de AKT por PDK1. La AKT activa puede modular vías asociadas al proceso inflamatorio, a la supervivencia, al ciclo e incluso al metabolismo celular (Figura 10).

La tercera vía canónica del receptor TrkB inicia con la unión de BDNF, dimerización, activación de los receptores y unión de fosfolipasa C (PLC, que se une a la tirosina 1021 fosforilada), como consecuencia del cambio conformacional de la PLC, el PIP<sub>2</sub> es degradado a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). Por un lado el IP<sub>3</sub> se une a su receptor en el retículo endoplásmico para incrementar la concentración de Ca<sup>2+</sup>, por lo que este ion y el DAG activan a la PKC. Por otro lado, el Ca<sup>2+</sup> se une también a calmodulina para modular a diversas enzimas dependientes de este complejo, por ejemplo a la cinasa II dependiente de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina (CaMKII). Este incremento en la actividad de cinasas tiene como consecuencia favorecer la activación de factores de transcripción y estos eventos están asociados a la plasticidad neuronal y al crecimiento celular (Figura 10).



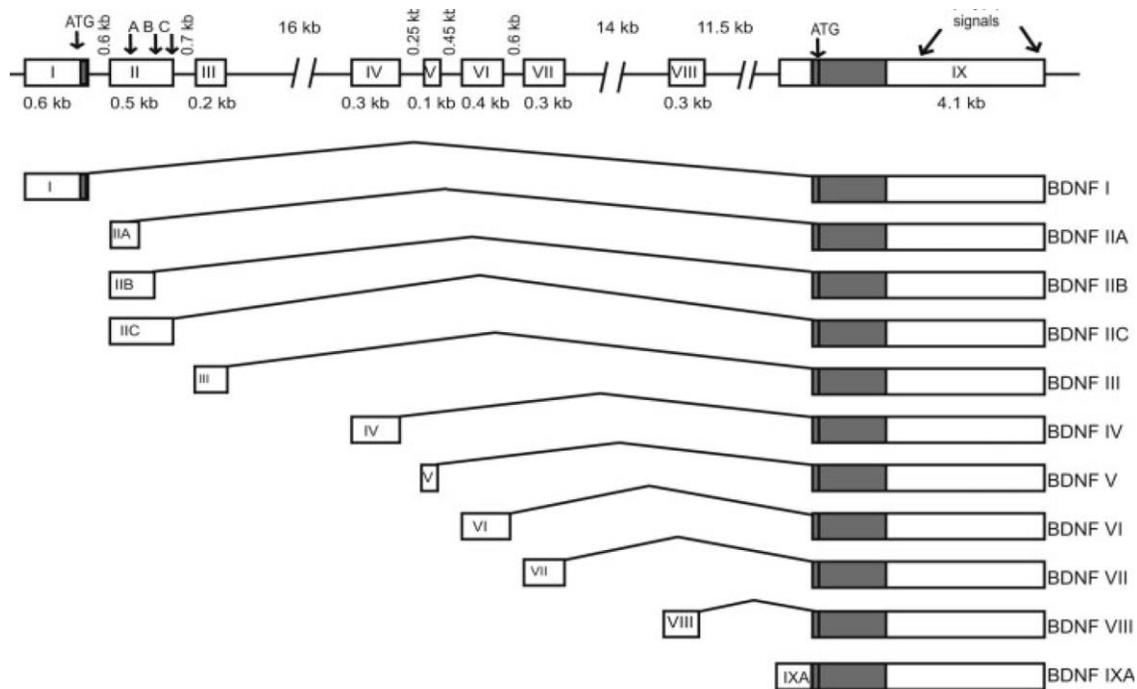
**Figura 10. Vías de señalización canónicas activadas por BDNF a través del receptor TrkB.** Las vías de señalización canónicas activadas por el BDNF a través de su receptor de alta afinidad son 1) La vía de Ras-Raf, 2) La vía de fosfatidil inositol-3-cinasa – AKT (PI3K-AKT), y 3) La vía de fosfolipasa C –proteín cinasa C (PLC-PKC) (Modificada de Berridge, 2014; Dinsmore CJ y Soriano 2018; Minichiello 2009; Scott-Solomon y Kuruvilla 2018).

La estructura del gen de BDNF es compleja, debido a que hasta el momento se han reportado 11 variantes de mRNA que difieren en los sitios de inicio de la transcripción y por consiguiente en el tamaño del transcrito (Figura 11).

Reportes previos han mostrado una relación directa entre la actividad de las HDACs y el promotor de *Bdnf*, ya que algunas HDACs han sido identificadas directamente asociadas al promotor, así también se ha mostrado que las histonas cercanas al promotor pueden ser acetiladas, proceso que recluta a la proteína 4 con bromodominio (BRD4), lo cual favorece la transcripción de *Bdnf*, además que algunos inhibidores de las HDACs han mostrado inducción de la transcripción de *Bdnf* (Intlekofer *et al.*, 2013; Koppel y Timmusk, 2013; Martinowich *et al.*, 2003; Lubin *et al.*, 2008; Sartor *et al.*, 2019). De manera semejante, la metilación cumple un papel importante en la regulación de *Bdnf*, ya que la proteína MeCP2 puede unirse a *Bdnf* y disminuir su expresión en neuronas en estado basal (Chen *et al.*, 2003); por otro lado, el incremento en la actividad neuronal ocasiona la



fosforilación de MeCP2, lo que previene su unión al gen de *Bdnf*, así también disminuye la metilación del gen (Martinowich *et al.*, 2003).



**Figura 11. Organización del gen de BDNF.** Se muestra en la parte superior la organización del gen de BDNF, indicando los sitios en kilobases (kb). Los sitios de inicio de la transcripción para las variantes del mensajero IIA, IIB, y IIC se indican como A B o C. Los sitios de inicio de la traducción se indican como ATG (el codón AUG, para metionina). Los exones están indicados como cajas y los intrones como líneas. Las regiones codificantes están indicadas como recuadros grises, mientras que las regiones no codificantes como recuadros blancos. Los transcritos están indicados en la parte inferior en relación al gen (Modificado de Aid *et al.*, 2007).

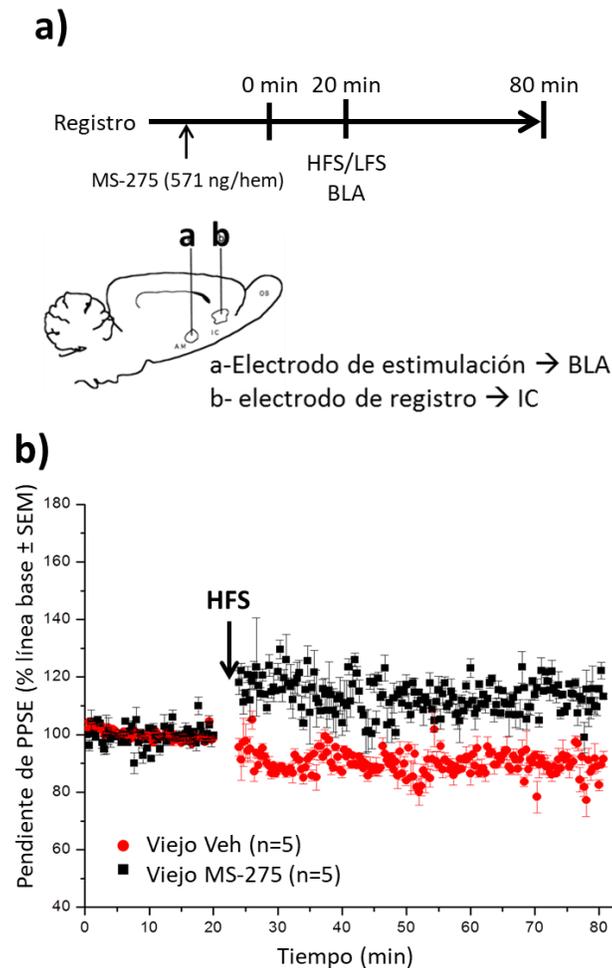
Está demostrado que el BDNF incrementa su expresión posterior a la adquisición de información, así también se ha mostrado la importancia de este factor durante el proceso de extinción en diversas estructuras cerebrales, además que es importante para la estabilización de la memoria (Castillo *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2011; Mizuno *et al.*, 2000; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2014; Xi *et al.*, 2014). En general, la participación del BDNF en el aprendizaje y la memoria ha sido demostrada en diversos trabajos, los cuales concluyen que el desequilibrio de este factor ocasiona alteraciones en el aprendizaje y la memoria; por lo anterior se considera que BDNF tiene un comportamiento de “U” invertida. Es decir que el bloqueo o los bajos niveles de BDNF impiden la consolidación de la memoria. Mientras que un incremento paulatino en los niveles de BDNF, permite la



consolidación de la memoria. Sin embargo, un exceso de BDNF tiene efectos negativos e impide la consolidación de la memoria (Bekinschtein *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2009; Papaleo *et al.*, 2011). Probablemente, el efecto de “U” invertida se debe a que BDNF activa al receptor de baja afinidad p75, así como vías de señalización no canónicas, cuyo efecto sea una alteración en los procesos de plasticidad neuronal involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria.

## 1.7 Modificaciones en la plasticidad neuronal por la inhibición de las HDACs

En la investigación que realizamos durante mis estudios de maestría (datos no publicados), analizamos el efecto de la inhibición de las HDACs de clase I sobre la memoria mediante el uso del inhibidor MS-275 inyectado en la corteza insular en animales envejecidos. El análisis electrofisiológico (en colaboración con el grupo de trabajo de la Dra. Martha Escobar) de la vía amígdala basolateral-corteza insular (BLA-IC) mostró que los animales envejecidos carecen de LTP cuando reciben una estimulación de alta frecuencia (HFS, por sus siglas en inglés, *high frequency stimulation*) en la BLA (por sus siglas en inglés, *basolateral amygdala*) y se registran las respuestas en la IC; incluso muestran una depresión lo que es evidencia de una deficiencia en la comunicación neuronal en los animales envejecidos (Figura 12b). La inhibición de las HDACs de clase I mediante la inyección de MS-275 en la corteza insular revirtió esta depresión de la vía BLA-IC de animales envejecidos y fue posible inducir LTP (Figura 12b). Los resultados electrofisiológicos sugieren que en el animal envejecido existe inhibición de genes asociados a la formación y mantenimiento de LTP, por lo que al ser favorecidas mediante la inhibición de las HDACs de clase I, existe mejora en la plasticidad sináptica.

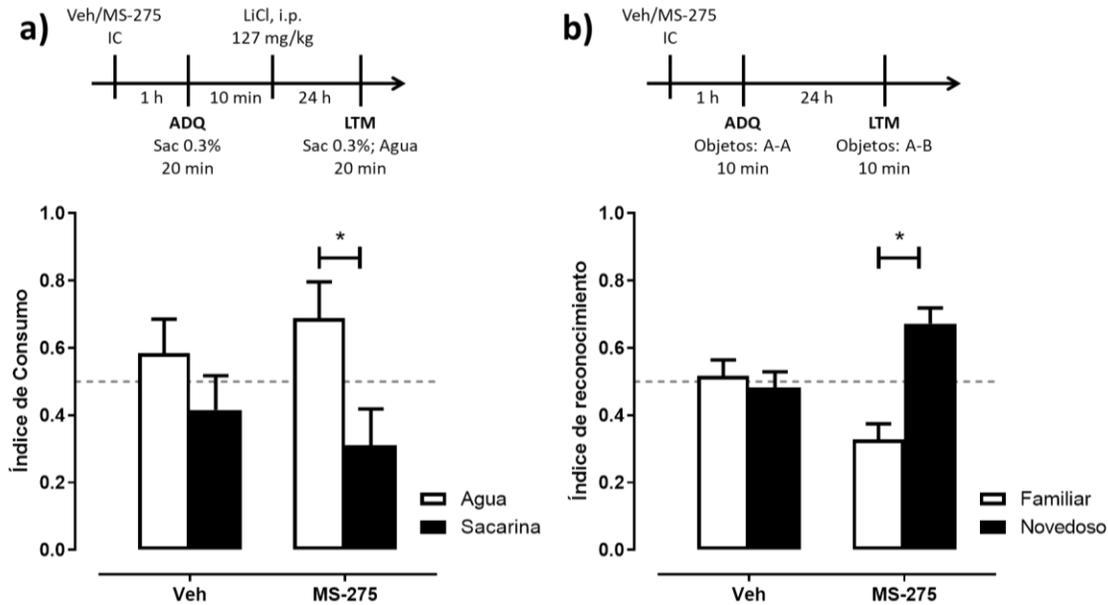


**Figura 12. Efecto de la inhibición de las HDACs de clase I sobre la inducción de LTP en animales viejos anestesiados. a)** Diseño experimental y sitios de localización de los electrodos (estimulación en BLA; registro en IC); a través del electrodo de registro se infundió el MS-275 1.5 h antes de la estimulación de alta frecuencia (HFS). **b)** Los animales envejecidos muestran plasticidad tipo LTD a pesar de recibir HFS, mientras que la inhibición de las HDACs de clase I con el MS-275, permite la inducción de LTP (Datos no publicados).

A nivel conductual, la inhibición de las HDACs de clase I y los efectos sobre la memoria fueron evaluados en dos modelos conductuales descritos previamente: CTA y ORM. Se observó que la inhibición de las HDACs de clase I en la corteza insular, permite la formación de memoria en animales viejos que normalmente no pueden formar memorias. En el modelo de CTA la mejora cognitiva se evidenció en la capacidad de los animales de discriminar a la sacarina del agua y consumir poca sacarina (asociada previamente al malestar gastrointestinal) (Figura 13a). De manera similar, en el modelo de ORM, los animales envejecidos fueron capaces



de reconocer al objeto novedoso y explorarlo más tiempo en comparación con el objeto familiar (Figura 13b).

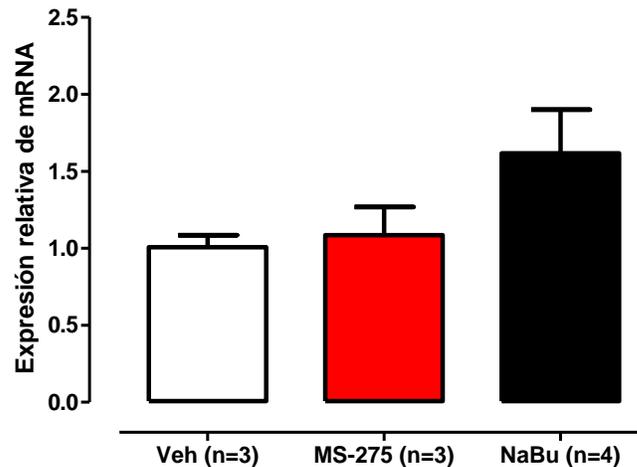


**Figura 13. La inhibición de las HDACs de clase I mejora la formación de memoria en el CTA y el ORM en animales viejos. a)** Índice de consumo durante la memoria de largo plazo (LTM). Se observa que los animales viejos son incapaces de formar CTA, mientras que la inhibición de las HDACs de clase I mejora la consolidación de animales viejos. **b)** Índice de reconocimiento durante la LTM. Se observa que los animales viejos son incapaces de formar ORM, mientras que la inhibición de las HDACs de clase I permite que los animales viejos formen adecuadamente la ORM. \* $p < 0.05$  *t* de Student.

En los estudios de maestría se decidió realizar RT-qPCR para conocer si existe alguna modificación en los niveles de mRNA de *Bdnf*. La determinación se realizó a las 4 horas post-adquisición del CTA, ya que está reportado que a este tiempo ya existen incrementos en los niveles en la corteza insular en esta tarea en particular (Ma *et al.*, 2011). A pesar de esto, no se observaron diferencias en los niveles del mRNA de *Bdnf* en este tiempo en particular (Figura 14), esto puede deberse a que el MS-275 es un inhibidor mucho más selectivo que el butirato de sodio (NaBu), además que la región seleccionada para el análisis corresponde a la región codificante. Considerando el gran número de variantes de mRNA de *Bdnf*, es posible que la alta selectividad del inhibidor y la región seleccionada no fueran suficientes para evidenciar un cambio en la transcripción del *Bdnf*.



### Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Bdnf*)



**Figura 14.** La inhibición de las HDACs de clase I no modifica la expresión del mRNA *Bdnf* a las 4 h post-adquisición del CTA. Se muestran los niveles de expresión relativa del mRNA de *Bdnf*. No se muestran diferencias entre los grupos experimentales (experimentos realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Ernesto Soto Reyes Solís).

Las evidencias existentes en la literatura sugieren a BDNF como un buen candidato para explicar el comportamiento conductual, ya que si bien el exceso de BDNF tiene efectos contraproducentes sobre la cognición (Cunha *et al.*, 2009) por otra parte esta misma sobre activación podría tener efectos positivos en el animal viejo, como se ha demostrado al inyectar BDNF para favorecer la retención del CTA (Castillo *et al.*, 2006).

A pesar de lo anterior, el estudio del envejecimiento tiene una limitante importante que es el contar con un número adecuado de animales para el estudio, aunado a que en esta etapa fisiológica son diversas las alteraciones presentes. Por lo que un análisis fino a nivel celular es poco fiable para asociarlo directamente a un evento en particular. Estudios previos han mostrado que la intensidad del entrenamiento durante la tarea de condicionamiento al miedo afecta de manera diferencial los procesos moleculares asociados a la formación de la memoria (Uchida *et al.*, 2017). Por lo tanto, propusimos modificar las condiciones de aprendizaje en animales jóvenes para contar dos entrenamientos denominados “débil” y “fuerte”. Esto se realizó con el objetivo de tener un modelo conductual que fuera similar a los animales viejos en cuanto a la formación de la memoria (entrenamiento débil), donde la única variable fue la intensidad o tiempo de



entrenamiento en la tarea de condicionamiento aversivo al sabor. Estos modelos fueron usados para analizar las modificaciones a nivel celular que ocurren para la consolidación de la memoria de reconocimiento ante la inhibición de las HDACs de clase I.

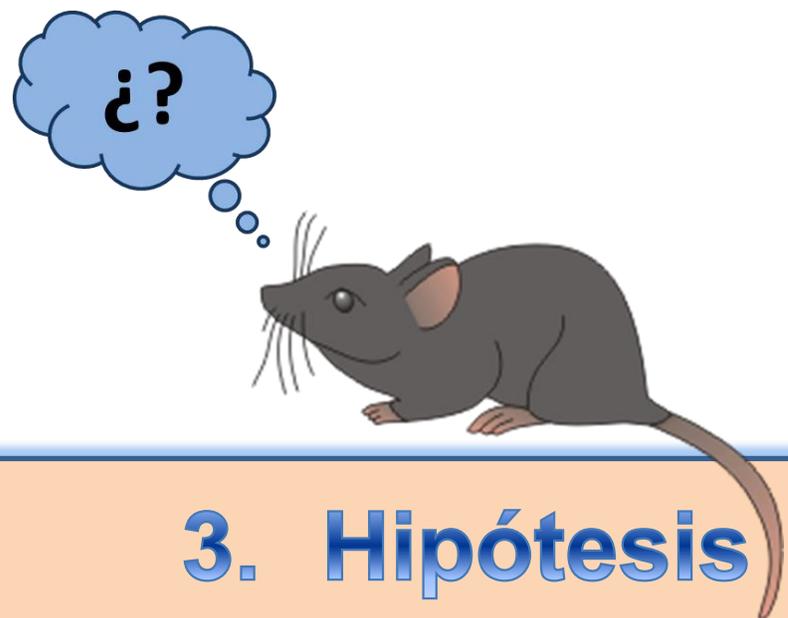


## 2. Justificación



La memoria es el medio de adaptación de los seres vivos a las modificaciones del ambiente y se establece a través de la consolidación, proceso en el cual ocurre síntesis de proteínas para fortalecer la comunicación neuronal y mantener la memoria de largo plazo. La regulación de la expresión génica es importante para lograr una adecuada consolidación, una manera de controlar el proceso es a través de las modificaciones epigenéticas entre las que se encuentra la acetilación de histonas. En este aspecto se ha sugerido que las desacetilasas de histona (HDACs) tienen un papel negativo en la regulación de la expresión génica y que su inhibición puede favorecer la formación así como el mantenimiento de memorias dependientes de hipocampo o corteza. Por lo anterior se ha sugerido que el empleo de inhibidores de las HDACs podría potenciar la formación de memorias. Entre el amplio número de genes asociados al proceso de consolidación de la memoria se encuentra el BDNF, el cual incrementa su expresión posterior al aprendizaje. Se ha mostrado que el promotor de BDNF puede ser regulado por las HDACs. Además el bloqueo en la actividad de BDNF puede ocasionar alteraciones en la plasticidad sináptica, así como el bloqueo en la consolidación de la memoria.

Recientemente se ha demostrado que la intensidad del entrenamiento determina la fortaleza de la memoria y está asociada directamente a la modulación diferencial sobre la cromatina y es probable que la consolidación de la memoria pueda favorecerse por la expresión de factores tróficos como el BDNF que es modulado por la actividad de las HDACs. En este aspecto la regulación asociada a la intensidad de los estímulos para establecer la memoria de largo plazo y su relación temporal con genes de expresión temprana, ha sido poco explorada. Es por ello que el objetivo del trabajo fue analizar el efecto de la inhibición de las HDACs de clase I en la IC sobre la abundancia de acetilación (a través de la cuantificación de H4K12ac), la abundancia de BDNF y su asociación con la intensidad del entrenamiento y la formación de la memoria de reconocimiento de objetos y gustativa.



**3. Hipótesis**

**4. Objetivos**



### **3. HIPÓTESIS**

La inhibición de las desacetilasas de histona de clase I en la corteza insular incrementa la abundancia de BDNF y a través de la activación del receptor TrkB se establece la memoria de reconocimiento de largo plazo.

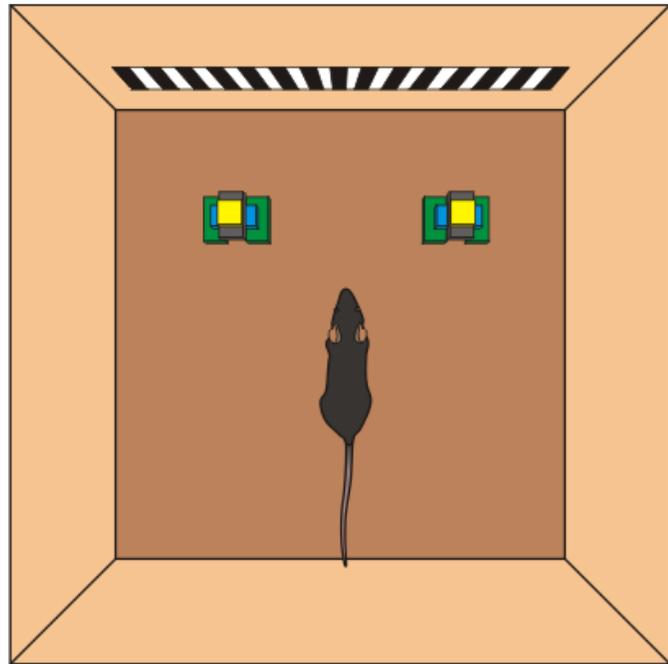
### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Determinar las modificaciones en la memoria de reconocimiento y en la abundancia de BDNF por la inhibición de desacetilasas de histona de clase I ante entrenamientos de diferente intensidad.

#### **4.2 Objetivos particulares**

- Evaluar el curso temporal de la abundancia de BDNF posterior al entrenamiento débil y fuerte de la memoria de reconocimiento.
- Evaluar el efecto de la inhibición de desacetilasas de histona de clase I sobre la memoria de reconocimiento.
- Determinar el curso temporal de los niveles de acetilación a través de la abundancia de H4K12ac inducida por la inhibición de desacetilasas de histona de clase I posterior al entrenamiento de memoria de reconocimiento.
- Determinar la el curso temporal de la abundancia de BDNF inducida por la inhibición de desacetilasas de histona de clase I posterior al entrenamiento de la memoria de reconocimiento.
- Evaluar el efecto del antagonismo de los receptores TrkB ante la inhibición de desacetilasas de histona de clase I sobre la formación de la memoria de reconocimiento.



## 5. Materiales y métodos



## 5.1 Sujetos experimentales

Se emplearon ratones hembras y machos de la cepa C57BL6/J jóvenes (2-3 meses) al momento de la cirugía, provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones se mantuvieron en cajas individuales de acrílico transparente, con libre acceso a agua y alimento (excepto durante la evaluación conductual de CTA donde se sometieron a restricción de agua), a una temperatura entre 18° y 26° C, con un 50% de humedad y un ciclo de luz oscuridad de 12 h cada uno. Los protocolos de conducta se realizaron durante la fase de luz entre las 9 y 12 h. Todos los procedimientos de mantenimiento, cirugía y disección estuvieron sujetos a los protocolos aprobados por los comités nacionales según la NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 2001) sobre el manejo y uso de animales de laboratorio.

## 5.2 Cirugía estereotáxica

Los ratones fueron anestesiados con 1-1.5% de isoflurano (VETone Fluriso™; Matrux VIP 3000, Midmark) y colocados en un aparato estereotáxico (51,603, Stoelting) con adaptador para ratones (923-B, KOPF instruments). El cráneo fue ajustado a una posición horizontal y se realizó una pequeña incisión en el cráneo de los animales. Se colocaron cánulas 23G de acero inoxidable (8 mm de largo, Small Parts, USA) de manera bilateral dirigidas a la IC, de acuerdo a las coordenadas obtenidas con base en el atlas de referencia de Allen (Dong, 2008): AP: +1.4 mm; ML:  $\pm 3.3$  mm; DV: 3.0 mm. Las cánulas fueron ancladas con ayuda de cemento dental. Se colocaron agujas del mismo largo que las cánulas con la intención de evitar que las cánulas se taparan. Se permitió la recuperación de los ratones durante 12 días.

## 5.3 Fármacos

El inhibidor de las HDACs clase I, MS-275 (EPS002, Sigma-Aldrich) fue almacenado a -20 °C en solución stock a 10.84 mM disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO, D8779, Sigma-Aldrich). La solución stock de MS-275 fue diluida a 3.04



mM con solución salina isotónica (SSI, 0.9% NaCl) inmediatamente antes de las microinfusiones en la corteza insular. La solución control, denominada “vehículo 1”, tuvo la misma concentración de DMSO.

El inhibidor del receptor TrkB, K-252a (K-150, Alomone Labs) fue almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en solución stock a  $100\text{ }\mu\text{M}$  disuelto en DMSO. La solución stock fue diluida a  $25\text{ }\mu\text{M}$  con SSI inmediatamente antes de realizar las infusiones en la corteza insular. La solución control, denominada “vehículo 2”, tuvo la misma concentración de DMSO.

#### **5.4 Inyecciones intracerebrales**

Las microinfusiones se realizaron con ayuda de agujas 30 G (4000-74-BX, Monoject™) de 9 mm de largo. La aguja de microinfusión fue conectada a través a una manguera de polietileno a una jeringa Hamilton de  $10\text{ }\mu\text{l}$  acoplada a una bomba de microinfusión (Cole Parmer Instruments). Las inyecciones en la IC consistieron en  $0.5\text{ }\mu\text{l}$  por hemisferio a una velocidad de  $0.25\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$  y se esperó 1 min más para la difusión del fármaco.

#### **5.5 Reconocimiento del objeto novedoso (ORM)**

El aparato consistió en una caja de madera ( $33\text{ x }33\text{ x }30\text{ cm}$ ) previamente desodorizada con etanol al 70% y con una ligera capa de aserrín en el fondo de la caja. Los objetos utilizados fueron figuras Lego™ con dimensiones máximas de  $3.0\text{ cm x }5.0\text{ cm x }4.5\text{ cm}$ . Diez días después de la cirugía, los animales fueron habituados por 3 días, 3 min/día en el aparato. Al día siguiente se infundió vehículo 1 o MS-275 y 1 h después se realizaron dos protocolos uno denominado débil (3 min de entrenamiento) y el otro fuerte (10 min de entrenamiento). El tiempo de 1 h fue elegido de acuerdo a los experimentos preliminares con el grupo de la Dra. Martha Escobar, en donde la LTP se modifica ante la inhibición de las HDACs de clase I; aunado a esto se realizaron grupos piloto (no mostrados en el presente trabajo) que fueron inyectados inmediatamente después del entrenamiento, el efecto conductual observado fue en menor grado. En los grupos que se indican, además se realizó la inyección de vehículo 2 o K-252a a 1 o 4 hrs



posterior al entrenamiento. Al día 5 se evaluó la memoria de largo plazo (LTM), para lo cual uno de los objetos se cambió y se le permitió al sujeto explorar durante un tiempo de 10 min. Las sesiones de entrenamiento y LTM se videograbaron y por análisis de los videos se registró el tiempo de exploración de cada uno de los objetos. Se graficó el índice de reconocimiento = tiempo objeto A o B/(tiempo objeto A + tiempo objeto B).

### **5.6 Condicionamiento aversivo al sabor (CTA)**

Se realizaron dos protocolos conductuales: CTA fuerte (sacarina 0.3%, LiCl 127.0 mg/kg) y CTA débil (sacarina 0.1%, LiCl 47.6 mg/kg). Diez días después de la cirugía se inició la restricción de agua, el animal recibió acceso a líquidos en dos periodos, uno por la mañana (20 min) y otro por la tarde (10 min), el segundo para evitar la deshidratación. Durante 5 días se realizó la habituación durante los consumos de la mañana y se presentó únicamente agua en dos bebederos. El día 6 se infundió el vehículo (Veh) o el MS-275 en la corteza insular de cada hemisferio. Una hora después se realizó la adquisición, momento en el que se le presentaron al sujeto dos bebederos de sacarina durante 20 min al cabo de los cuales se esperaron 10 min y se administró por vía intraperitoneal LiCl. El día 7 se le presentaron al animal un bebedero de sacarina y otro con agua purificada para evaluar la memoria de largo plazo (LTM). Se registraron los volúmenes de líquido consumido y se obtuvieron los índices de consumo = Vol de línea base o sacarina/(vol línea base + Vol sacarina) para la fase de entrenamiento; índice de consumo = Vol sacarina o agua/(Vol sacarina + Vol de agua) para la LTM

### **5.7 Extracción y cuantificación de proteínas**

El análisis de los niveles de acetilación se realizó a través de la cuantificación de H4K12ac, debido a que es una modificación de histona que ha sido asociada al proceso de aprendizaje y memoria (Peleg *et al.*, 2010). Para la abundancia de la acetilación y BDNF, se sacrificaron animales a diferentes tiempos posteriores al entrenamiento y se disecó la corteza insular. Una vez disecada la corteza insular, se homogeneizó en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% tritón X-100, 0.5%



deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM NaF, 1 mM ortovanadato de sodio, inhibidores de proteasas cOmplete ULTRA Tabl., Roche) por sonicación (Branson Sonifer 250) y se mantuvo en agitación por 15 min en hielo, posteriormente se centrifugó a 12500 rpm, 20 min, 4 °C (Hermle Z 233 MK-2), el sobrenadante recuperado se guardó en un tubo. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford, el cual se basa en la utilización de un colorante (azul brillante de Coomassie G-250) que en soluciones acuosas y en presencia de ácido fosfórico presenta coloración parda, mientras que al encontrarse frente a una proteína forma un complejo con ella (principalmente con aminoácido básicos) adquiriendo coloración azul (Bradford, 1976). Se empleó el reactivo de Bradford (5000006, BioRad) que fue diluido y filtrado según las recomendaciones del producto. Los estándares de proteína fueron preparados con albúmina de suero bovino (BSA, A9418, Sigma-Aldrich) a concentraciones de 0.1250, 0.0250, 0.0375, 0.0750, 0.1500, 0.1875 y 0.2250 µg/µl. Las determinaciones se realizaron por triplicado colocando 20 µl del estándar (o de las muestras diluidas) en el pozo de la microplaca y posteriormente se adicionaron 180 µl del reactivo de Bradford. Se incubó 5 min para posterior medición en lector de microplacas a longitud de onda de 630 nm. La concentración de proteína de las muestras se obtuvo por interpolación de la absorbancia en la curva de calibración y multiplicación por el factor de dilución empleado.

## 5.8 Electroforesis e inmunoblot

La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida al 12% (80 mV, 2h) y se cargaron 30 µg por muestra. Posteriormente se realizó la transferencia húmeda (100 V, 1h) a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Immun-Blot®, BioRad). Las membranas de PVDF fueron bloqueadas con BSA al 5% en solución buffer de trizma adicionada con tritón (TBST; 150 mM NaCl, 100 mM trizma base, 0.1% triton X-100; Sigma-Aldrich) e incubadas una noche con los anticuerpos primarios anti-H4K12ac (1:1000, rabbit, Abcam, ab-61238), anti-BDNF (1:500, rabbit, ANT-010, Alomone Labs) o anti- GAPDH (1:1000, rabbit, Sigma, G9545).



Después de la incubación del anticuerpo primario, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-rabbit acoplado a peroxidasa de rábano, HRP (1:5000, Invitrogen, 656,120). Todos los anticuerpos fueron incubados en BSA al 3% en TBST. El revelado de las membranas fue realizado utilizando el substrato quimioluminiscente (Immobilon™ Western chemiluminiscent HRP substrate, WBKLS, Millipore) y registrado en el escáner C-Digit® (LI-COR). El análisis densitométrico fue realizado utilizando el software Image-J (NIH, Bethesda). Las densidades de BDNF (en el inmunoblot se observaron principalmente dos bandas, la banda elegida corresponde al BDNF maduro aproximadamente de 14 kDa), de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, única banda de aproximadamente 35 kDa) y de H4K12ac (única banda de aproximadamente de 11 kDa) fueron obtenidas por la cuantificación del porcentaje del área ocupada por la banda. Las expresiones relativas fueron calculadas por el cociente de la densidad de BDNF o H4K12ac y la densidad de GAPDH todas ajustadas al control.

## 5.9 Tinción de Nissl

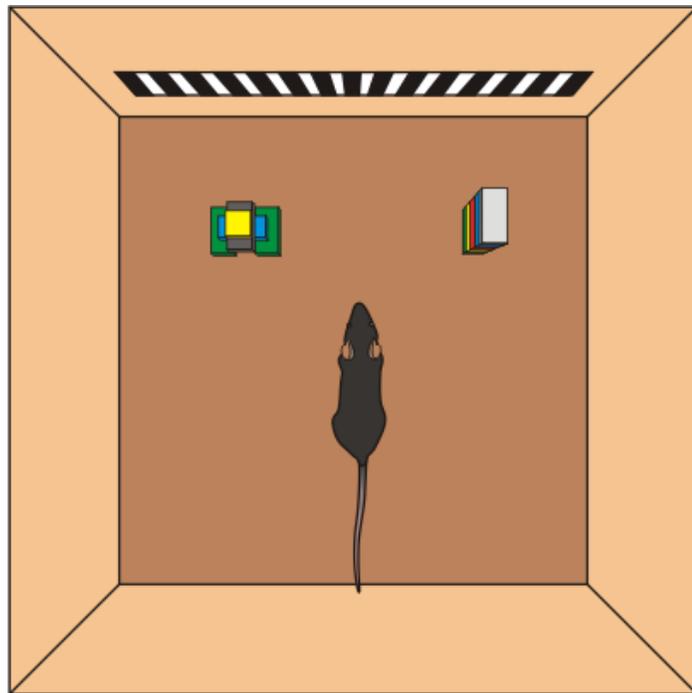
Al término de la prueba de LTM, los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital monosódico (100 mg/kg). Se realizó la perfusión intracardiaca con SSI y con paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en solución buffer de fosfatos (PBS) al 0.1 M. los cerebros fueron removidos, fijados en solución de PFA al 4% y almacenados por al menos 1 semana. Los cerebros se mantuvieron en una solución de sacarosa al 30% durante al menos 2 días antes de realizar los cortes coronales. Los cortes coronales de 40  $\mu$ m se realizaron en un criostato (CM1520, Leica) y fueron colocados en portaobjetos de vidrio previamente gelatinizados. Los cortes fueron teñidos siguiendo el protocolo de la Tinción de Nissl: fueron hidratados en concentraciones decrecientes de etanol desde etanol 90% hasta agua destilada. Los cortes fueron sumergidos en acetato de violeta de cresilo (violeta de cresilo al 0.5%, ácido acético glacial al 0.3%, en agua destilada) durante 2 min. El exceso de colorante fue lavado con agua destilada; se continuó con inmersiones en etanol al 50% durante 1 min.



Posteriormente los cortes fueron lavados con etanol ácido (ácido acético glacial al 1% en etanol al 70%) durante 2 min. Finalmente los cortes coronales fueron deshidratados y montados con resina sintética como medio de montaje.

### **5.10 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados usando el programa GraphPad Prism, versión 8.0. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis conductual se realizó ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Bonferroni. Para el análisis de los inmunoblots se realizó la prueba U de Mann Whitney de dos colas. En todos los análisis estadísticos se consideró una  $P < 0.05$  como estadísticamente significativa.



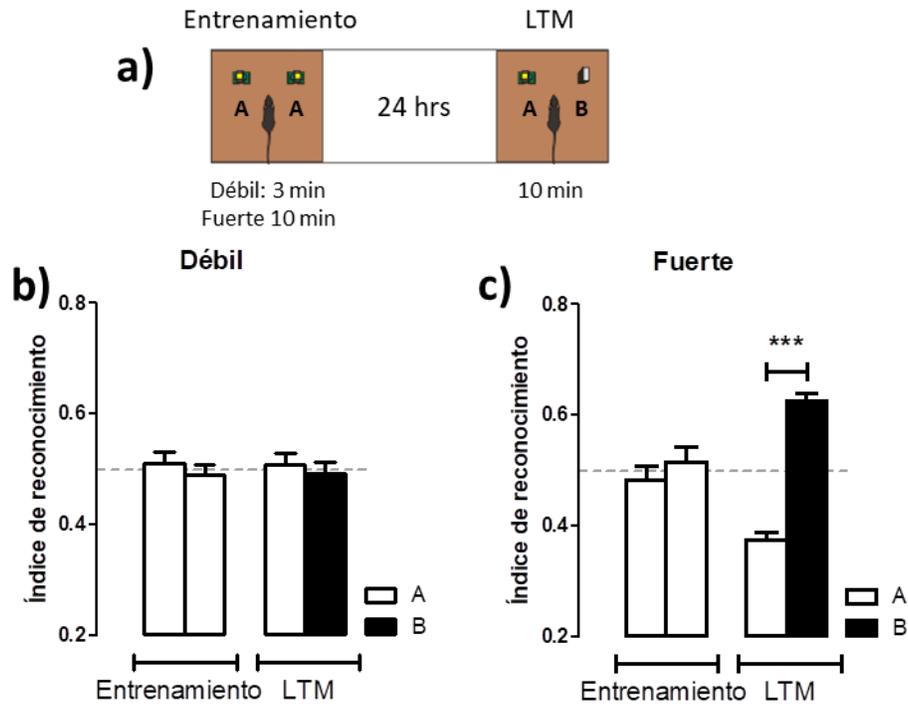
## 6. Resultados



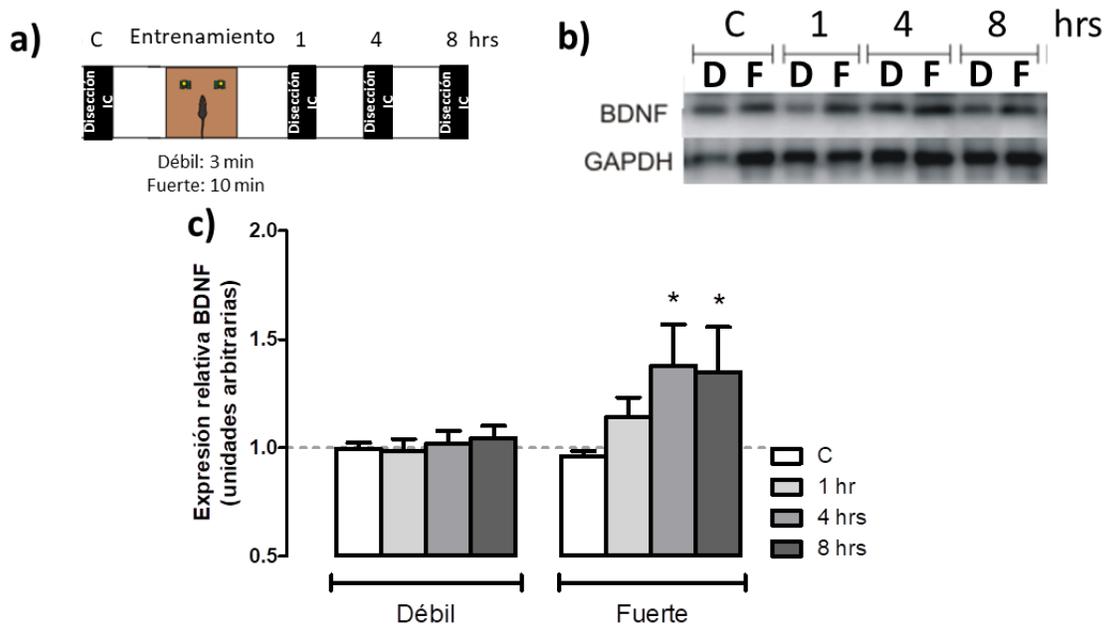
## **6.1 El entrenamiento fuerte, pero no el débil, induce formación de memoria de reconocimiento asociado al incremento en BDNF**

Para el modelo de reconocimiento de objetos, la “intensidad” del estímulo *per se* no se puede modificar, sin embargo sí es posible hacerlo sobre el entrenamiento en cuanto a su duración, por lo cual desde este punto en adelante, se considerará como “intensidad de entrenamiento” a la duración de la exposición a los objetos.

Con la intención de evaluar los efectos de la intensidad del entrenamiento sobre la consolidación de la memoria, realizamos dos protocolos para la memoria de reconocimiento de objetos, por lo que modificamos la duración del entrenamiento (Figura 15a), estableciendo un entrenamiento débil (3 min) que no genera LTM (Figura 15b). Por otro lado, los animales con entrenamiento denominado fuerte (10 min) sí generaron LTM (Figura 15c). De acuerdo a estas diferencias asociadas a la intensidad del entrenamiento, decidimos analizar el curso temporal de BDNF asociado a la consolidación de la memoria. En el análisis de los inmunoblots para BDNF, se observaron dos bandas: una de aproximadamente 32 kDa que corresponde al proBDNF, la segunda banda de aproximadamente 14 kDa corresponde a la forma madura de BDNF; únicamente se realizó la cuantificación de la forma madura. El análisis temporal de la abundancia de BDNF (Figura 16a) mostró que los niveles de esta neurotrofina se mantienen en nivel basal, posterior al entrenamiento débil (Figura 16c), mientras que los niveles de BDNF incrementaron hacia las 4 h posterior al entrenamiento fuerte (Figura 16c).



**Figura 15. La formación de la memoria de largo plazo (LTM) depende de la intensidad del entrenamiento.** **a)** Diagrama para la evaluación de la memoria de largo plazo en condiciones de entrenamiento débil y fuerte. **b)** Los animales ( $n=8$  por grupo) fueron entrenados con dos objetos idénticos (A) durante 3 minutos, 24 horas después fueron evaluados con un objeto familiar (A) y un objeto novedoso (B) durante 10 minutos. Los animales no mostraron LTM. **c)** Los animales ( $n=8$  por grupo) fueron entrenados durante 10 minutos con dos objetos idénticos (A); 24 horas más tarde fueron evaluados con un objeto familiar (A) y un objeto novedoso (B) durante 10 minutos. El análisis estadístico mostró que únicamente los animales entrenados en el protocolo fuerte reconocen el objeto novedoso, evidenciado por un incremento en la exploración del objeto nuevo. \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA de una vía post-test Bonferroni



**Figura 16. La expresión de BDNF depende de la intensidad del entrenamiento.** a) Diagrama experimental para la extracción total de proteínas de la corteza insular (IC) en animales con entrenamiento débil (D) y fuerte (F). b) Inmunoblots representativos para BDNF y GAPDH. c) Análisis de los inmunoblots a las 0 horas (control, C, n=5), 1 hora (n=5), 4 horas (n=5), 8 horas (n=5) después del entrenamiento débil y fuerte. c) El entrenamiento débil no indujo incremento en la expresión de BDNF, mientras que el entrenamiento fuerte incrementa la expresión de BDNF a las 4 y 8 horas post-entrenamiento. \* $p < 0.05$  U de Mann-Whitney de dos colas. La expresión relativa fue calculada dividiendo la densidad de BDNF entre la densidad de GAPDH.

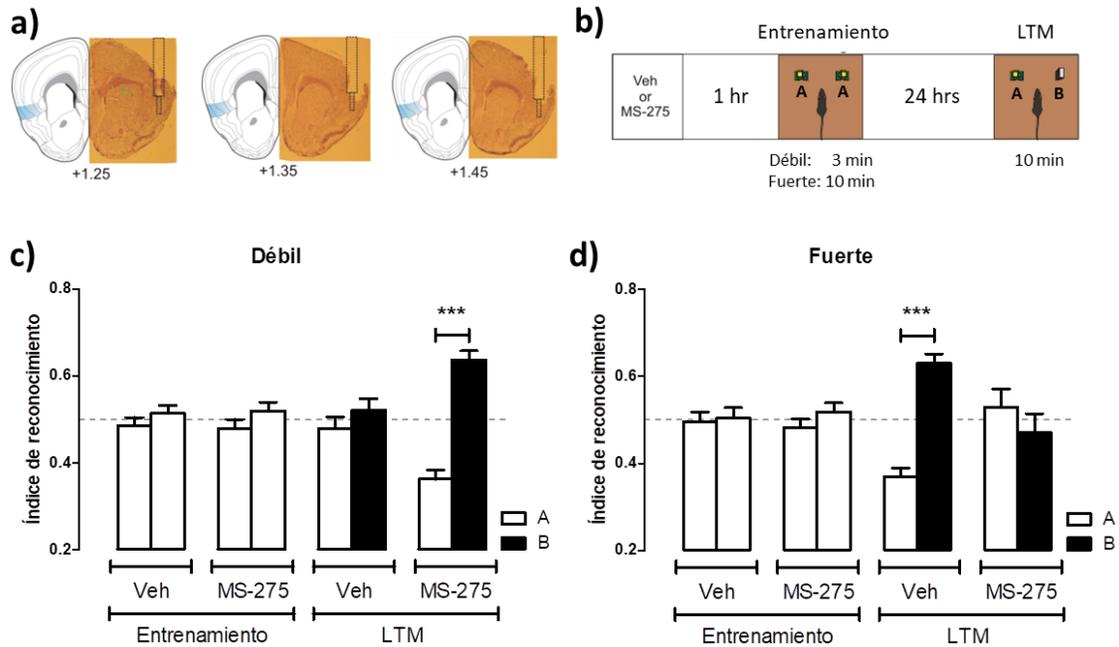
## 6.2 La inhibición de las HDACs de clase I en la corteza insular favorece la consolidación en el entrenamiento débil, pero impide la consolidación en el entrenamiento fuerte

Una vez establecidos los modelos conductuales, procedimos a evaluar los efectos de la inhibición de las HDACs de clase I en la formación de la memoria. Para analizar este punto, inyectamos el inhibidor de HDACs de clase I, MS-275, en la corteza insular 1 h antes de la fase de entrenamiento débil y fuerte y al siguiente día se evaluó la LTM (Figura 17b). Durante la fase de entrenamiento, todos los grupos exploran de manera semejante ambos objetos. El análisis de la LTM indica que la inyección de MS-275 en la corteza insular potencia la consolidación del ORM en condiciones débiles de entrenamiento (Figura 17c). Por otro lado, la inyección de MS-275 en la corteza insular bloquea la consolidación del



entrenamiento fuerte, evidenciado en la incapacidad de los animales para reconocer el objeto nuevo (Figura 17d).

Estos resultados indican que la inhibición de las HDACs de clase I en la IC afecta la formación de memoria de manera dependiente de la intensidad del estímulo debido a que potencia la formación de memoria en condiciones débiles de entrenamiento, mientras que la bloquea en condiciones fuertes.



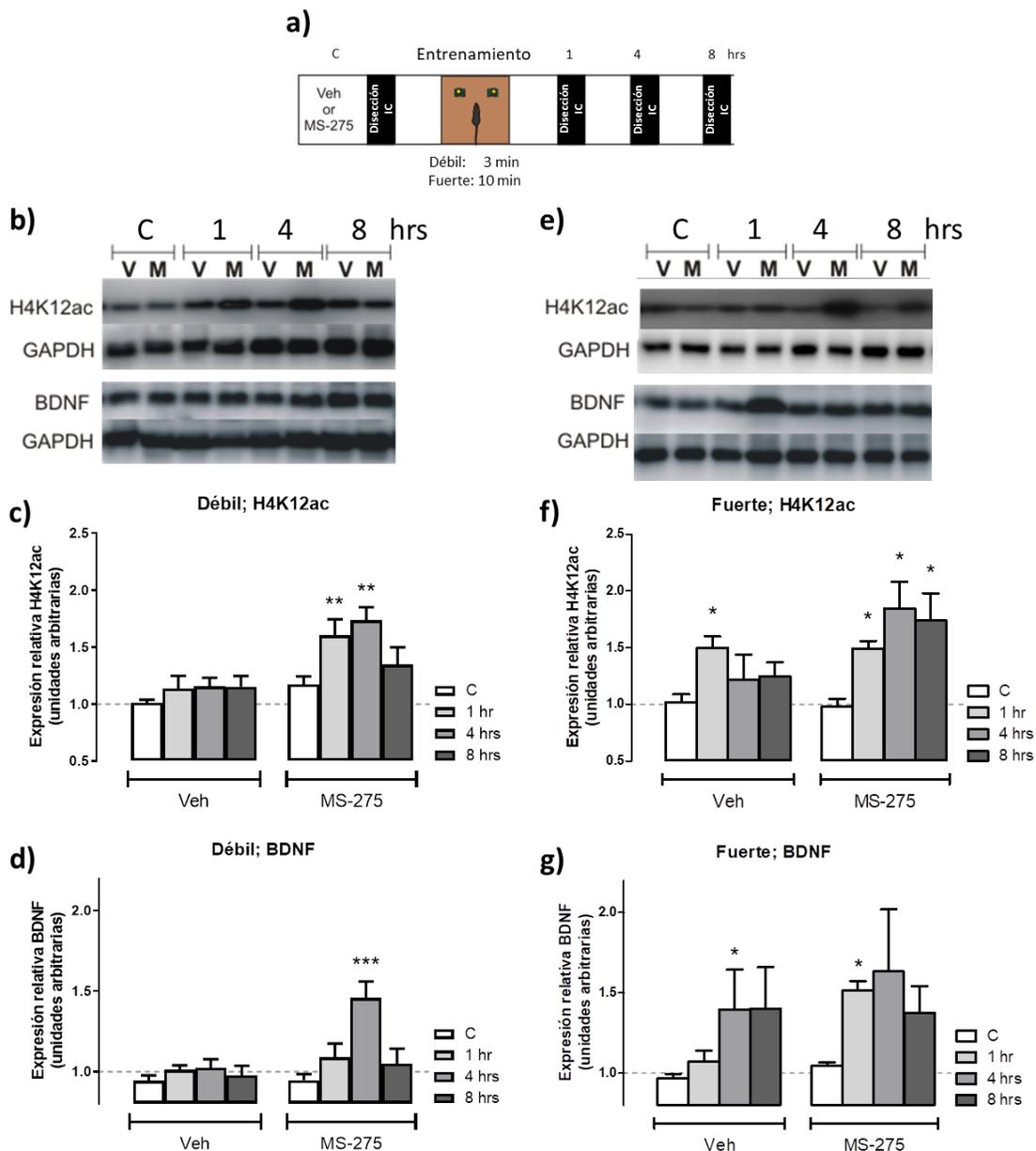
**Figura 17. La inhibición de las HDACs de clase I potencia la formación de memoria en condiciones débiles, mientras que bloquea la formación de memoria en condiciones fuertes.** **a)** Cortes coronales representativos con su diagrama correspondiente. La zona azul representa el área correspondiente a la corteza insular (Modificado de Dong, 2008). **b)** Diagrama experimental. Los animales fueron inyectados con solución vehículo o MS-275 en la corteza insular, 1 hora más tarde se expusieron a dos objetos idénticos (A) durante 3 minutos (débil) o 10 minutos (fuerte). Al siguiente día fueron expuestos a un objeto familiar (A) y uno novedoso (B) por 10 minutos. **c)** Los grupos de entrenamiento débil (n=8 por grupo) mostraron exploración semejante de los objetos durante la fase de entrenamiento. En la evaluación de la LTM, sólo el grupo MS-275 muestra mayor exploración por el objeto novedoso (B). **d)** Los grupos de entrenamiento fuerte (n=8 por grupo) mostraron exploración semejante por los objetos durante la fase de entrenamiento. En la evaluación de la LTM únicamente el grupo vehículo reconoce el objeto novedoso (B). \*\*\*  $p < 0.001$  ANOVA de una vía post-test Bonferroni.



### **6.3 La inhibición de las HDACs de clase I induce incremento en la acetilación de histonas y en los niveles de BDNF de manera dependiente de la intensidad del estímulo**

Con la finalidad de conocer si el MS-275 induce la inhibición de las HDACs de clase I, realizamos el análisis de los niveles de acetilación de histonas como un control, para ello se utilizó el anticuerpo contra H4K12ac, marca de acetilación que ha sido asociada a la formación de la memoria (Guan et al., 2009; Peleg et al., 2010). Diferentes grupos de animales fueron sacrificados inmediatamente después de la inyección (control, C) y 1, 4 y 8 hrs posterior al entrenamiento, para obtener la IC y realizar extracciones de proteína total para el análisis por inmunoblots (Figura 18a). Posterior al entrenamiento débil, el grupo vehículo no mostró cambios en los niveles de H4K12ac, mientras que el grupo MS-275 mostró incremento de H4K12ac a las 1 y 4 hrs (Figura 18c).

Con la finalidad de analizar el efecto de la inhibición de las HDACs de clase I y la intensidad del estímulo sobre la abundancia de BDNF, se realizó el análisis del curso temporal de esta neurotrofina. El análisis del curso temporal en la abundancia BDNF no mostró cambios en el grupo vehículo post entrenamiento débil, mientras que el grupo MS-275 mostró incrementos de BDNF hacia las 4 y 8 hrs post entrenamiento (Figura 18d). Después del entrenamiento fuerte, el grupo vehículo mostró un incremento en los niveles de H4K12ac únicamente 1 hr post entrenamiento, mientras que el grupo MS-275 mostró incremento sostenido desde 1 hr hasta 8 hr post entrenamiento (Figura 18f). Por otro lado, en el grupo vehículo con entrenamiento fuerte, los niveles de BDNF se incrementaron hacia las 4 hrs post entrenamiento; sin embargo el grupo MS-275 mostró un incremento temprano en BDNF hacia 1 hr post entrenamiento (Figura 18g).



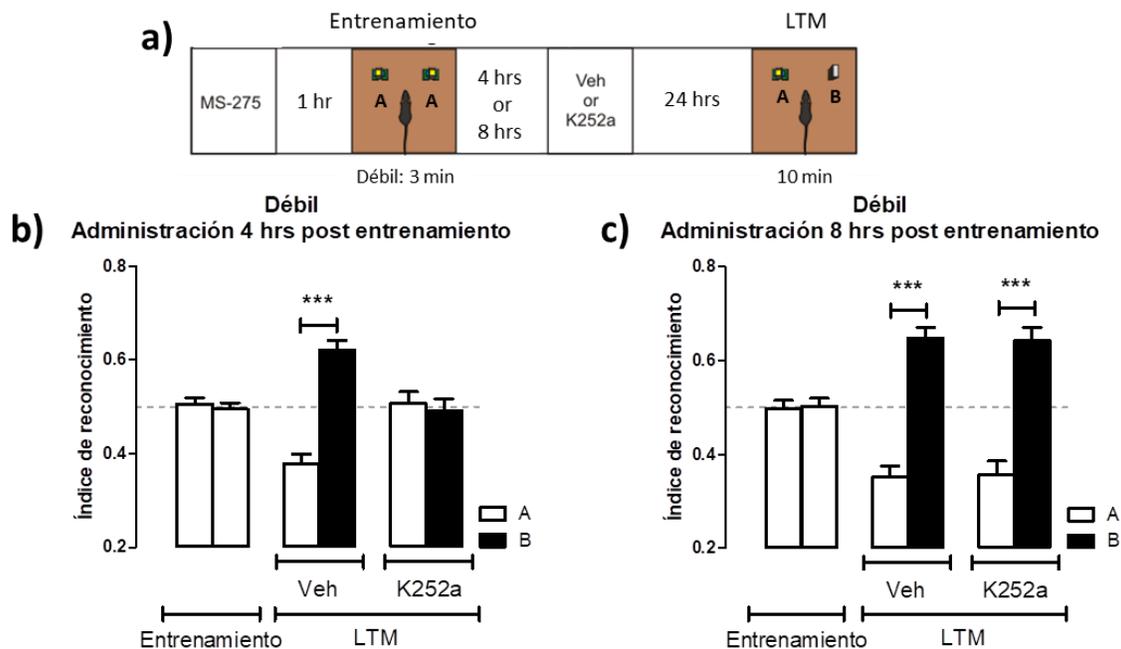
**Figura 18. La inhibición de las HDACs de clase I modifica la acetilación de histonas y la expresión de BDNF en un patrón temporal diferente.** **a)** Se inyectó vehículo o MS-275 en la IC; 1 h después se realizó el entrenamiento débil o fuerte. Diferentes grupos de animales fueron sacrificados a diferentes tiempos posterior al entrenamiento (n=6 por grupo por tiempo). **b)** Inmunoblots representativos para H4K12ac, BDNF y GAPDH en condiciones débiles. **c)** Abundancia de H4K12ac posterior al entrenamiento débil. El grupo vehículo no mostró incrementos en los niveles de H4K12ac, mientras que el grupo MS-275 mostró incremento de H4K12ac 1 h y 4 hr post entrenamiento. **d)** Abundancia de BDNF en condiciones débiles. El grupo vehículo no mostró cambios en la expresión de BDNF mientras que el grupo MS-275 mostró incremento a las 4 h post entrenamiento. **e)** Inmunoblots representativos para H4K12ac, BDNF y GAPDH en condiciones fuertes. **f)** Abundancia de H4K12ac en condiciones fuertes. El grupo vehículo mostró un incremento 1 h post-entrenamiento, mientras que el grupo MS-275 mostró incremento 1, 4 y 8 h post entrenamiento. **g)** Abundancia de BDNF en condiciones fuertes. El grupo vehículo mostró incremento en la expresión de BDNF 4 h post entrenamiento, mientras que el grupo MS-275 mostró incremento 1 h post entrenamiento. \*p<0.05; \*\*p<0.01; p<0.001 Mann-Witnev de dos colas.



#### **6.4 La inhibición de la actividad de los receptores TrkB revierte el efecto inducido por la inhibición de las HDACs de clase I de manera dependiente del tiempo**

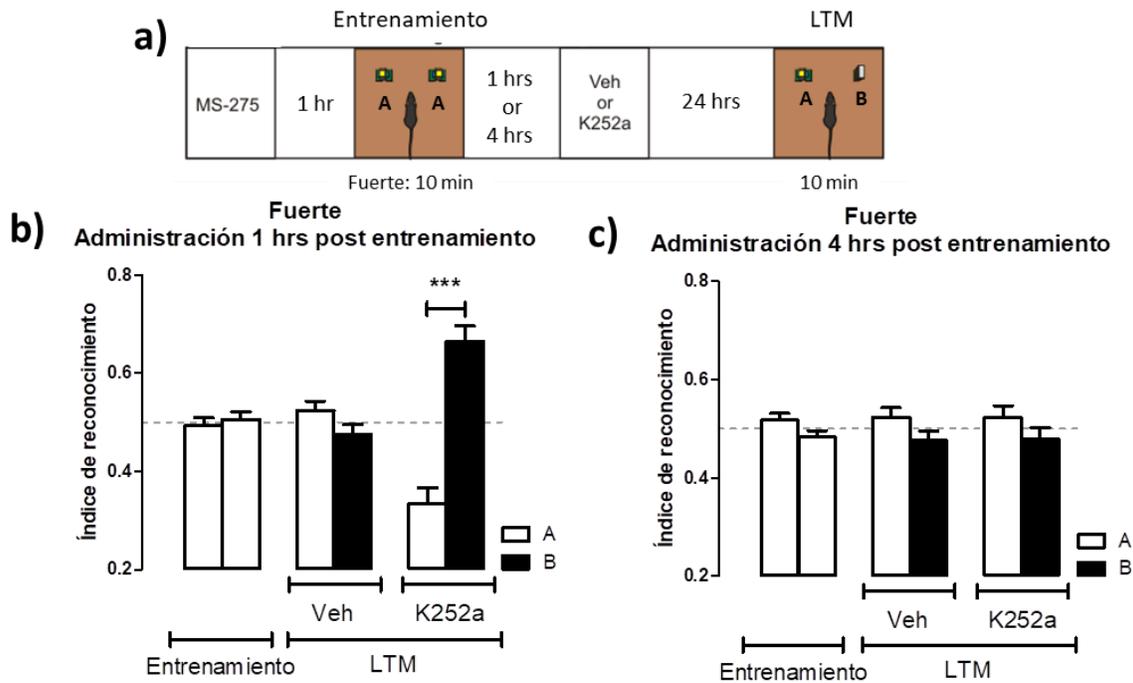
De acuerdo con los resultados anteriores, es posible que esta diferencia temporal en la expresión de BDNF sea la responsable de potenciar la consolidación en condiciones débiles (4 y 8 hrs) y de bloquearla en condiciones fuertes (1 y 4 hrs) (figuras 18d y 18g) debido al posible efecto negativo asociado al exceso de BDNF (Cunha *et al.*, 2009). Con la finalidad de comprobar esta hipótesis realizamos la inyección de MS-275 en la IC, más tarde realizamos el entrenamiento débil y posteriormente realizamos inyecciones de vehículo o del inhibidor de los receptores TrkB, K252a, a las 4 o 8 hrs post entrenamiento, al siguiente día realizamos la evaluación de la LTM (Figura 19a).

Los resultados mostraron que en el grupo inyectado con K252a 4 hrs post entrenamiento, se evita la consolidación de la LTM ya que este grupo explora de manera semejante ambos objetos (Figura 19b). Por otro lado, la inyección de K252a 8 hrs post entrenamiento no logró revertir la potenciación sobre la formación de la LTM inducido por el MS-275 (Figura 19c).



**Figura 19. La potenciación de la formación de la memoria en el entrenamiento débil, inducida por la inhibición de las HDACs de clase I, depende de la actividad de los receptores TrkB a las 4 hrs post entrenamiento.** **a)** Diagrama experimental. Los animales fueron inyectados en la IC con MS-275, 1 h más tarde se realizó la fase de entrenamiento débil (3 min); diferentes grupos de animales (n=8 por grupo) fueron inyectados 4 o 8 h con solución vehículo o K252a. Al siguiente día se realizó la evaluación de LTM durante 10 min. **b)** En la fase de entrenamiento los animales exploraron de manera semejante ambos objetos. La evaluación de LTM en los animales inyectados 4 h post entrenamiento mostró que únicamente el grupo vehículo reconoce el objeto novedoso (B), mientras que se revirtió el efecto en el grupo K252a. **c)** La evaluación de la LTM mostró que el grupo vehículo y el grupo K252a exploraron más tiempo al objeto novedoso (B). \*\*\*p<0.001 ANOVA de una vía post-test Bonferroni.

De manera semejante realizamos la inyección de MS-275 en la corteza insular, 1 hr más tarde realizamos el entrenamiento fuerte; 1 y 4 hrs post-entrenamiento se realizaron inyecciones de vehículo o de K252a (Figura 20a). El análisis mostró que el grupo inyectado con K252a 1 hr posterior al entrenamiento es capaz de reconocer el objeto nuevo, revirtiendo el bloqueo sobre la formación de la LTM inducido por el MS-275 (Figura 20b); por otro lado, el grupo inyectado con K252a 8 hrs post entrenamiento no logró reconocer el objeto novedoso (Figura 20c).



**Figura 20. El bloqueo de la formación de la memoria en el entrenamiento fuerte, inducido por la inhibición de las HDACs de clase I, depende de la actividad de los receptores TrkB 1 hora post entrenamiento.** **a)** Diagrama experimental. Los animales fueron inyectados en la IC con MS-275, 1 h más tarde se realizó la fase de entrenamiento fuerte (10 min); diferentes grupos de animales (n=8 por grupo) fueron inyectados 1 o 4 h con solución vehículo o K252a. Al siguiente día se realizó la evaluación de LTM durante 10 min. **b)** En la fase de entrenamiento los animales exploraron de manera semejante ambos objetos. La evaluación de LTM en los animales inyectados 1 h post entrenamiento mostró que el grupo vehículo no reconoce el objeto novedoso (B), mientras que el grupo K252a sí lo hace, mostrado por un incremento en el índice de reconocimiento. **c)** La evaluación de la LTM mostró que el grupo vehículo y el grupo K252a no logran reconocer al objeto novedoso (B). \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA de una vía post-test Bonferroni.

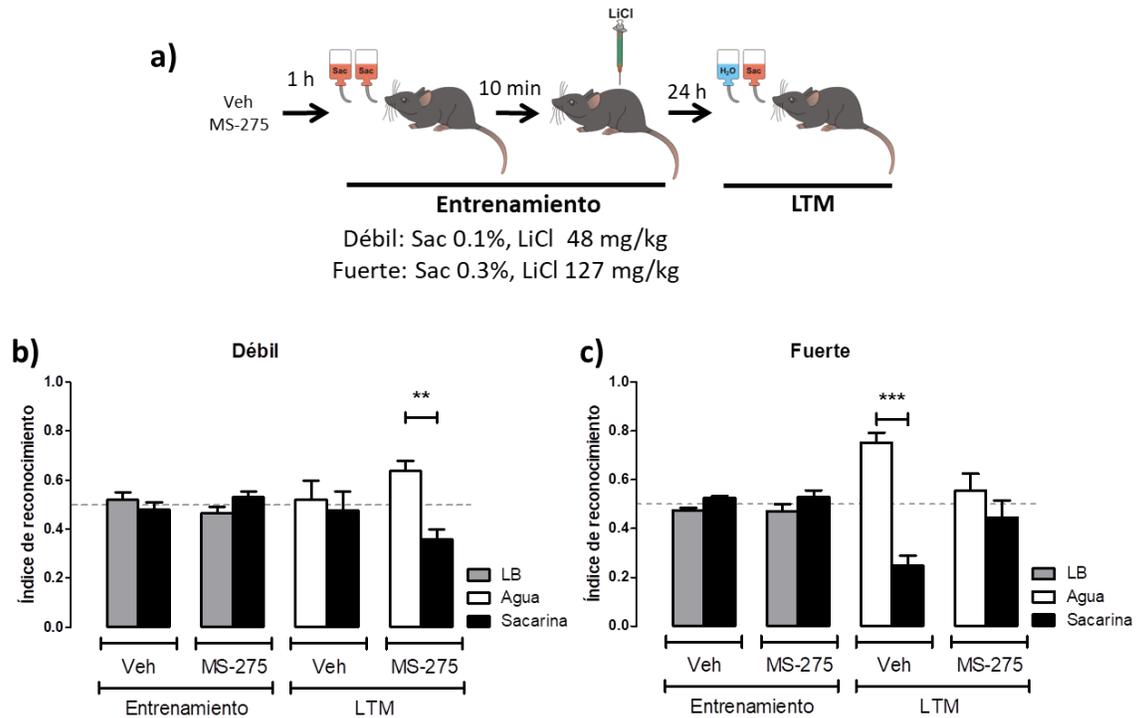
Estos resultados sugieren que el incremento de BDNF 4 hrs posterior al entrenamiento está asociado a la consolidación de la memoria de reconocimiento en condiciones débiles de entrenamiento; por otro lado, el incremento temprano de BDNF 1 hr post entrenamiento parece alterar el proceso de consolidación, evitando la formación de la LTM en condiciones fuertes de entrenamiento.

## 6.5 La inhibición de las HDACs de clase I modifica el establecimiento del condicionamiento aversivo al sabor de manera dependiente de la intensidad del estímulo

Con la finalidad de corroborar los efectos de la inhibición de las HDACs de clase I en la memoria de reconocimiento, se realizó un protocolo semejante con el modelo



de condicionamiento aversivo al sabor (CTA, Figura 21a). Los resultados obtenidos son semejantes al ORM: la inhibición de las HDACs de clase I en condiciones débiles de entrenamiento potencian la consolidación del CTA mostrado por la disminución en el consumo de sacarina en comparación con el consumo de agua (Figura 21b), por otro lado, la inhibición de las HDACs de clase I bloquea la consolidación del CTA en condiciones fuertes de entrenamiento evidenciado por el consumo semejante de agua y sacarina (Figura 21c).



**Figura 21. La inhibición de las HDACs de clase I ocasiona un efecto diferencial, dependiente de la intensidad del estímulo, sobre la formación de la aversión condicionada al sabor. a)** Diagrama experimental. El día del entrenamiento, a los sujetos experimentales se les inyectó en la corteza insular solución vehículo o MS-275, 1 h más tarde se les presentaron, durante 20 min, dos bebederos con sacarina 0.1% (CTA Débil) o 0.3% (CTA Fuerte), 10 min después se realizó la inyección intraperitoneal de LiCl a las dosis de 48 mg/kg (CTA Débil) o 127 mg/kg (CTA Fuerte); al siguiente día se les presentaron un bebedero de agua y uno de sacarina para la evaluación de la memoria de largo plazo (LTM). **b)** Entrenamiento débil. Se comparan los consumos de agua durante la línea basal y el consumo de sacarina en el entrenamiento, no se observan diferencias. En la evaluación de la LTM, únicamente el grupo MS-275 mostró aversión por la sacarina, denotado por una disminución en el consumo. **c)** Entrenamiento fuerte. Se comparan los consumos de agua durante la línea basal y los consumos de sacarina durante el entrenamiento, no se observan diferencias. En la evaluación de la LTM, el grupo vehículo mostró aversión por la sacarina, mientras que el grupo MS-275 consume indistintamente agua o sacarina. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA de una vía post-test Bonferroni.



Laboratorio de  
Neurobiología del  
Aprendizaje y la Memoria

Análisis de los eventos moleculares inducidos  
por la inhibición de la HDAC1 que modifican la memoria  
Gerardo Ramírez-Mejía





La formación de la memoria se refiere a un proceso en el cual la información pasa de corto a largo plazo a través de la consolidación, evento en el cual se requiere la expresión génica y la síntesis de proteínas. Se ha demostrado que las modificaciones epigenéticas como la acetilación de histonas regulan positivamente la expresión de genes como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), una molécula necesaria para la consolidación. Diversos estudios indican que las desacetilasas de histona (HDACs) regulan negativamente la formación y el mantenimiento de la memoria (Guan *et al.*, 2009; MacQuown *et al.*, 2011; Bahari-Javan *et al.*, 2011) y los niveles de acetilación de histonas parece estar estrechamente asociado con las condiciones de entrenamiento (Uchida *et al.*, 2017). En este sentido, se ha demostrado que la inhibición de las HDACs puede generar un efecto positivo en la formación de la memoria, sin embargo poco se han estudiado los efectos de dicha inhibición tiene sobre el curso temporal e impacto de moléculas asociadas a la formación de la memoria, como lo es la neurotrofina BDNF.

Los resultados muestran que la inhibición de las HDACs de clase I por el MS-275 tiene efectos positivos y negativos sobre la formación de la memoria gustativa y de reconocimiento, determinados por la intensidad del entrenamiento; dichos cambios podrían ser explicados por incrementos temporales de la abundancia de BDNF, importante en la formación y mantenimiento de la memoria (Barco *et al.*, 2006). A nivel conductual se corroboró en dos modelos conductuales (CTA y ORM) que en condiciones débiles de entrenamiento, la inhibición de las HDACs de clase I favorece la consolidación; mientras que en condiciones fuertes, la inhibición de las HDACs de clase I evita la formación de memoria (figuras 17 y 21). Este resultado es interesante debido a que hay evidencia que muestra que los inhibidores de las HDACs favorecen la memoria (Guan *et al.*, 2009; MacQuown *et al.*, 2011; Bahari-Javan *et al.*, 2011), pero sólo un reporte previo mostró que la administración crónica de los inhibidores de las HDACs pueden ejercer efectos negativos en la memoria y que existe correlación de la abundancia de BDNF con la incapacidad de consolidar una memoria (Adler y Schmauss, 2016). En el



presente proyecto mostramos que favorecer la expresión BDNF a través de la inhibición de las HDACs de clase I puede generar dos efectos diferenciales que dependen de la intensidad del entrenamiento; además también mostramos que la desregulación temporal y discreta en la abundancia de BDNF ocasionada por la inhibición de las HDACs de clase I genera efectos contraproducentes en la formación de la memoria. El análisis de los niveles de acetilación de histonas del presente trabajo muestra que en condiciones débiles de aprendizaje de reconocimiento, existe un incremento en los niveles de H4K12ac inducida por la inhibición de las HDACs de clase I cuya temporalidad coincide con el incremento en la abundancia de BDNF y la mejora cognitiva. Por otro lado, en condiciones fuertes de entrenamiento, el grupo MS-275 mostró un incremento en los niveles de acetilación incluso a las 8 hrs post entrenamiento, lo cual indica que otros genes pueden ser desregulados y que también pueden contribuir a impedir la formación de la memoria; en este sentido un análisis mucho más profundo para determinar los otros genes que pudieran desregularse, ayudaría a aclarar aún más la dinámica temporal de la expresión génica y sus productos que participan en la formación de la memoria.

Recientemente se demostró que la HDAC1 (enzima que forma parte de la clase I y con mayor afinidad por el MS-275) es capaz de unirse a la cromatina en regiones promotoras del gen de *Bdnf* y de esta manera regular su expresión (Adler y Schmauss, 2016). El análisis de la abundancia de BDNF mostró un incremento en esta neurotrofina a las 4h en condiciones débiles de aprendizaje con la inhibición de las HDACs de clase I y podría corresponder con el incremento de H4K12ac observado a 1 h post entrenamiento. En el caso de las modificaciones en las condiciones de entrenamiento fuerte, se observó en el grupo vehículo que los niveles de BDNF incrementan hacia las 4h (semejante al grupo MS-275-débil), mientras que en el grupo MS-275-fuerte, los niveles de BDNF incrementan desde 1h post-adquisición. Estos datos sugieren que la regulación temporal de la abundancia de BDNF es importante, ya que el incremento de BDFN alrededor de las 4 h post entrenamiento parece ser responsable del proceso de formación de la memoria de reconocimiento.

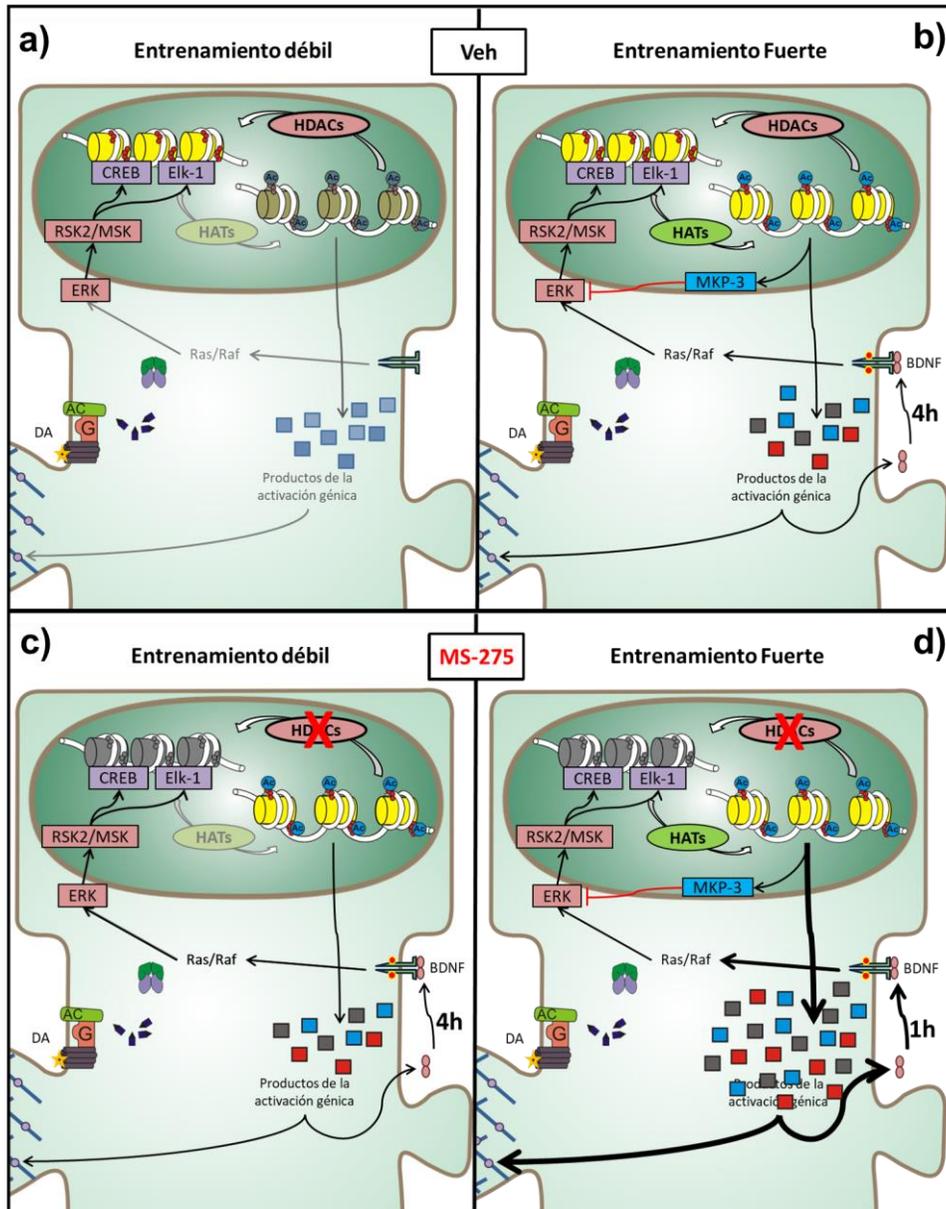


La vía de señalización que parece estar más estrechamente vinculada a las alteraciones positivas y negativas sobre la formación de la memoria es la de los receptores tirosina cinasa B (TrkB), ya que el bloqueo de la actividad de los mismos revierte los efectos generados por la inhibición de las HDACs de clase I, sin embargo poco se ha explorado el mecanismo específico que correlacione a la actividad mantenida o la sobre-activación de los receptores TrkB y a sus efectos negativos sobre la memoria. En este sentido, el presente trabajo muestra que la inhibición de las HDACs de clase I ocasiona el incremento de BDNF con diferentes perfiles temporales que dependen de la intensidad del entrenamiento. El incremento de BDNF podría activar a los receptores TrkB en diferentes momentos lo que induce potenciación o inhibición de la formación de la memoria. El incremento en los niveles de BDNF, especialmente en las condiciones fuertes sólo podrían explicar la parte temprana en el incremento de los niveles de H4K12ac, los cuales son mantenidos incluso a las 8 hrs post entrenamiento. Es claro que una gran variedad de genes se desregulan en las condiciones fuertes de aprendizaje, los cuales son los que también impactarían en la formación de la memoria.

Los resultados asociados a la temporalidad confirman que el momento de incremento de BDNF posterior al entrenamiento, y su acción sobre el receptor TrkB es crucial para la adecuada formación de la memoria, esto debido a que el antagonismo del receptor TrkB a las 4 h después del entrenamiento débil, evita la potenciación de la memoria. Por otro lado, el antagonismo del receptor TrkB hacia la 1 h post entrenamiento fuerte revierte el bloqueo en la formación de la memoria, permitiendo a los animales generar una adecuada LTM. Esto sugiere que los incrementos de BDNF hacia las 4h son los responsables de inducir la formación de la memoria probablemente durante el proceso de consolidación, mientras que incrementos similares en tiempos tempranos (1h) evitan la formación de la LTM (Figura 20). En este sentido, se ha sugerido que las moléculas asociadas a la formación de memoria incrementan su expresión favoreciendo la consolidación de la memoria. Aunado a lo anterior, los resultados sugieren que el perfil temporal es igualmente importante para la consolidación de la memoria. De esta manera, en



condiciones débiles el curso temporal de BDNF no se ve afectado, pero sí la abundancia de BDNF; por otro lado en condiciones fuertes, el curso temporal de BDNF impacta negativamente al proceso de consolidación. En conjunto, estos eventos son sugeridos como “perspectiva vertical”, cuando la abundancia de una proteína es modificada; y “perspectiva horizontal”, cuando el tiempo en el cual incrementa una proteína es alterada. De acuerdo a lo anterior, el correcto funcionamiento del sistema para la consolidación de la memoria requiere que los productos de expresión génica sean coordinados en cantidad, tiempo y localización (estructura cerebral).



**Figura 22. La inhibición de las HDACs de clase I incrementa la abundancia de BDNF (4h) posterior al entrenamiento débil y favorece la consolidación, pero induce el incremento temprano de BDNF (1h) posterior al entrenamiento fuerte e impide la consolidación.** a) Diagrama hipotético del grupo vehículo de condiciones débiles de entrenamiento. b) Diagrama hipotético del grupo vehículo de condiciones fuertes de entrenamiento; se muestra el incremento de BDNF a las 4 h posterior al entrenamiento. c) Diagrama hipotético del grupo con inhibición de las HDACs de clase I y entrenamiento débil, el perfil temporal de la abundancia de BDNF es muy similar a las condiciones del grupo vehículo con entrenamiento fuerte. d) Diagrama hipotético del grupo con inhibición de las HDACs de clase I y entrenamiento fuerte, se muestra el incremento temprano de BDNF hacia la 1hr post entrenamiento. Las figuras con marcas de agua indican baja cantidad o inactividad. La cruz roja indica la inhibición de las HDACs de clase I. Las flechas de mayor grosor indican incremento.



Nuestras aproximaciones experimentales ayudan a sugerir el principio de una vía de señalización (activación de los receptores TrkB) cuya regulación en las condiciones del uso de inhibición de las HDACs de clase I no se conocen puntualmente. Es posible que muchos otros genes, aparte de BDNF, sean afectados por la inhibición de las HDACs de clase I y las condiciones de entrenamiento; de manera similar, es posible que la activación de TrkB por el BDNF se sume a la alteración de la expresión génica y como consecuencia se potencie o inhiba la consolidación de la memoria. Un análisis más extenso de las modificaciones moleculares, así como la regulación de las vías de señalización aportaría más información respecto a los aspectos intermedios (vías de señalización activadas, regulación nuclear, expresión de RNAs, traducción, etc.) sobre los mecanismos finales que modulan la formación de la memoria.

El análisis más profundo sobre otras marcas epigenéticas como los niveles de metilación del gen de *Bdnf* aportaría más información sobre la dinámica de la regulación ya que existe interacción entre la acetilación de histonas y la metilación del DNA e histonas, por lo cual es probable que como consecuencia de la inhibición de las HDACs de clase I, la metilación de histonas así como la marca de 5mC disminuyan, mientras que la marca de 5hmC incremente.

Si bien la propuesta está reducida a lo que podría ocurrir a nivel neuronal, el análisis de la participación de células no neuronales en la regulación de la actividad de BDNF en estas condiciones ayudaría a entender la dinámica temporal, así como a estimar la localización de la neurotrofina atendiendo al tipo celular. Lo anterior es importante, debido a que se ha mostrado que la forma trunca del receptor (observado principalmente astrocitos) regula negativamente la actividad de RhoA, lo que favorece la actividad de cofilina, enzima que desestabiliza el citoesqueleto de actina (Ohira *et al.*, 2006); por otro lado, la forma completa del receptor a través de la vía de PI3K/Akt, regula de manera similar el proceso, lo cual, de acuerdo a las condiciones del sistema puede estar asociado a eventos positivos o negativos en la plasticidad (Chang *et al.*, 2016; Ohira *et al.*, 2006). Un posible análisis indirecto de este evento podría ser la densidad de espinas dendríticas, la cual podría incrementar en las condiciones de inhibición de



las HDACs de clase I y entrenamiento débil; por otro lado la densidad de espinas dendríticas podría disminuir en las condiciones de inhibición de las HDACs de clase I y entrenamiento fuerte.

Así, parece ser posible potenciar la formación de la memoria con la inhibición de las HDACs de clase I a través del incremento en BDNF, en condiciones en las cuales sea difícil establecer una memoria, como lo es el entrenamiento débil. A pesar de esto, la capacidad “potenciadora” de la inhibición de las HDACs de clase I parece ser dependiente de la calidad del entrenamiento o aprendizaje, ya que también es posible bloquear la consolidación de la memoria con la inhibición de las HDACs de clase I, siendo la única diferencia, la intensidad del entrenamiento.

En conjunto, los resultados derivados de este trabajo abren nuevas preguntas para el estudio a profundidad de las relaciones temporales de las proteínas y su papel en la consolidación de la memoria.



## 8. Conclusiones



En resumen, el presente proyecto determinó lo siguiente:

- El BDNF se expresa hacia las 4 horas después de un entrenamiento fuerte de una tarea de memoria de reconocimiento de objetos, pero no se modifica en condiciones débiles.
- La inhibición de las desacetilasas de histona (HDACs) de clase I por el MS-275, potencia la memoria en condiciones débiles de aprendizaje, pero inhibe la formación de memoria en condiciones fuertes.
- La inhibición de desacetilasas de histona de clase I por el MS-275, favorece el incremento en la expresión de BDNF posterior al entrenamiento, sin embargo en condiciones débiles la temporalidad del proceso no se modifica, mientras que en condiciones fuertes la temporalidad se altera y ocurre de manera temprana.
- El bloqueo de los receptores TrkB revierte los efectos de potenciación (4 h post-entrenamiento) e inhibición (1 h post entrenamiento) inducidos por la inhibición de desacetilasas de histona.

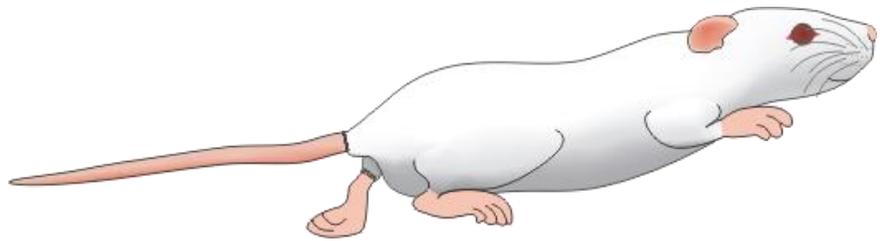
En conclusión, la inhibición de las HDACs de clase I y la intensidad del entrenamiento afectan dos parámetros importantes de la abundancia de BDNF. Por un lado, la cantidad de proteína se incrementa cuando se une la inhibición de las HDACs de clase I y una baja intensidad de entrenamiento (perspectiva vertical); por otro lado, BDNF incrementa de manera temprana cuando se une la inhibición de las HDACs de clase I y una alta intensidad de entrenamiento (perspectiva horizontal). Con estos datos, el presente proyecto muestra la importancia de entender la relación entre la temporalidad y el incremento de proteínas asociadas a la consolidación de la memoria, además que contribuye a identificar posibles ventanas temporales en las cuales el sistema puede ser susceptible para impedir o potenciar la consolidación de la memoria.



## 9. Perspectivas



- Analizar por ChIP-Seq a los genes cuya expresión puede afectarse debido a la inhibición de las HDACs de clase I en las condiciones de entrenamiento débil y fuerte de la memoria de reconocimiento. Los anticuerpos que puedan usarse son las diferentes marcas de acetilación de histonas como H4K12ac.
- Analizar el curso temporal de la expresión de los mRNAs de los genes determinados por ChIP-Seq posterior a la inhibición de HDACs de clase I en el entrenamiento débil y fuerte de la memoria de reconocimiento.
- Determinar la vía de señalización en particular que está asociada a la potenciación e inhibición de la memoria de reconocimiento en las condiciones de entrenamiento débil y fuerte.
- Realizar la inyección de la proteína BDNF en la corteza insular a diferentes tiempos posterior al entrenamiento débil y fuerte de la memoria de reconocimiento para conocer si esta neurotrofina puede inducir los mismos efectos que la inhibición de las desacetilasas de histona de clase I.
- Analizar el perfil de liberación de neurotransmisores por microdiálisis y electroforesis capilar para conocer si la inhibición de las desacetilasas de histona modifica la comunicación neuronal asociada al entrenamiento débil y fuerte de la memoria de reconocimiento.



## 10. Referencias



- Abel T, Lattal M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 11: 180-187.
- Abel T, Kandel E. (1998). Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Brain Res Rev* 26: 360-378.
- Adler SM, Schmauss C. (2016). Cognitive deficits triggered by early life stress: The role of histone deacetylase 1. *Neurobiol Disease* 94: 1-9.
- Aid T, Kazantseva A, Piirso M, Palm K, Timmusk T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85: 525-535.
- Alderson, R.F., Curtis, R., Alterman, A.L., Lindsay, R.M., DiStefano, P.S., 2000. Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and Schwann cells in vitro. *Brain Res.* 871, 210–222.
- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. (2007). Chapter 3 Overview and Concepts In: Epigenetics, 2<sup>nd</sup> edition. Edited by: Allis CD, Caparros ML, Jenuwein T and Reinberg D. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Andero R, Choi DC, Ressler KJ. (2014). Chapter six: BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation and psychiatric disorders. In *Progress in Molecular Biology and translational Science* Vol 122, 169-192 pp.
- Antunes M, Biala G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13: 93-110.
- Bahari-Javan S, Maddalena A, Kerimoglu C, Wittnam J, Held T, Bähr M, Burkhardt S, Delalle I, Kügler S, Fischer A and Sananbenesi F. (2012). HDAC1 regulates fear extinction in mice. *J Neurosci* 32: 5062-5073.
- Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci* 93: 13445-13452.
- Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, McGaugh JL, Bermudez-Rattoni F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of temporal lobe. *Learn Mem* 15: 618-624.
- Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F. (2015). Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behav Brain Res* 285: 213-222.
- Bannister AJ, Kouzarides T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature* 436: 1103-1106.
- Barco A, Bailey CH, Kandel ER. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem* 97: 1520-1533.
- Bedford MT, Richard S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* 18: 263-272.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. (2008). BDNF and memory formation storage. *The Neuroscientist* 14: 147-156.
- Beldjoud H, Barsegyan A, Roozendaal B. (2015). Noradrenergic activation of the basolateral amygdala enhances object recognition memory and induces chromatin remodeling in the insular cortex. *Front Neurosci* 9: Article 108.



- Bennett, J., McRae, P., Levy, L., Frick, K. (2006). Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol Learn Mem*, 85, 139-152.
- Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Muñoz P, Gonzalez S, Schoeftner S, Murchison E, Andl T, Chen T, Klatt P, Li E, Serrano M, Millar S, Hannon G, Blasco MA. (2008). A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Mar;15(3):268-79. doi: 10.1038/nsmb.1399. Epub 2008 Mar 2. Erratum in: *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Sep;15(9):998. PMID: 18311151; PMCID: PMC2990406.
- Bermúdez-Rattoni F. (2004). Molecular mechanisms of taste recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 209-217.
- Bermúdez-Rattoni F, Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. (2005). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 12: 447-449.
- Bermúdez-Rattoni F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 109: 207-216.
- Bermúdez-Rattoni F, McGaugh JL. (2017). Memory consolidation and memory updating: Two sides of the same coin? *Neurobiol Learn Mem* 142: 1-3.
- Berridge MJ. (2014). Module 2 Cell signalling pathways. *Cell signalling Biology* 6.
- Blaser R, Heyser C. (2015). Spontaneous object recognition: a promising approach to the comparative study of memory. *Front Behav Neurosci* 9: 183.
- Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317: 1760-1764.
- Brabander JM, Kramers RJK, Uylings BM. (1998). Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex. *Europ J Neurosci* 10: 1261-1269.
- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K. (2010). The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* 200: 125-140.
- Brown MW, Aggleton JP. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2: 51-61.
- Burke SN, Barnes CA. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7: 30-40.
- Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, Uprety AR, Barnes CA. (2010). Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci* 124: 559-573.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J and Everitt BJ. (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 321-352.
- Castillo DV, Figueroa-Guzmán Y, Escobar ML. (2006). Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 1067: 250-255.
- Cattelan Souza L, Silva Antunes M, Borges Filho CB, Del Fabbro L, Gomes de Gomes M, Rossito Goes AT, Donato F, Prigol M, Peterini Boeira S, Jesse CR. (2015). Flavonoid chysin prevents age-related cognitive decline via attenuation



- of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. *Pharm Biochem Behav* 134: 22-30.
- Cechetto DF, Saper CB. (1987). Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 262: 27-45.
- Chang J, Yao X, Zou H, Wang L, Lu Y, Zhang Q, Zhao H. (2016). BDNF/PI3K/Akt and Nogo-A/RhoA/ROCK signaling pathways contributes to neurorestorative effect of Houshiheisam against cerebral ischemia injury in rats. *J Ethnopharmacol* 194: 1032-1042.
- Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME. (2003). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302: 885-889.
- Choi JK, Howe LJ. (2009). Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem Cell Biol* 87: 139-150.
- Chouliaras L, Mastroeni D, Delvaux E, Grover A, Kenis G, Hof PR, Steinbusch HW, Coleman PD, Rutten BP, van den Hove DL. (2013). Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 34: 2091-2099.
- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. (2006). Arc/Arg3.1 Interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor Trafficking. *Neuron* 52: 445-459.
- Collins BE, Greer CB, Coleman BC, Sweatt JD. (2019). Histone H3 lysine K4 methylation and its role in learning and memory. *Epigen Chromatin* 12: 1-16.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. (1997). Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: Evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17: 2295-2313.
- Cowan ET, Schapiro AC, Dunsmoor JE, Murty VP. (2021). Memory consolidation as an adaptive process. *Psychon Bull Rev*. 28: 1796-1810.
- Creighton SD, Stefanelli G, Reda A, Zovkic IB. (2020). Epigenetic Mechanisms of Learning and Memory: Implications for Aging. *Int J Mol Sci* 21: 6918.
- Cunha C, Angelucci A, D'Antoni A, Dobrossy MD, Dunnett SB, Berardi N, Brambilla R. (2009). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in forebrain results in learning and memory impairments. *Neurobiol Disease* 33: 358-368.
- Dagnas M, Mons N. (2013). Region- and age-specific patterns of histone acetylation related to spatial and cued learning in the water maze. *Hippocampus* 23: 581-591.
- Day JJ, Sweatt JD. (2011). Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* 70: 813-829.
- Day JJ, Childs D, Guzman-Karlsson MC, Kibe M, Moulden J, Song E, Tahir A, Sweatt. (2013). DNA methylation regulates associative reward learning. *Nature Neurosci* 16: 1445-1452.
- Dickstein DL, Weaver CM, Luebke JI, Hof PR. (2013). Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neurosci* 251: 21-32.
- Dinsmore CJ, Soriano P. (2018). MAPK y PI3K signaling: At the crossroads of neural crest development. *Development Biol* 444: S79-S97.



- Di Lorenzo A, Bedford MT. Histone arginine methylation. *FEBS Lett* 585: 2024-2031.
- Dong HW. (2008). Allen Reference Atlas. A digital color brain atlas of the C57BL/6J male mouse. John Wiley & Sons Inc. China.
- Dos Santos SA G, Rostirola E V, Moysés F, Reck C L, Agustini L C, Rodrigues S I. (2013). Histone deacetylase activity is altered in brain áreas from aged rats. *Neurosci Lett* 556: 152-154.
- Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH, Hof PR. (2003). Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb Cortex* 13: 950-961.
- Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF. (1996). Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neurosci.* 16: 3123–3129.
- Engelmann, M., Hädicke, J., & Noack, J. (2011). Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the nonconditioned social discrimination procedure. *Nature Protocols* 6: 1152–1162.
- Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 852: 208-212.
- Escobar-Rodríguez ML (2008). Capítulo 10. El sustrato celular del aprendizaje y la memoria. En Bermúdez-Rattoni F, Prado-Alcalá R. *Memoria. Dónde reside y cómo se forma* 137-146. México: Editorial Trillas.
- Farrelly LA, Thompson RE, Zhao S, Lepack AE, Lyu Y, Bhanu NV, Zhang B, Loh YE, Ramakrishnan A, Vadodaria KC, Heard KJ, Erikson G, Nakadai T, Bastle RM, Lukasak BJ, Zebroski H 3rd, Alenina N, Bader M, Berton O, Roeder RG, Molina H, Gage FH, Shen L, Garcia BA, Li H, Muir TW, Maze I. (2019). Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIIID binding to H3K4me3. *Nature* 567: 535-539.
- Fernández-García S, Sancho-Balsells A, Longueville S, Hervé D, Gruart A, Delgado-García JM, Alberch J, Giralt A. (2020). Astrocytic BDNF and TrkB regulate severity and neuronal activity in mouse models of temporal lobe epilepsy. *Cell Death Dis* 11: 411.
- Ferrari KJ, Scelfo A, Jammula S, Cuomo A, Barozzi I, Stützer A, Fischle W, Bonaldi T, Pasini D. (2014). Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol Cell* 53: 49-62.
- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. (2011). Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473: 398-402.
- Filion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA. (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol* 26: 169-181.
- Fletcher BR, Hill GS, Long JM, Gallagher M, Shapiro ML, Rapp PR. (2014). A fine balance: regulation of hippocampal Arc/Arg3.1 transcription, translation and degradation in a rat model of normal cognitive aging. *Neurobiol Learn Mem* 115: 58-67.



- Friedman W. (2012). Chapter 29 Growth Factors. In: Basic Neurochemistry. Principles of molecular, cellular and medical neurobiology, 8<sup>th</sup> edition. Edited by: Siegel GJ and Brady ST. Academic Press. USA.
- Fryer RH, Kaplan DR, Kromer LF. (1997). Truncated TrkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 148, 616–627.
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 24: 88-91.
- Fulton SL, Mitra S, Lepack AE, Martin JA, Stewart AF, Converse J, Hochstetler M, Dietz DM, Maze I. (2022). Histone H3 dopaminylation in ventral tegmental area underlies heroin-induced transcriptional and behavioral plasticity in male rats. *Neuropsychopharmacology*.
- Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Zhao Y, Zhao Y, Robertson KD. (2004). DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 544-555.
- Gil J, Ramírez-Torres A, Encarnación-Guevara S. (2017). Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective. *J Proteomics* 150: 297-309.
- Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakakis S, Wagner M, Koch S, Brückl T, Biel M, Carell T. (2010). Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One* 5: e15367.
- Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER. (1986). The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322: 419-422.
- Gogolla N. (2017). The insular cortex. *Curr Biol.* 2017 Jun 19;27(12):R580-R586.
- Gorski JA, Zeiler SR, Tamowski S and Jones KR. (2003). Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci* 23: 6856-6865.
- Gräff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH. (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev* 91: 603-649.
- Grayson JS, Leger M, Piercy C, Adamson L, Harte M, Neill JC. (2015). Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. *Behav Brain Res* 285: 176-193.
- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJJ, Zhou Y, Wang X, Mazitchek R, Bradner JE, DePinho RA, JAenisch R, Tsai LH. (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459: 55-63.
- Gupta S, Kim SY, Artis S, Molfese DL, Schumacher A, Sweatt JD, Paylor RE, Lubin FD. (2010). Histone methylation regulates memory formation. *J Neurosci* 30: 3589-3599.
- Guzmán-Ramos K, Venkataraman A, Morin JP, Osorio-Gómez D, Bermúdez-Rattoni F. (2018). Differential requirement of the novo Arc protein synthesis in the insular cortex and the amygdala for safe and aversive taste long-term memory formation. *Behav Brain Res* 342: 89-93.



- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. (2000). Inhibition of activity-dependent Arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20: 3993-4001.
- Jaworski J, Kalita K, Knapska E. (2018). C-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory. *Acta Neurobiol Exp* 78: 287-296.
- Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. (2010). Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics* 2: 657-669.
- Hawk JD, Florian C, Abel T. (2011). Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. *Learn Mem* 18: 367-370.
- Hyman SE. (2005). Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry*. 162: 1414-1422.
- Intlekofer KA, Berchtold NC, Malvaez M, Carlos AJ, McQuown SC, Cunningham MJ, Wood M and Cotman CW. (2013). Exercise and sodium butyrate transform a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. *Neuropharmacology* 38: 2027-2034.
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. (2011). Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* 333: 1300–1303.
- Joh RI, Palmieri CM, Hill IT, Motamedi M. (2014). Regulation of histone methylation by noncoding RNAs. *Biochim biophys acta* 1839: 1385–1394.
- Jones CL, Ward J, Critchley HD. (2010). The neuropsychological impact of insular cortex lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81: 611-618.
- Kandel E. (2001). Capítulo 62 Aprendizaje y memoria. En Principios de Neurociencia, edited by Eric Kandel, McGraw Hill, pp 1227-1246.
- Kandel E, Pittenger C. (1999). The past, the future and the biology of memory storage. *Phil Trans R Soc Lond* 354: 2027-2052.
- Konopka W, Kiryk A, Novak M, Herwerth M, Rodriguez J, Wawrzyniak M, Kowarsch A, Michaluk P, Dzwonek J, Arnsperger T, Wilczynski G, Merckenschlager M, Theis FJ, Köhr G, Kaczmarek L, Schütz G. (2010). MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J Neurosci* 30: 14835-14842.
- Koppel I, Timmusk T. (2013). Differential regulation of *Bdnf* expression in cortical neurons by class-selective histone deacetylase inhibitors. *Neuropharmacology* 75: 106-115.
- Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR. (2005). Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* 26: 147-170.
- Lepack AE, Werner CT, Stewart AF, Fulton SL, Zhong P, Farrelly LA, Smith ACW, Ramakrishnan A, Lyu Y, Bastle RM, Martin JA, Mitra S, O'Connor RM, Wang ZJ, Molina H, Turecki G, Shen L, Yan Z, Calipari ES, Dietz DM, Kenny PJ, Maze I. (2020). Dopaminylation of histone H3 in ventral tegmental area regulates cocaine seeking. *Science* 368: 197-201.
- Lessman V, Brigadski T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. *Neurosci Res* 65: 11-22.



- Levenson JM, O’Riordan J, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt D. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 39: 40545-40559.
- Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, Sweatt JD. (2006). Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 281: 15763-15773.
- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J. P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S. Y., & Almouzni, G. (2009). The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO reports* 10: 769–775.
- Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD. (2008). Epigenetic regulation of Bdnf gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 28: 10576-10586.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14: 433-445.
- Ma L, Wang DD, Zhang TY, Yu H, Huang Y, Huang SH, Lee FS and Chen ZY. (2011). Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation. *J Neurosci* 31: 2079-2090.
- Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinoza III R, Ip NY, Belluscio L, de la Monte SM, Squinto S, Furth ME, Yancopoulos GD. (1991). Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: Gene structures, distributions, and chromosomal localizations.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA. (2008). Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci* 11: 131-133.
- Marmorstein R, Zhou MM. (2014). Writers and readers of histone acetylation: Structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6: a018762.
- Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE. (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity dependent Bdnf gene regulation. *Science* 302: 890-893.
- McGahon BM, Martin DSD, Horrobin DF, Lynch MA. (1999). Age-related changes in LTP and antioxidant defenses are reversed by an  $\alpha$ -lipoic acid-enriched diet. *Neurobiol Aging* 20: 655-664.
- McQuown SC, Barrett RM, MAtheos DP, Post RJ, Rogge GA, Alenghat T, Mullican SE, Jones S, Rusche JR, Lazar MA, Wood MA. (2011). HDAC 3 is critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci* 31: 764-774.
- Mellén M, Ayata P, Dewell S, Kriaucionis S, Heintz N. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* 151: 1417-1430.
- Messaoudi E, Ying SW, Kanhema T, Croll SD, Bramham CR. (2002). Brain derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *J Neurosci* 22: 7453-7461.
- Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dageyte G, da Silva B, Bramham CR. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls LTP consolidation through



- regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus *in vivo*. *J Neurosci* 27: 10445-10455.
- Miller CA, Sweatt JD. (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53: 857-869.
- Minichiello L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature Rev Neurosci* 10: 850-860.
- Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T. (2000). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J Neurosci* 20: 7116-7121.
- Moga DE, Calhoun ME, Chowdhury A, Worley P, Morrison JH, Shapiro ML. (2004). Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses. *Neurosci* 125: 7-11.
- Moore CI; Browning MD; Rose GM. (1993). Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. *Hippocampus* 3 (1): 57-66.
- Moore L, Le T, Fan G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol* 38: 23–38.
- Morgado I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev Neurol* 40: 289-297.
- Münzel M, Globisch D, Brückl T, Wagner M, Welzmler V, Michalakakis S, Müller M, Biel M, Carell T. (2010). Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew Chem Int Ed Engl* 49: 5375-5377.
- Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 65: 322-331.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-9.
- Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D, Katz E, Dixon JM, Harrison DJ, Meehan RR. (2012). Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res* 22: 467-477
- Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 23: 58-61.
- Ni C, Qian M, Geng J, Qu Y, Tian Y, Yang N, Li S, Zheng H. (2020). DNA methylation manipulation of memory genes is involved in sevoflurane induced cognitive impairments in aged rats. *Ageing Neurosci* 12: 211.
- Núñez-Jaramillo L, Reyes-López J, Miranda I. (2014). Sodium butyrate into insular cortex during conditioned taste aversion acquisition delays aversive taste memory extinction. *NeuroReport* 25: 386-390.
- Ohira K, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M. (2006). TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 867-874.
- Pang P, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306: 487-491.



- Papaleo F, Silverman JL, Aney J, Tian Q, Barkan CL, Chadman KK, Crawley JN. (2011). Working memory deficits, increased anxiety-like traits and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. *Learn Mem* 18: 534-544.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninam I, Savas JN, Yates III JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155: 1596-1609.
- Pastor WA, Pape UJ, Huang Y, Henderson HR, Lister R, Ko M, McLoughlin EM, Brudno Y, Mahapatra S, Kapranov P, Tahiliani M, Daley GQ, Liu XS, Ecker JR, Milos PM, Agarwal S, Rao A. (2011). Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature* 473: 394-397.
- Patel TR. (2012). Environmental enrichment: Aging and memory. *Yale J Biol Med* 85: 491-500.
- Peinado MA, del Moral ML, Esteban FJ, Martínez-Lara E, Siles E, Jiménez A, Hernández-Cobo R, Blanco S, Rodrigo J, Pedrosa JA. (2000). Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol* 31: 1054-1065.
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A. (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 328: 753-756.
- Penner MR, Roth TL, Chawla MK, Hoang LT, Roth ED, Lubin FD, Sweatt JD, Worley PF, Barnes CA. (2011). Age-related changes in Arc transcription and DNA methylation within the hippocampus. *Neurobiol Aging* 32: 2198-2210.
- Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Gen Develop* 15: 1613-1618.
- Putiri EL, Tiedemann RL, Thompson JJ, Liu C, Ho T, Choi JH, Robertson KD. (2014). Distinct and overlapping control of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine by the TET proteins in human cancer cells. *Genome Biol* 15: R81.
- Rattan SIS. (2004). Aging, anti-aging, and hormesis. *Mech Ageing Develop* 125: 285-289.
- Reilly S, Bornovalova MA (2005). Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: A critical review. *Neurosci Behav Rev* 29: 1067-1088.
- 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. *Brain Behav Res* 221: 329-332.
- Rial Verde EM, Lee-Osbourne J, Worley PF, Malinow R, Cline HT. (2006). Increased expression of the immediate early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron* 52: 461-474.
- Richter K, Wolf G, Engelmann M. (2005). Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learn Mem* 12: 407-413.
- Richwine AF, Parkin AO, Buchanan JB, Chen J, Markham JA, Juraska JM, Johnson RW. (2008). Architectural changes to CA1 pyramidal neurons in adult



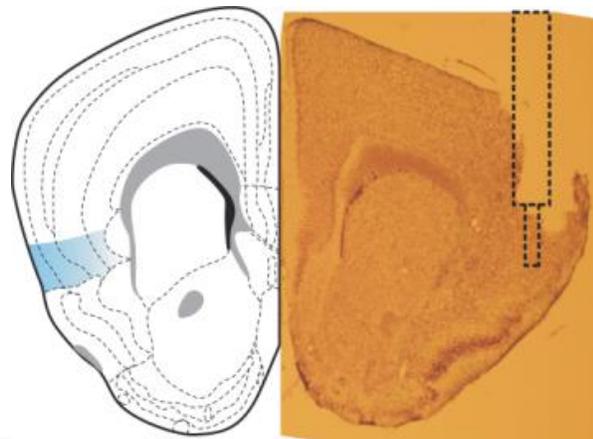
- and aged mice after peripheral immune stimulation. *Psychoneuroendocrinol* 33: 1369-1377.
- Riley AL, Tuck DL. (1985). Conditioned taste aversions: A behavioral index of toxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 443: 272-292.
- Rodríguez JJ, Davies HA, Silva AT, De Souza IE, Peddie CJ, Colyer FM, Lancashire CL, Fine A, Errington ML, Bliss TV, Stewart MG. (2005). Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia. *Eur J Neurosci* 21:2384 –2396.
- Rodríguez-Durán LF, Castillo DV, Moguel-González M, Escobar ML. (2011). Conditioned taste aversión modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiol Learn Mem* 95: 519-526.
- Rodríguez-Ortiz CJ, Prieto GA, Martini AC, Forner A, Trujillo-Estrada L, LaFerra FM, Baglietto-Vargas D, Cotman CW, Kitazawa M. (2020). miR-181<sup>a</sup> negatively modulates synaptic plasticity in hippocampal cultures and its inhibition rescues memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell* 19: e13118.
- Rodríguez-Serrano LM, Ramírez-León B, Rodríguez-Durán LF, Escobar ML. (2014). Acute infusión of brain-derived neurotrophic factor in the insular cortex promotes conditioned taste aversión extinction. *Neurobiol Learn Mem* 116:139-144.
- Rubio N. (1997). Mouse astrocytes store and deliver brain-derived neurotrophic factor using the non-catalytic gp95TrkB receptor. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1847–1853
- SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación.*
- Sartor GC, Malvezzi AM, Kumar A, Andrade NS, Wiedner HJ, Vilca SJ, Janczura KJ, Bagheri A, Al-Ali H, Powell SK, Brown PT, Volmar CH, Foster TC, Zeier Z, Wahlestedt. (2019). Enhancement of BDNF expression and memory by HDAC inhibition requires BET bromodomain reader proteins. *J Neurosci* 23, 612–626.
- Schaefer A, Sampath SC, Intrator A, Min A, Gertler TS, Surmeier DJ, Tarakhovskiy A, Greengard P. (2009). Control of cognition and adaptive behavior by the GLP/G9a epigenetic suppressor complex. *Neuron* 64: 678-691.
- Scharf AN, Imhof A. (2010). Every methyl counts - epigenetic calculus. *FEBS Lett* 585: 2001-2007.
- Scott-Solomon E, Kuruvilla R. (2018). Mechanisms of neurotrophin trafficking via Trk receptors. *Mol Cell Neurosci* 91: 25-33.
- Seto E, Yoshida M. (2014). Erasers of histone acetylation: The histone deacetylases enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6: a018713.
- Shandilya MCV, Gautam A. (2020). Hippocampal Arc induces decay of object recognition memory in male mice. *Neurosci* 431: 193-204.
- Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H. (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450: 908-912.



- Silhol M, Arancibia S, Murice T, Tapia-Arancibia L. (2007). Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neurosci* 146: 962-973.
- Silhol M, Bonnichon V, Rage F, Tapia-Arancibia L. (2005). Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neurosci* 132: 613-624.
- Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, Gaidatzis D, Mohn F, Artus-Revel CG, Zavolan M, Svoboda P, Filipowicz W. (2008). MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 15: 259-267.
- Stefanelli G, Azam AB, Walters BJ, Brimble MA, Gettens CP, Bouchard-Cannon P, Cheng HYM, Davidhoff AM, NArkaj K, Day JJ, Kennedy AJ, Zovkic IB. (2018). Learning and age-related changes in genome-wide H2A.Z binding in the mouse hippocampus. *Cell Reports* 22: 1124-1131.
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21; 741-751.
- Stroud H, Feng S, Morey Kinney S, Pradhan S, Jacobsen SE. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biol* 12: R54.
- Swank MW, Sweatt JD. (2001). 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: 3383-3391.
- Uchida S, Teubner BJW, Hevi C, Hara K, Kobashi A, Dave RM, Shintaku T, Jaikhan P, Yamagata H, Suzuki T, Watanabe Y, Zakharenko SS, Shumyatsky GP. (2017). CRTCL1 nuclear translocation following learning modulates memory strength via exchange of chromatin remodeling complexes on the Fgf1 gene. *Cell Rep* 18: 352-366.
- Wang DC, Chen SS, Lee YC, Chen TJ. (2006). Amyloid-beta at sublethal level impair BDNF-induced Arc expression in cortical neurons. *Neurosci Lett* 398: 78-82.
- Wang W, Kwon EJ, Tsai LH. (2012). MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learn Mem* 19: 359-368.
- Wang WX. (2018). Micromanaging memory. *Biol Psych* 83: 390-392.
- Warburton EC, Brown MW. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav Brain Res* 285: 131-139.
- Wetzell BB, Muller MM, Flax SM, King HE, DeCicco-Skinner K, Riley AL. (2015). Effect of preexposure on methylphenidate-induced taste avoidance and related BDNF/TrkB activity in the insular cortex of rat. *Psychopharmacol* 232: 2837-2847.
- Wu N, Wang F, Jin Z, Zhang Z, Wang LK, Zhang C, Sun T. (2017). Effects of GABAB receptors in the insula on recognition memory observed with intelligence. *Behav Brain Funct* 13: 7.
- Wu SY, Pan BS, Tsai SF, Chiang YT, Huang BM, Mo FE, Kuo YM. (2020). BDNF reverses aging-related microglial activation. *J Neuroinflamm* 17: 210.



- Wu X, Zhang Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Gen* 18: 517–534.
- Xi J, Ma L, Zhang TY, Yu H, Wang Y, Kong L and Chen ZY. (2014). Involvement of BDNF signaling transmission from basolateral amygdala to infralimbic prefrontal cortex in conditions taste aversion extinction. *J of Neurosci* 34: 7302-7313.
- Yamamoto T and Ueji K. (2011). Brain mechanisms of flavor learning. *Front Systems Neurosci* 5: 1-7.
- Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L, Welcher AA. (1997). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neurosci* 78: 431-448.
- Yasuno K, Takahashi E, Igarashi I, Iguchi T, Tsuchiya Y, Kai K, Mori K. (2017). Gene expression analysis of Arc mRNA as a neuronal cell activity marker in the hippocampus and amygdala on two-way active avoidance test in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 88: 140-146.
- Yin SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TVP, Bramham CR. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci* 22: 1532-1540.
- Yu NK, Baek SH, Kaang BK. (2011). DNA methylation-mediated control of learning and memory. *Mol Brain* 4: 5.
- Zhao Y, Garcia BA. (2015). Comprehensive catalog of currently documented histone modifications. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a025064.
- Zhao S, Chuh KN, Zhang B, Dul BE, Thompson RE, Farrelly LA, Liu X, Xu N, Xue Y, Roeder RG, Maze I, Muir TW, Li H. (2021). Histone H3Q5 seronylation stabilizes H3K4 methylation and potentiates its readout. *Proc Natl Acad Sci USA* 118: e2016742118.
- Zhou T, Xiong J, Wang M, Yang N, Wong J, Zhu B, Xu RM. (2014). Structural basis for hydroxymethylcytosine recognition by the SRA domain of UHRF2. *Mol Cell* 54: 879-886.
- Zovkic IB, Paulukaitis BS, Day JJ, Etikala DM, Sweatt D. (2014). Histone H2A.Z subunit exchange controls consolidation of recent and remote memory. *Nature* 515: 582-586.



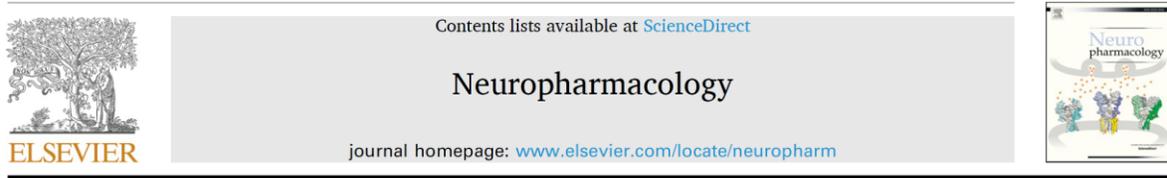
## 11. Anexos



## 11.1 Publicación

Como producto principal de los estudios de posgrado, se realizó la siguiente publicación:

[Neuropharmacology 187 \(2021\) 108493](#)



### Class I HDAC inhibition improves object recognition memory consolidation through BDNF/TrkB pathway in a time-dependent manner

Gerardo Ramírez-Mejía<sup>a</sup>, Elvi Gil-Lievana<sup>a</sup>, Oscar Urrego-Morales<sup>a</sup>, Ernesto Soto-Reyes<sup>b</sup>, Federico Bermúdez-Rattoni<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México

<sup>b</sup> Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, 05348, Ciudad de México

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

HDAC inhibitor  
Consolidation  
BDNF  
TrkB  
Object recognition memory

#### ABSTRACT

There is increasing evidence showing that HDACs regulates BDNF (brain-derived neurotrophic factor) expression through its interaction with the *Bdnf* gene promoter, a key regulator to consolidate memory. Although the nuclear mechanisms regulated by HDACs that control BDNF expression have been partially described recently, the temporal events for memory consolidation remain unknown. Hence, in this work, we studied the temporal pattern for the activation of the BDNF/TrkB pathway through class I HDAC inhibition to enhance object recognition memory (ORM) consolidation. To this end, we inhibited class I HDAC into the insular cortex (IC) and a weak ORM protocol was used to assess temporal expression and function of the BDNF/TrkB pathway in the IC. We found that cortical class I HDAC inhibition enhanced long-term ORM, coincident with a clear peak of BDNF expression at 4 h after acquisition. Furthermore, the tyrosine kinase B (TrkB) receptor blockade at 4 h, but not at 8 h, impaired the consolidation of ORM. These results suggest that histone acetylation regulates the temporal expression of BDNF in cortical circuits potentiating the long-term recognition memory.

#### 1. Introduction

Memory consolidation is the process in which newly acquired, fragile information is integrated and stabilized into long-term memory (McGaugh, 2000). To this end, stimuli entrance during learning process drives activation of signaling pathways into neuronal circuits to induce different epigenetic mechanisms, such as histone acetylation to promote gene expression and *de novo* protein synthesis, a pivotal mechanism for memory consolidation (Levenson and Sweatt, 2005, 2006; Day and Sweatt 2011; Jarome and Helmstetter, 2014). Moreover, the strength of stimuli determines the neuronal activity including, neurotransmitter release, signaling pathways activation and firing rate that regulates histones acetylation turnover (Uchida et al., 2017; Tyssowski et al., 2018). It has been reported that expression of several memory-related genes is regulated by histones acetylation/deacetylation mechanisms. Two main enzymes participate in this process: histone acetyltransferase (HAT) that acetylates the N-terminal domain of histones to relax chromatin and promote gene expression. Contrarily, histone deacetylase (HDAC) removes acetyl groups from the N-terminal domains,

suppressing gene expression (Marmonstein and Zhou, 2014; Seto and Yoshida, 2014). HDACs are classified into four different groups: class I (including HDAC1, 2, 3, and 8), II (HDAC4-7, 9, and 10), III (Sirt1-7), and IV (HDAC11), but recently class I HDACs seem to be relevant for memory processes (Guan et al., 2009; McQuown et al., 2011; Bahari et al., 2012). It has been demonstrated that HDACs activity depends on the strength of the stimuli and its inhibition boosts histone acetylation after training to consolidate long-term memory (LTM; Peleg et al., 2010; Uchida et al., 2017). In this regard, HDACs activity negatively regulates memory consolidation and synaptic plasticity (Guan et al., 2009; Gräff and Tsai 2013). Although systemic and intracerebral administration of unspecific HDAC inhibitors does not affect consolidation of behavioral tasks in strong training (Bahari-Javan et al., 2012; Núñez-Jaramillo et al., 2013), it enhances the consolidation of weak object recognition memory (ORM) through chromatin relaxation to induce gene expression and protein synthesis (Stefanko et al., 2009; Roozendaal et al., 2010; Hawk et al., 2011; Chen et al., 2018). Studies report ORM, an IC-dependent task, as a reliable behavioral model to study molecular events associated with memory enhancement without altering the motivational component (food or water deprivation, reward and

\* Corresponding author. Laboratory BL-201, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México.

E-mail address: [fbermude@ifc.unam.mx](mailto:fbermude@ifc.unam.mx) (F. Bermúdez-Rattoni).

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108493>

Received 19 August 2020; Received in revised form 26 January 2021; Accepted 5 February 2021

Available online 11 February 2021

0028-3908/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

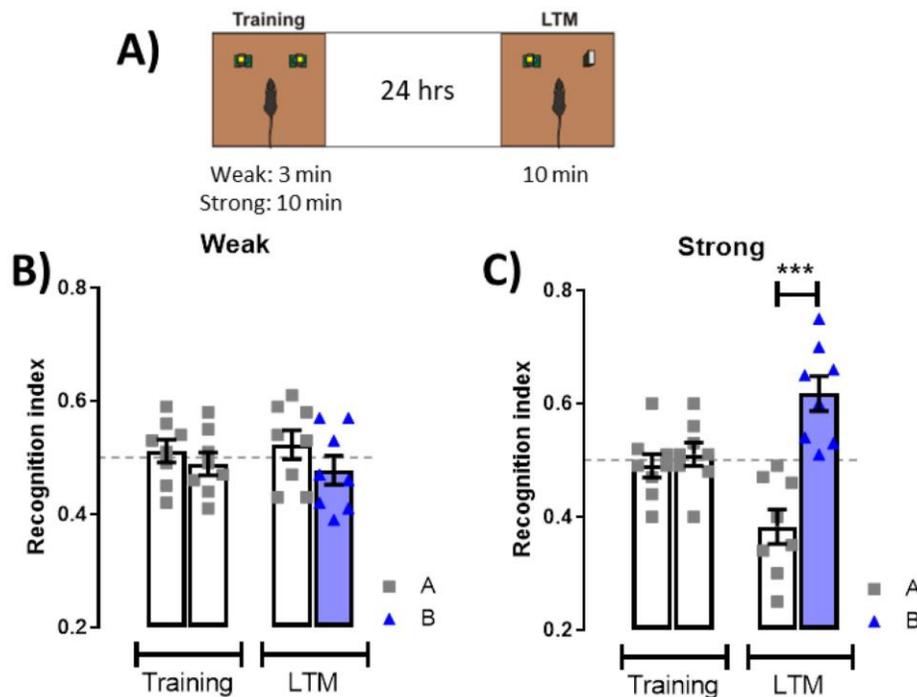


**Abbreviations**

HAT	histone acetyltransferase
HDAC	histone deacetylase
ORM	object recognition memory
LTM	long-term memory
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BRD4	bromodomain-containing protein 4
IC	insular cortex
BSA	bovine serum albumin
DMSO	dimethyl sulfoxide
PVDF	polyvinylidene difluoride
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

In this regard, it was reported that bromodomain-containing protein 4 (BRD4) increases its binding to the *Bdnf* gene promoter to induce BDNF expression enabling memory consolidation (Sartor et al., 2019). However, the fundamental questions remain regarding whether and when BDNF participates in enhancing memory consolidation process.

In this work, our objective was to evaluate whether the enhancement of temporal expression of BDNF would facilitate a long-term ORM through class I HDAC inhibition. Therefore, we inhibited cortical class I HDAC with an injection of MS-275 before a weak training ORM task to enhance memory consolidation and to evaluate the temporal expression of BDNF in the insular cortex (IC), a brain area for consolidating the recognition memory (Balderas et al., 2008; Beldjoud et al., 2015; Bermúdez-Rattoni, 2014). Our results showed improved memory consolidation and a reliable peak of BDNF expression at four but not 8 h after the acquisition. In addition, to corroborate the functional significance of this BDNF expression, we administrated a TrkB receptor inhibitor at 4 h



**Fig. 1. Long-term ORM depends on the strength of training.** A) Diagram of weak and strong ORM. B) Mice ( $n = 8$ ) were trained with two identical objects (A) for 3 min single session and 24 h later, long-term memory (LTM) was tested with a familiar object (A) and a novel object (B) for 10 min. One-way ANOVA showed that mice did not show long-term recognition memory differences,  $F(3,28) = 13.46$ ;  $P = 0.4969$ . C) Mice ( $n = 8$ ) were trained for 10 min with two identical objects (A) single session and 24 h later, LTM was tested for with a familiar object (A) and a novel object (B) for 10 min. Mice showed LTM; with one-way ANOVA  $F(3,28) = 13.46$ ;  $P < 0.0001$ ; Bonferroni post-hoc test LTM object A vs LTM object B  $t(28) = 6.331$ .  $***P < 0.0001$ .

anxiety) (Bermúdez-Rattoni et al., 2005; Balderas et al., 2008, 2015; Blaser and Heyser, 2015; Grayson et al., 2015).

Previous reports have shown a direct interaction between HDACs activity and the brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*) gene promoter (Martinowich et al., 2003; Lubin et al., 2008). The BDNF is a key regulator of synaptic plasticity, dendritic growth, neuronal survival and consolidation of memory (Tyler et al., 2001; Bekinschtein et al., 2007; Ma et al., 2011; Radiske et al., 2017). Thereby, BDNF blockade or inhibition of its specific tyrosine kinase B (TrkB) receptor impair synaptic plasticity and memory consolidation (Alonso et al., 2005; Bekinschtein et al., 2007, 2008; Callaghan and Kelly, 2013; Rosas-Vidal et al., 2018).

and 8 h after a weak training ORM task with MS-275. The results showed that the inhibition of the TrkB receptor impaired memory consolidation when administered at 4 h but not at 8 h. These results suggest a critical time window of the BDNF/TrkB pathway through which class I HDAC inhibition enhances ORM consolidation.

**2. Materials and methods**

**2.1. Animals**

Two-month-old (25–30 g bodyweight) female and male C57BL6/J



**Table 1**

**Total exploration times during long-term memory (LTM).** All data are shown as mean  $\pm$  SEM. **A)** Total exploration times for weak and strong training from Fig. 1. **B)** Total exploration times for vehicle and MS-275 groups from Fig. 3. **C)** Total exploration times for vehicle and K252a at 4 and 8 h groups from Fig. 5.

A)	
Group	LTM
Weak training	14.42 $\pm$ 3.39
Strong training	12.98 $\pm$ 2.724
B)	
Group	LTM
Vehicle	17.70 $\pm$ 3.131
MS-275	11.82 $\pm$ 1.985
C)	
Group	LTM
Vehicle - 4 h	23.86 $\pm$ 6.172
K252a - 4 h	18.36 $\pm$ 2.917
Vehicle - 8 h	24.08 $\pm$ 5.544
K252a - 8 h	11.29 $\pm$ 3.718

mice were used for all experiments (sex differences were not observed for behavioral results, figure S1). Mice were housed individually at 18–22 °C, 50–55% humidity, under a 12:12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. All experiments were conducted during the light period of the cycle. All experiments were approved by Instituto de Fisiología Celular (FBR125-18) and complied with the Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1999).

## 2.2. Drugs

HDAC inhibitor MS-275 (EPS002, Sigma-Aldrich) was stored at –20 °C in stock solution at 10.84 mM dissolved in dimethyl sulfoxide, DMSO (D8779, Sigma-Aldrich). MS-275 stock solution was diluted to 3.04 mM with 0.9% saline solution before intra-IC microinfusions. Vehicle solution had the same concentration of DMSO. The TrkB receptor inhibitor, K-252a (K-150, Alomone Labs), was stored at –20 °C in stock solution dissolved in 100  $\mu$ M DMSO. K-252a stock solution was diluted to 25  $\mu$ M with 0.9% saline solution before intra-IC microinfusions. Vehicle solution had the same concentration of DMSO.

## 2.3. Stereotaxic surgery and microinfusions

Mice were anesthetized with 1–1.5% isoflurane (VETone Fluriso™; Matrix VIP 3000, Midmark) and placed in a stereotaxic apparatus (51,603, Stoelting) with an incisive adapter for mice (923-B, KOPF instruments). A small incision in the scalp was made and the head position was adjusted to a horizontal plane. Bilateral 23-gauge stainless steel cannulas (8 mm long, Small Parts, USA) were implanted into IC (AP: +1.4 mm; ML:  $\pm$ 3.3 mm; DV: 3.0 mm). The cannulas were anchored with dental adhesive and dental acrylic cement. Stylets were inserted into guide cannulas to prevent clogging. Mice were allowed to recover for 12 days before behavioral procedures.

Microinfusions were performed with a 30-gauge infusion needle (4000-74-BX, Monoject™) extended 1.0 mm from the tip of the guide cannula. The microinfusion needle was connected through polyethylene tubing to a 10  $\mu$ l Hamilton microsyringe driven by a microinfusion pump (Cole Parmer Instruments). Intra-IC microinfusions consisted of 0.5  $\mu$ l per hemisphere at a rate of 0.25  $\mu$ l/min and 1 min for diffusion.

## 2.4. Object recognition memory (ORM)

Apparatus consisted of a wooden square arena (33 cm  $\times$  33 cm  $\times$  30 cm) coated with enamel paint, covered with a thin sawdust layer and a rectangular black and white striped cue. The objects to be discriminated were different Lego™ figures with dimensions 3.0 cm  $\times$  5.0 cm  $\times$  4.5 cm. During three consecutive days, mice were handled for 1 min and immediately after, mice were positioned into the arena without any

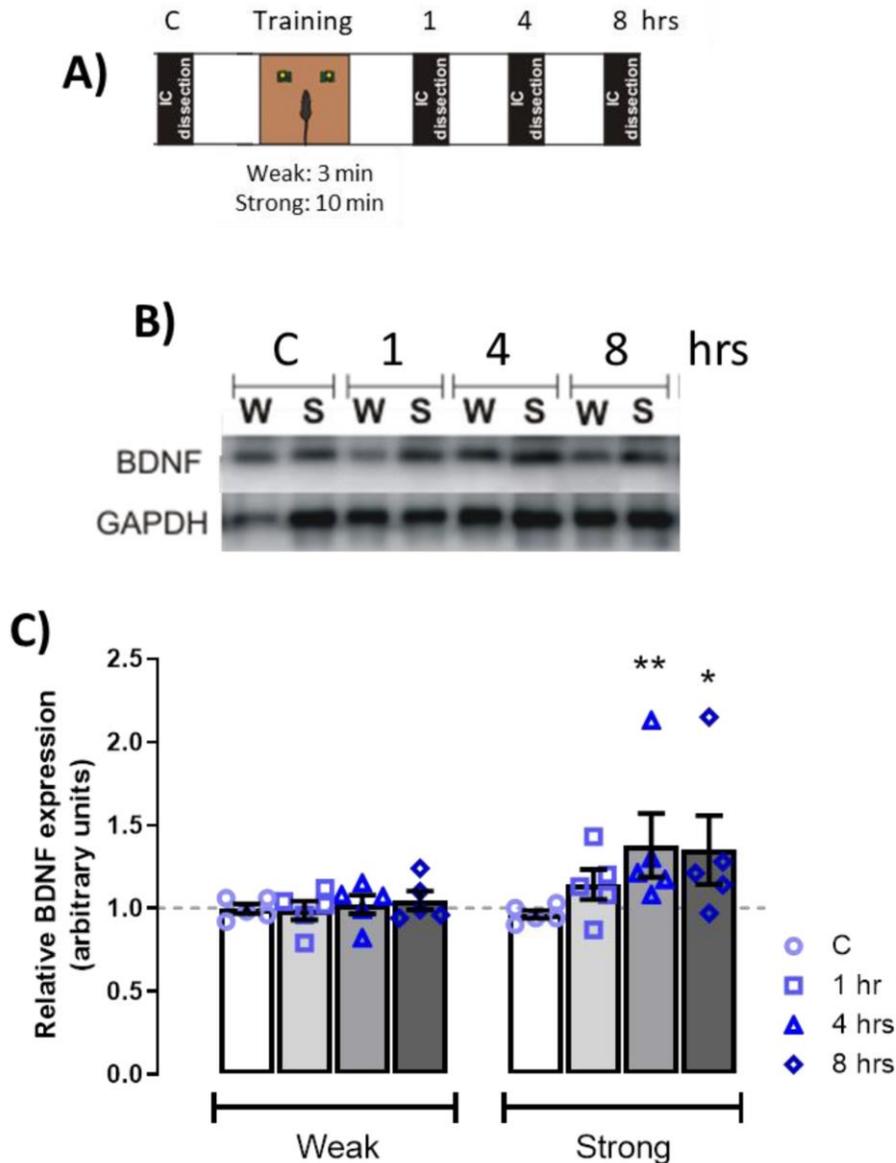
object for 5 min (habituation). During the training phase, mice were placed into the arena with two identical objects (A). The distance between objects was 15 cm. Mice were allowed to explore the objects for 3 min (weak training) or 10 min (strong training). Twenty-four hours later, the long-term memory (LTM) test was performed. For LTM test, the mice were placed into the arena with a familiar object (A) and a novel object (B). Mice were allowed to explore objects for 10 min. Arena and objects were cleaned between trials with 70% ethanol to avoid odor cues. A video camera was mounted above the apparatus to record trials with Debut Video Capture-NCH computer software version 5.73. Each object exploration time was quantified offline with the BORIS software (Friard and Gamba, 2016). 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 recognition index was calculated by dividing the exploration time of object A or B by the total exploration time (A + A or A + B). Mice with a recognition index limits at 0.4 or 0.6 during the training phase were included for all experiments.

## 2.5. Immunoblotting

For timeline gene expression, a control group (C, n = 5 weak, n = 5 strong) was sacrificed 24 h after the last habituation. Different groups of mice were sacrificed after training, sham mice were sacrificed at 1 (n = 5 weak, n = 5 strong), 4 (n = 5 weak, n = 5 strong), and 8 (n = 5 weak, n = 5 strong). For the class I HDAC inhibition experiments, a control group (C) of mice were injected with vehicle (n = 7) and another group with MS-275 (n = 7) into IC and immediately sacrificed. Mice were injected with vehicle or MS-275 1 h before weak training and sacrificed at 1 (n = 7 vehicle, n = 7 MS-275), 4 (n = 7 vehicle, n = 7 MS-275), 8 (n = 7 vehicle, n = 7 MS-275) hours after weak training. IC was dissected and stored at –20 °C until homogenization. Tissues were sonicated (Branson Sonifier 250) in ice-cold lysis buffer containing: 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 12 mM sodium deoxycholate, 3.5 mM sodium dodecyl sulfate, 1.6 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl, 16.5 mM Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate (all purchased from Sigma-Aldrich), with cOmplete™ protease inhibitor Cocktail (11,697,498,001, Roche). The homogenated solutions were centrifuged at 12,500 rpm for 20 min at 4 °C (Hermle Z 233 MK-2). The supernatants were collected and used to quantify total protein by Bradford's method (5,000,006, Bio-Rad). For BDNF and H4K12ac analysis, all samples were adjusted to 30  $\mu$ g of total protein. Electrophoresis was performed in 12% acrylamide gels, 85 V, 2 h. Transference was performed at 100 V, 1 h to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immun-Blot®, Bio-Rad). PVDF membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in trizma buffer solution added with triton (TBST; 150 mM NaCl, 100 mM trizma base, 0.1% triton X-100; all purchased from Sigma-Aldrich) and incubated overnight with primary antibodies anti-H4K12ac (1:1000, rabbit, Abcam, ab-61238), anti-BDNF (1:500, rabbit, ANT-010, Alomone Labs) or anti-GAPDH (1:1000, rabbit, Sigma, G9545). After primary antibody incubation, membranes were incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit (1:5000, Invitrogen, 656,120). All antibodies were incubated in 3% BSA in TBST. Bands were developed using Immobilon™ Western chemiluminescent HRP substrate (WBKLS; Millipore) and visualized on C-Digit® blot scanner (LI-COR). Densitometry was performed using Image-J software (NIH, Bethesda). BDNF and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) densities were obtained by quantifying the area percentage occupied by the band. Relative expression was calculated by the division of BDNF density by GAPDH density and adjusted to the control.

## 2.6. Nissl stain

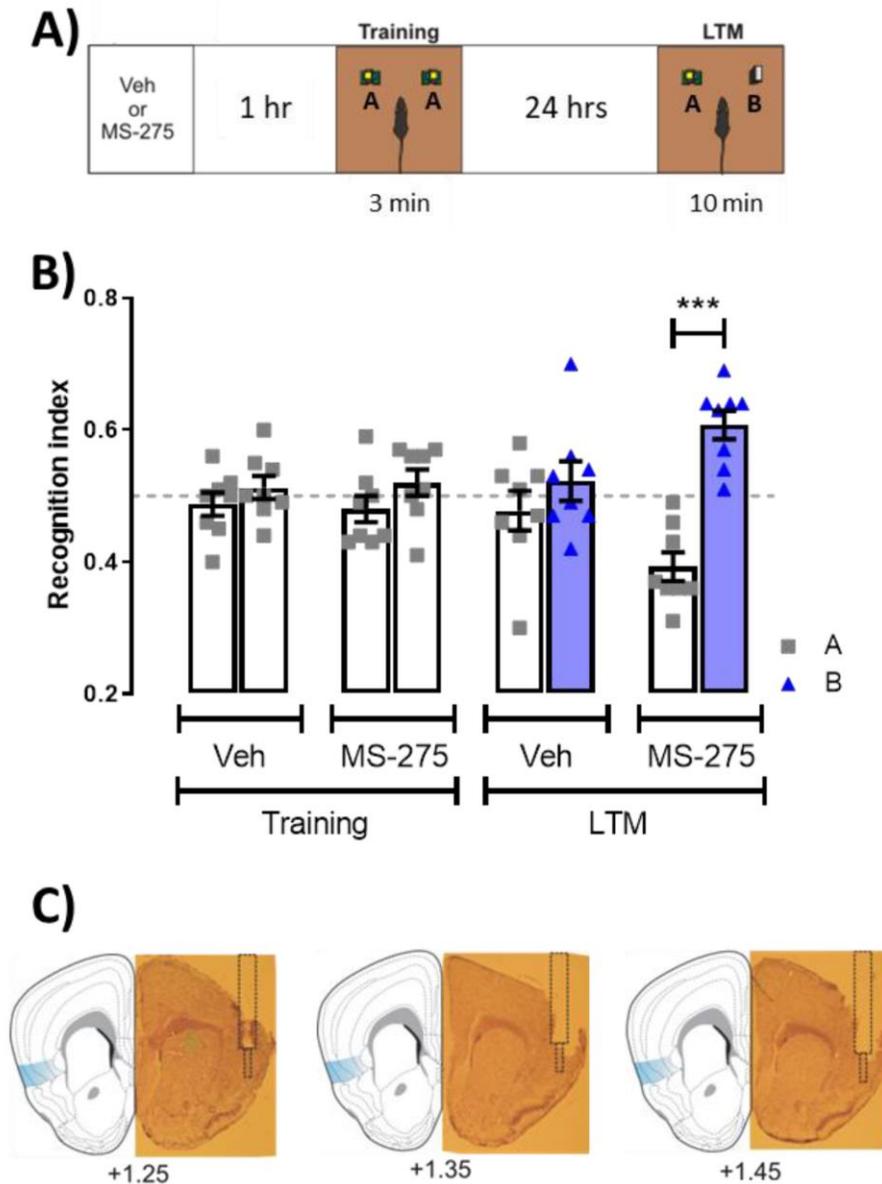
After the LTM test, mice were sacrificed with an overdose of intraperitoneal pentobarbital monosodium (100 mg/kg). Intracardial perfusion was performed with isotonic saline solution and pre-fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer solution. Brains were



**Fig. 2.** BDNF expression depends on the strength of training. **A)** Diagram of weak and strong training and post-training times for total protein samples from insular cortex (IC). **B)** Representative immunoblots for BDNF and GAPDH. **C)** Immunoblot analysis of BDNF at 0 h (control, C, n = 5), 1 h (n = 5), 4 h (n = 5), 8 h (n = 5) after weak (w) or strong (s) training. Weak training did not induce increments in BDNF expression, whereas strong training increased BDNF expression at 4 h post-training session. Two-tailed Mann-Whitney test control (C) weak vs 1 h weak U = 12.50, P > 0.9999; control (C) weak vs 4 h weak U = 7.00, P = 0.2778; control (C) vs 8 h weak U = 9.50, P = 0.5952; control (C) strong vs 1 h strong U = 5.00, P = 0.1349; control (C) strong vs 4 h strong U = 0.00, P = 0.0079; control (C) strong vs 8 h strong U = 2.00, P = 0.0317. Relative expression was calculated by dividing the brain derived neurotrophic factor (BDNF) density by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) density. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*\*P < 0.01, \*P < 0.05.

removed and fixed in a 4% paraformaldehyde solution and stored for 1 week. Brains were treated with 30% sucrose at least 2 days before slicing. Brains were sliced using a cryostat (Leica, CM1520) in 40  $\mu$ m section and mounted on gelatin coated microscope slides. Slices were stained with modified Nissl protocol, briefly: hydration with decreasing ethanol concentration solutions, from 90% to distilled water. Slices were immersed in cresyl violet acetate (0.5% cresyl violet acetate, 0.3%

glacial acetic acid in distilled water) per 2 min; stain excess was washed with distilled water following immersions in 50% ethanol per 1 min. After that, slices were washed with ethanol acid (1% glacial acetic acid in 70% ethanol) for 2 min. Finally, slices were dehydrated and mounted with a resin mounting medium.



**Fig. 3.** Class I HDAC inhibition into IC promotes LTM of ORM. **A)** Diagram of microinfusions with vehicle or MS-275 into IC 1 h before mice were trained with two identical objects (A) for 3 min single session. Twenty-four hours later, long-term memory (LTM) was tested with a familiar object (A) and a novel object (B) for 10 min. **B)** MS-275 mice ( $n = 8$ ) showed LTM but vehicle mice ( $n = 8$ ) did not. **C)** Diagram of the implantation site of cannulas into IC. One-way ANOVA  $F(7,56) = 6.983$ ,  $P < 0.0001$ ; Bonferroni post-hoc test for MS-275 mice, object A vs object B  $t(56) = 6.691$ ,  $**P < 0.0001$ .

### 2.7. Statistical analysis

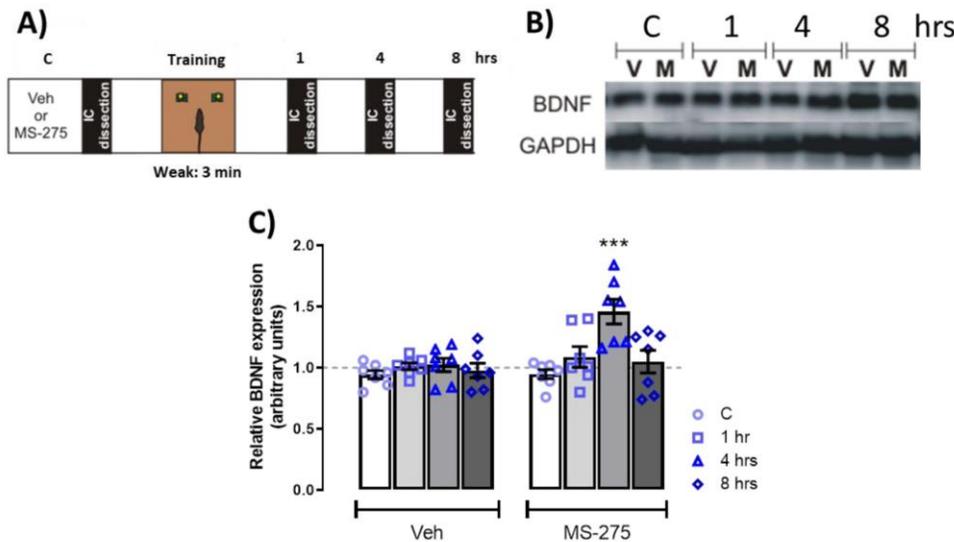
For behavioral and biochemical experiments, we used the minimum sample necessary to obtain a mean and standard deviation required for a Cohen's  $d$  parameter equals or greater than 0.8 (Lakens, 2013). Data were analyzed using GraphPad Prism software version 8.0. The Kolmogorov-Smirnoff test was performed for normal distribution. Data were plotted as mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA was used with Bonferroni's post hoc test for behavioral analysis, and a two-tailed Mann

Whitney test was performed for immunoblot analysis. In all statistical analysis  $P < 0.05$  threshold was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Strong but not weak training increases BDNF expression

To assess the effect of training strength on memory consolidation, we used a weak and strong training ORM task by modifying the exposure



**Fig. 4.** Class I HDAC inhibition into IC increases BDNF expression. **A)** Diagram of microinfusions with vehicle or MS-275 into IC 1 h before weak ORM training and post-training time dissections. **B)** Representative immunoblots for BDNF, and GAPDH. **C)** Immunoblot analysis of BDNF for vehicle (V) or MS-275 (M) mice immediately after IC injection (control, C, n = 7 vehicle, n = 7 MS-275), 1 h (n = 7 vehicle, n = 7 MS-275), 4 h (n = 7 vehicle, n = 7 MS-275), 8 h (n = 7 vehicle, n = 7 MS-275) after weak training with MS-275 or Veh injections. Weak training with MS-275 but not vehicle induces significant increments in BDNF expression in MS-275 mice at 4 h post-training session. Two-tailed Mann-Whitney test: control (C) vehicle vs 1 h vehicle U = 13.50, P = 0.1742; C vehicle vs 4 h vehicle U = 14, P = 0.2086; C vehicle vs 8 h vehicle U = 22, P = 0.7803; C MS-275 vs 1 h MS-275 U = 15.50, P = 0.2733; C MS-275 vs 4 h MS-275 U = 0.00, P = 0.0006; C MS-275 vs 8 h MS-275 U = 19, P = 0.5350. Relative expression was calculated by dividing the BDNF density by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) density. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*\*\*P < 0.001.

time to the objects (Fig. 1A). Mice exposed for 3 min to objects in the sample phase (weak training) did not show long-term recognition memory one-way ANOVA  $F(3,28) = 0.8141$ ;  $p = 0.4969$  (Fig. 1B). Mice exposed for 10 min to the objects in the sample phase (strong training) established a reliable long-term recognition memory, one-way ANOVA  $F(3,28) = 13.46$ ;  $P < 0.0001$ , Bonferroni post-hoc test LTM object A vs LTM object B  $t(28) = 6.331$   $P < 0.0001$  (Fig. 1C). Mice in strong training had a higher exploration time ( $17.92 \pm 5.094$ ) than mice in weak training ( $5.516 \pm 1.718$ ), while total exploration times during LTM were similar (Table 1). Given these differences between weak and strong long-term memory training, we decided to analyze the timeline BDNF expression after weak and strong training ORM task (Fig. 2A). Representative immunoblots for BDNF and GAPDH are shown in Fig. 2B. Weak training did not induce increases in BDNF expression over time (Two-tailed Mann-Whitney test: control (C) vs 1 h U = 12.50,  $P > 0.9999$ ; C vs 4 h U = 7.00,  $P = 0.2778$ ; C vs 8 h U = 9.50,  $P = 0.5952$ ), while strong training increased BDNF expression at 4 h, but not at 8 h after the training session (Fig. 2C; Two-tailed Mann-Whitney test: control (C) vs 1 h U = 5.00,  $P = 0.1349$ ; C vs 4 h U = 0.00,  $P = 0.0079$ ; C vs 8 h U = 2.00,  $P = 0.0317$ ). Accordingly, weak recognition memory does not increase BDNF expression. Therefore, BDNF expression is dependent on the strength of training.

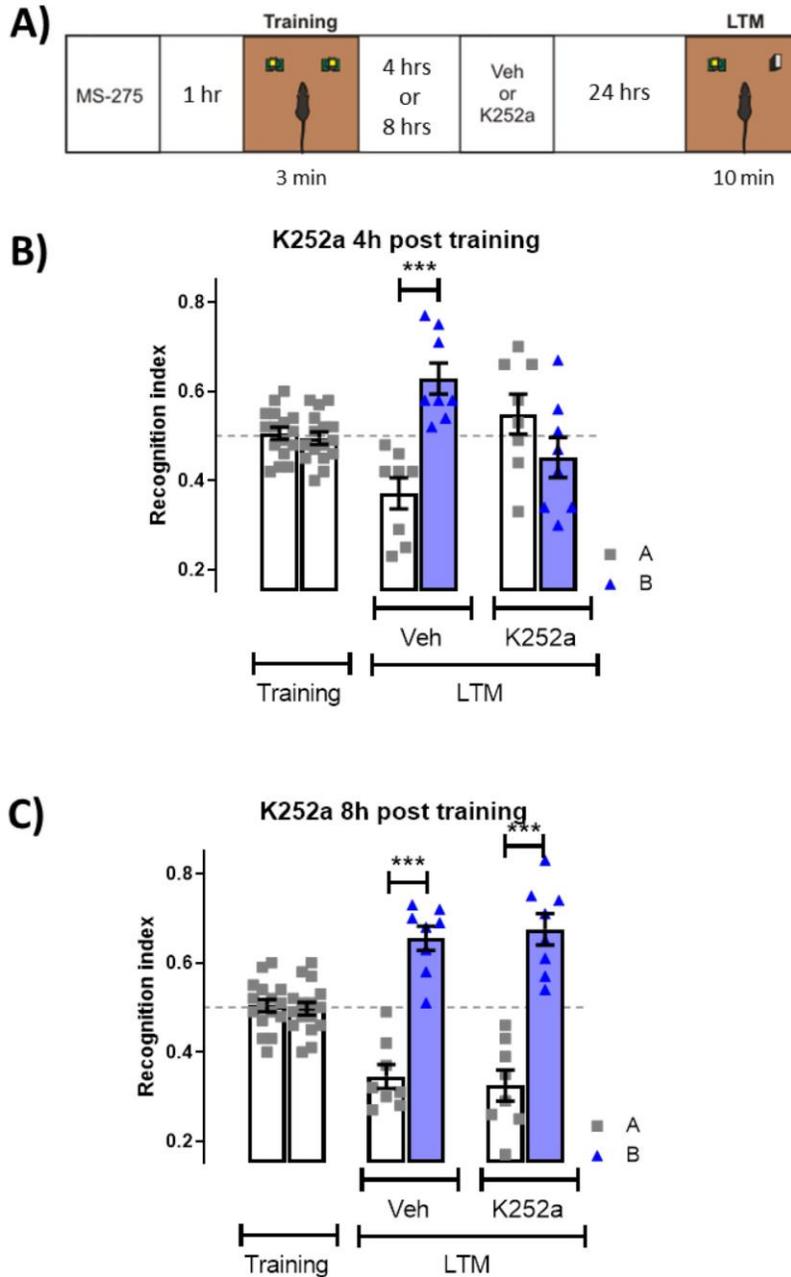
### 3.2. HDAC inhibition enhances BDNF expression and facilitates long-term ORM

As BDNF expression is regulated through HDAC activity (Martinovich et al., 2003), we evaluated the effect of the class I HDAC inhibition with MS-275 on a weak training ORM task (see Fig. 3A). Fig. 3B shows that class I HDAC inhibition enables the establishment of long-term ORM (one-way ANOVA  $F(7,56) = 6.983$ ;  $P < 0.0001$ , Bonferroni post-hoc test LTM vehicle object A vs LTM vehicle object B  $t(56) = 1.4$   $P > 0.9999$ ; LTM MS-275 object A vs LTM MS-275 object B  $t(56) = 6.691$

$P < 0.0001$ ), being similar to strong training. However, the possibility that class I HDAC inhibition could increase the total exploration times during training was discarded since both groups showed similar exploration times during both training (vehicle group  $8.611 \pm 1.258$ ; MS-275 group  $6.801 \pm 1.231$ ) and LTM test (Table 1). To corroborate the IC's microinfusion site, we performed the Nissl staining, as shown in Fig. 3C. Given the similarities between behavioral effects in strong and weak ORM with class I HDAC inhibition, we tested the effect of class I HDAC inhibition with MS-275 on the timeline BDNF expression in a weak ORM training task (Fig. 4A). To confirm the pharmacological effects of MS-275 on class I HDAC, we used H4K12ac as a signal reporter (Figure S2). Fig. 4B shows the representative immunoblots for BDNF and GAPDH at different times after class I HDAC inhibition. The increase of BDNF expression (Fig. 4C) at 4 h after weak training ORM task as a consequence of class I HDAC inhibition (two-tailed Mann-Whitney test: control (C) vehicle vs 1 h vehicle U = 13.50,  $P = 0.1742$ ; C vehicle vs 4 h vehicle U = 14,  $P = 0.2086$ ; C vehicle vs 8 h vehicle U = 22,  $P = 0.7803$ ; C MS-275 vs 1 h MS-275 U = 15.50,  $P = 0.2733$ ; C MS-275 vs 4 h MS-275 U = 0.00,  $P = 0.0006$ ; C MS-275 vs 8 h MS-275 U = 19,  $P = 0.5350$ ). Thus, class I HDAC inhibition into IC promotes BDNF expression and long-term ORM establishment through increased histones acetylation.

### 3.3. TrkB receptor antagonist impair long-term ORM in a time-dependent manner

Activation of the TrkB receptor by BDNF has been shown to induce synaptic plasticity, enhance synaptic transmission and long-term potentiation, which are mechanisms associated with memory consolidation (Gorski et al., 2003; Bekinschtein et al., 2007). Since class I HDAC inhibition increased BDNF expression at four and 8 h, we decided to inject a TrkB receptor inhibitor (K252a) into IC at 4 h and 8 h after a weak training ORM task with class I HDAC inhibition (Fig. 5A). Intra-IC administration of K252a at 4 h impairs the establishment of long-term



**Fig. 5.** Post-training administration of K252a blocks the improving effects of class I HDAC inhibition on ORM. **A)** Diagram of microinfusions with MS-275 into IC 1 h before mice were trained with two identical objects (A) for 3 min training session. Vehicle or K252a was microinfused into IC 4 h or 8 h post-training and 24 h later, LTM was tested with a familiar object (A) and a novel object (B) for 10 min. **B)** K252a group ( $n = 8$ ) at 4 h showed impairment on LTM, while vehicle group ( $n = 8$ ) established a reliable LTM. One-way ANOVA  $F(5,58) = 7.876$ ;  $P < 0.0001$ ; Bonferroni post-hoc object A vehicle vs object B vehicle  $t(58) = 5.86$   $P < 0.0001$ ; object A K252a vs object B K252a  $t(58) = 2.219$   $P = 0.4563$ . **C)** K252a group ( $n = 8$ ) and vehicle group ( $n = 8$ ) at 8 h established a strong LTM. One-way ANOVA  $F(5,58) = 32.37$ ;  $P < 0.0001$ ; Bonferroni post-hoc object A vehicle vs object B vehicle  $t(58) = 8.433$   $P < 0.0001$ ; object A K252a vs object B K252a  $t(58) = 9.521$   $P < 0.0001$ . All data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $P < 0.001$ .

ORM, while the vehicle group established a long-term ORM (Fig. 5B; one-way ANOVA  $F(5,58) = 7.876$ ;  $P < 0.0001$ ; Bonferroni post-hoc object A vehicle vs. object B vehicle  $t(58) = 5.86$   $P < 0.0001$ ; object A K252a vs object B K252a  $t(58) = 2.219$   $P = 0.4563$ ). Conversely, intra-IC administration of K252a at 8 h did not impede long-term ORM, similar to the vehicle group (Fig. 5C; one-way ANOVA  $F(5,58) = 32.37$ ;  $P < 0.0001$ ; Bonferroni post-hoc object A vehicle vs. object B vehicle  $t(58) = 8.433$   $P < 0.0001$ ; object A K252a vs. object B K252a  $t(58) = 9.521$   $P <$

$0.0001$ ). The possibility that MS-275 injections could affect the total exploration times was discarded since 4 and 8 h groups showed similar exploration times during training (4 h group:  $9.237 \pm 1.570$ ; 8 h group:  $7.165 \pm 1.326$ ). Exploration times during the LTM test are shown in Table 1. Interestingly, the effect of K252a at 4 h on the weak training ORM task matches with the maximum peak of BDNF expression observed during the weak training ORM with MS-275 and strong training ORM. Hence, BDNF activity through the TrkB receptor at 4 h,



but not 8 h, is necessary to establish a long-term ORM.

#### 4. Discussion

Decades of research suggest that establishing long-term memories depend on the strength of training (number, duration, or intensity of the stimuli) (Miller, 2013). Moreover, these strength-training conditions determine the neuronal activity to enable signaling pathways and epigenetic mechanisms that permit memory consolidation (Levenson et al., 2004; Uchida et al., 2017). HDACs activity relies on the strength of the stimuli and its activity impacts the capacity to form long-term memories (Guan et al., 2009; Stefanko et al., 2009; Hawk et al., 2011; Gräff and Tsai 2013). In this sense, HDACs maintain the chromatin into a repressive state and silence gene transcription required for long-term memory formation (Lattal et al., 2007; Vecsey et al., 2007). It is possible that although the weakness of the acquired information during the training phase, the chromatin relaxation induced by class I HDAC inhibition facilitates the gene expression to enable lasting memory. Recently, it was reported that HDACs inhibition promotes binding of BRD4, a nuclear protein, to the *Bdnf* gene promoter increasing BDNF expression and establishing long-term memory (Sartor et al., 2019). Although the nuclear mechanism has been partially described, the downstream events remain poorly understood. In this work, we aimed to evaluate the temporal expression of BDNF through class I HDAC inhibition and, consequently, its effects on the consolidation of object recognition memory. In order to demonstrate this hypothesis, we used two different strength object recognition training protocols: weak (3 min) and strong (10 min) training ORM tasks, directly associated with exploration times of the objects during training. We found that strong training ORM established a reliable long-term memory, but weak training ORM did not, being a model susceptible to be enhanced through class I HDAC inhibition. In this regard, it has been reported that unspecific HDACs inhibitors do not affect consolidation of strong training behavioral tasks (Bahari-Javan et al., 2012; Núñez-Jaramillo et al., 2013). Given the differences between weak and strong training ORM on the long-term memory, we observed a differential timeline pattern of BDNF expression into the IC after the training. Our results showed that strong ORM training induced a reliable increase of BDNF expression at four and 8 h after training. Conversely, a weak training ORM did not increase BDNF expression and it remains similar to the baseline for up to 8 h. Therefore, these results suggest that BDNF expression depends on the strength of training. Similarly, previous reports have shown that different memory tasks, such as associative conditioned taste aversion, induced significant BDNF expression into the IC (Ma et al., 2011; Wang et al., 2012), which supports the role of BDNF on memory consolidation.

It has been shown that the *Bdnf* gene promoter is regulated by histones acetylation (Martinowich et al., 2003; Lubin et al., 2008). In this regard, *in vitro* studies have shown that HDAC inhibitors, such as MS-275, increase *Bdnf* mRNA expression (Bredy et al., 2007; Lubin et al., 2008; Intlekofer et al., 2013; Koppel and Timmusk, 2013). Accordingly, we found that class I HDAC inhibition by intracortical injection of MS-275 (Khan et al., 2008; Bahari-Javan et al., 2012) enhances BDNF expression and enables the establishment of long-term memory of a weak training ORM without altering the total exploration time. Importantly, we found that BDNF is involved in ORM consolidation, similar to previous reports (Intlekofer et al., 2013; Radiske et al., 2017). The timeline pattern of BDNF expression in weak training ORM with class I HDAC inhibition indicates a remarkable increase at four- and 8-h post-training. This BDNF expression profile in weak training ORM with MS-275 mimics the BDNF expression timeline under strong training conditions, a standard protocol to establish long-term ORM. To corroborate the pharmacological effects of MS-275 inhibitor on the class I HDAC activity, we evaluated the expression of H4K12ac as a reporter of levels of histones acetylation. We found that class I HDAC inhibition with MS-275 inhibitor increased H4K12ac at 1-h post-training, previous reports showed a direct interaction between H4K12ac and *Bdnf*

promoter, and this epigenetic mark has been potentially associated with the chromatin relaxation and transcription of genes to improve memory consolidation (Duan et al., 2016; Guan et al., 2009; Intlekofer et al., 2013; Peleg et al., 2010; Uchida et al., 2017).

As mentioned, BDNF/TrkB pathway improves synaptic plasticity, synaptic transmission and long-term potentiation, mechanisms that have been associated with memory consolidation (Gorski et al., 2003; Bekinschtein et al., 2007; Silhol et al., 2007; Minichiello, 2009; Revest et al., 2014). It has been demonstrated the functional effects of BDNF by blocking its specific TrkB receptor with K252a, which impairs memory consolidation and long-term plasticity (Ma et al., 2011; Schjetnan and Escobar, 2012). Accordingly, we found that TrkB receptor inhibition with K252a at 4 h post-training impairs ORM consolidation with class I HDAC inhibition. The inhibition of the TrkB receptor at 8 h does not block the long-term ORM. Our results are similar to those previously reported in a fear memory task, which supports the temporal role of BDNF for recognition memory consolidation (Schulz-Klaus et al., 2013). Thereby, the results obtained suggest that increased histone acetylation levels due to class I HDAC inhibition regulate the BDNF/TrkB pathway activation. The effects of this activation occurred in a time-dependent manner to consolidate long-term ORM. In addition, these results suggest that BDNF expression, via activation of the canonical receptor TrkB, requires a critical window that is reached through the inhibition of HDAC class I and improves memory consolidation object recognition.

#### 5. Conclusions

All in all, these results demonstrate that class I HDAC regulates the susceptibility of neural circuits to induce gene expression to control the cellular mechanisms, including the BDNF/TrkB pathway, necessary to consolidate memory. These results open new ways to examine the temporal relationship between cellular mechanisms and the processes involved in memory consolidation.

#### CRedit authorship contribution statement

**Gerardo Ramírez-Mejía:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Visualization, Project administration. **Elvi Gil-Lievana:** Methodology, Validation, Formal analysis, Data curation, Writing - original draft, Visualization. **Oscar Urrego-Morales:** Methodology, Validation, Formal analysis, Data curation, Writing - original draft, Visualization. **Ernesto Soto-Reyes:** Resources, Writing - review & editing, Supervision. **Federico Bermúdez-Rattóni:** Resources, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

#### Declaration of competing interest

None.

#### Acknowledgments

This work was supported by the CONACYT grant 250870, CONACYT grant FOINS 474, and DGAPA-PAPIIT-UNAM grant IN212919. Ramírez-Mejía G. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 308739 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. We would like to thank Dr. Daniel Osorio-Gómez for valuable comments and Dr. Luis F Rodríguez Duran for technical assistance.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108493>.



## References

- Alonso, M., Beckinschtein, P., Cammarota, M., Vianna, M.R.M., Izquierdo, I., Medina, J. H., 2005. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn. Mem.* 12, 504–510. <https://doi.org/10.1101/lm.27305>.
- Bahari-Javan, S., Maddalena, A., Kerimoglu, C., Wittnam, J., Held, T., Bähr, M., Burkhardt, S., Delalle, I., Kügler, S., Fischer, A., Sananbenesi, F., 2012. HDAC1 regulates fear extinction in mice. *J. Neurosci.* 32, 5062–5073. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0079-12.2012>.
- Balderas, I., Rodríguez-Ortiz, C.J., Bermúdez-Rattoni, F., 2015. Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behav. Brain Res.* 285, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.049>.
- Balderas, I., Rodríguez-Ortiz, C.J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., Bermúdez-Rattoni, F., 2008. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of temporal lobe. *Learn. Mem.* 15, 618–624. <https://doi.org/10.1101/lm.1028008>.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilacqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J. H., 2007. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53, 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.025>.
- Beldjoud, H., Barsegyan, A., Roozendaal, B., 2015. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala enhances object recognition memory and induces chromatin remodeling in the insular cortex. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 108. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00108>.
- Bermúdez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B., McGaugh, J.L., 2005. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn. Mem.* 12, 447–449. <https://doi.org/10.1101/lm.97605>.
- Bermúdez-Rattoni, F., 2014. The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 109, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.001>.
- Blaser, R., Heysler, C., 2015. Spontaneous object recognition: a promising approach to the comparative study of memory. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 183. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00183>.
- Bredy, T.W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y.E., Barad, M., 2007. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn. Mem.* 14, 268–276. <https://doi.org/10.1101/lm.500907>.
- Callaghan, C.K., Kelly, A.M., 2013. Neurotrophins play differential roles in short and long-term recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 104, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.04.011>.
- Chen, Y., Barsegyan, A., Nadif Kasri, N., Roozendaal, B., 2018. Basolateral amygdala noradrenergic activity is required for enhancement of object recognition memory by histone deacetylase inhibition in the anterior insular cortex. *Neuropharmacol* 141, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.018>.
- Day, J.J., Sweatt, J.D., 2011. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* 70, 813–829. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.019>.
- Duan, R., Liu, X., Wang, T., Wu, L., Gao, X., Zhang, Z., 2016. Histone acetylation regulation in sleep deprivation- induced spatial memory impairment. *Neurochem. Res.* 41, 2223–2232. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1937-6>.
- Friard, O., Gamba, M., 2016. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol. Evol.* 7, 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>.
- Gorski, J.A., Zeiler, S.R., Tamowski, S., Jones, K.R., 2003. Brain-derived neurotrophic factor is required for maintenance of cortical dendrites. *J. Neurosci.* 23, 6856–6865. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-17-06856.2003>.
- Gräff, J., Tsai, L.H., 2013. The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 311–330. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140216>.
- Grayson, B., Leger, M., Piercy, C., Adamson, L., Harte, M., Neill, J.C., 2015. Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. *Behav. Brain Res.* 285, 176–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.025>.
- Guan, J.S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T.J.F., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J.E., DePinto, R.A., Jaenisch, R., Tsai, L.H., 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55–63. <https://doi.org/10.1038/nature07925>.
- Hawk, J.D., Florian, C., Abel, T., 2011. Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term location memory. *Learn. Mem.* 18, 367–370. <https://doi.org/10.1101/lm.2097411>.
- Intlekofer, K.A., Berchtold, N.C., Malvaez, M., Carlos, A.J., McQuown, S.C., Cunningham, M.J., Wood, M., Cotman, C.W., 2013. Exercise and sodium butyrate transform a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. *Neurosciopharmacology* 38, 2027–2034. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.104>.
- Jarome, T.J., Lubin, F.D., 2014. Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 115, 116–117. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.08.002>.
- Khan, N., Jeffers, M., Kumar, S., Hackett, C., Boldog, F., Khramtsov, N., Qian, X., Mills, E., Berghs, S.C., Carey, N., Finn, P.W., Collins, L.S., Tumber, A., Ritchie, J.W., Jensen, P.B., Lichenstein, H.S., Sehested, M., 2008. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem. J.* 409, 581–589. <https://doi.org/10.1042/BJ20070779>.
- Koppel, I., Timmusk, T., 2013. Differential regulation of *Bdnf* expression in cortical neurons by class-selective histone deacetylase inhibitors. *Neuropharmacology* 75, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.015>.
- Lackens, D., 2013. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for *t*-tests and ANOVAs. *Front. Psychol.* 4, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00863>.
- Lattal, K.M., Barrett, R.M., Wood, M.A., 2007. Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav. Neurosci.* 121, 1125–1131. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.5.1125>.
- Levenson, J.M., O'Riordan, K.J., Brown, K.D., Trinh, M.A., Molfese, D.L., Sweatt, J.D., 2004. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* 279, 40545–40559. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402229200>.
- Levenson, J.M., Sweatt, J.D., 2005. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 108–118. <https://doi.org/10.1038/nrn1604>.
- Lubin, F.D., Roth, T.L., Sweatt, J.D., 2008. Epigenetic regulation of *Bdnf* gene transcription in the consolidation of fear memory. *J. Neurosci.* 28, 10576–10586. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1786-08.2008>.
- Ma, L., Wang, D.D., Zhang, T.Y., Yu, H., Wang, Y., Huang, S.H., Lee, F.S., Chen, Z.Y., 2011. Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste-aversion memory formation. *J. Neurosci.* 31, 2079–2090. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5348-10.2011>.
- Marmonstein, R., Zhou, M.M., 2014. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a018762. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762>.
- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., Sun, Y.E., 2003. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity dependent *Bdnf* gene regulation. *Science* 302, 890–893. <https://doi.org/10.1126/science.1090842>.
- McGaugh, J.L., 2000. Memory- a century of consolidation. *Science* 287, 248–251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>.
- 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., 2011. HDAC3 is critical negative regulator of long-term memory formation. *J. Neurosci.* 31, 764–774. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5052-10.2011>.
- Miller, P., 2013. Stimulus number, duration and intensity encoding in randomly connected attractor networks with synaptic depression. *Front. Comput. Neurosci.* 7, 59. <https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00059>.
- Minichiello, L., 2009. TrkB signaling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 850–860. <https://doi.org/10.1038/nrn2738>.
- Núñez-Jaramillo, L., Reyes-López, J., Miranda, M.L., 2013. Sodium butyrate into the insular cortex during conditioned taste-aversion acquisition delays aversive taste memory extinction. *Neuroreport* 25, 386–390. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b00000000000103>.
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovolis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R.C., Cota, P., Wittmann, J.L., Gogol-Doering, A., Oritz, L., Salinas-Riester, G., Dettenhofer, M., Kang, H., Farinelli, L., Chen, W., Fischer, A., 2010. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 328, 753–756. <https://doi.org/10.1126/science.1186088>.
- Radiske, A., Rossato, J.I., Gonzalez, M.C., Köhler, C.A., Bevilacqua, L.R., Cammarota, M., 2017. BDNF controls object recognition memory reconsolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 142, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.02.018>.
- Revest, J.M., Le Roux, A., Roullot-Lacarrière, V., Kaouane, N., Vallée, M., Kasanetz, F., Rouge-Pont, F., Tronche, F., Desmedt, A., Piazza, P.V., 2014. BDNF-TrkB signaling through Erk1/2/MAPK phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. *Mol. Psychiatr.* 19, 1001–1009. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.134>.
- Rosas-Vidal, L.E., Lozada-Miranda, V., Cantres-Rosario, Y., Vega-Medina, A., Melendez, L., Quirk, G.J., 2018. Alteration of BDNF in the medial prefrontal cortex and the ventral hippocampus impairs extinction of avoidance. *Neuropsychopharmacol* 43, 2636–2644. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0176-8>.
- Roozendaal, B., Hernandez, A., Cabrera, S.M., Hagevoud, R., Malvaez, M., Stefanko, D. P., Haettig, J., Wood, M., 2010. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J. Neurosci.* 30, 5037–5046. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5717-09.2010>.
- Sartor, G.C., Malvezzi, A.M., Kumar, A., Andrade, N.S., Wiedner, H.J., Vilca, S.J., Janczura, K.J., Bagheri, A., Al-Ali, H., Powell, S.K., Brown, P.T., Volmar, C.H., Foster, T.C., Zeiler, Z., Wahlestedt, 2019. Enhancement of BDNF expression and memory by HDAC inhibition requires BET bromodomain reader proteins. *J. Neurosci.* 23, 612–626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1604-18.2018>.
- Schjetnan, A.G., Escobar, M.L., 2012. In vivo BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation. *Hippocampus* 22, 1–8. <https://doi.org/10.1002/hipo.20866>.
- Schulz-Klaus, B., Leassmann, V., Endres, T., 2013. BDNF-dependent consolidation of fear memories in the perirhinal cortex. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 205. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00205>.
- Seto, E., Yoshida, M., 2014. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>.
- Sihoh, M., Arancibia, S., Maurice, T., Tapia-Arancibia, L., 2007. Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neurosci* 146, 962–973. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.013>.
- Stefanko, D.P., Barret, R.M., Ly, A.R., Reolon, G.K., Wood, M., 2009. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 106, 9447–9452. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903964106>.
- Tyler, W.J., Pozzo-Miller, L.D., 2001. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci.* 21, 4249–4258. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04249.2001>.



G. Ramírez-Mejía et al.

Neuropharmacology 187 (2021) 108493

- Tyssowski, K.M., DeStefino, N.R., Cho, J.H., Dunn, C.J., Poston, R.G., Carly, C.E., Jones, R.D., Chang, S.M., Romeo, P., Wurzelmann, M.K., Ward, J.M., Andermann, M. L., Saha, R.N., Dudek, S.M., Gray, J.M., 2018. Different neuronal activity patterns induce different gene expression programs. *Neuron* 98, 530–546. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.001>.
- Uchida, S., Teubner, B.J.W., Hevi, C., Hara, K., Kobayashi, A., Dave, R.M., Shintaku, T., Jaikhan, P., Yamagata, H., Suzuki, T., Watanabe, Y., Zakharenko, S.S., Shumyatsky, G.P., 2017. CRTCl nuclear translocation following learning modulates memory strength via exchange of chromatin remodeling complexes on the *Fgf1* gene. *Cell Rep.* 18, 352–366. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.052>.
- 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., 2007. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation. *J. Neurosci.* 27, 6128–6140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0296-07.2007>.
- Wang, Y., Zhang, T.Y., Xin, J., Li, T., Yu, H., Li, N., Chen, Z.Y., 2012. Differential involvement of brain-derived neurotrophic factor in reconsolidation and consolidation of conditioned taste aversion memory. *PLoS One* 7, e49942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049942>.