



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTO DE LA INHIBICION DE LAS HDAC DE CLASE I SOBRE EL
DETERIORO DE LA MEMORIA INDUCIDO POR ESTRÉS AGUDO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. en C. HEIDY MARTÍNEZ PACHECO

TUTOR

**Dr. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN
FACULTAD DE MEDICINA**

COMITÉ TUTOR:

**Dr. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Dr. IGNACIO CAMACHO ARROYO
FACULTAD DE QUÍMICA**

CDMX., NOVIEMBRE DEL 2019



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.

Los miembros del Comité Tutor certificamos que la tesis elaborada por: Heidi Martínez Pacheco, cuyo título es: “EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LAS HDAC DE CLASE I SOBRE EL DETERIORO DE LA MEMORIA INDUCIDO POR ESTRÉS AGUDO” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Federico Bermúdez Rattoni
Presidente

Dr. Gabriel Roldán Roldán
Secretario (tutor)

Dra. Gina Lorena Quirarte
Vocal

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Vocal

Dr. Miguel Pérez de la Mora
Vocal

Aprobado por el Comité Académico

RESUMEN

La memoria es un proceso dinámico que se construyen en etapas secuenciales: codificación, consolidación y recuperación de la información por el sistema nervioso central. Se ha demostrado que la presencia de un agente estresor durante el entrenamiento facilita la memoria en diversas tareas conductuales, tales como la temperatura baja del agua en el laberinto acuático de Morris, o las intensidades relativamente altas de choque eléctrico en el condicionamiento de miedo. Por otro lado la presencia de un agente estresor 30 minutos previo al entrenamiento en una tarea dependiente de hipocampo deteriora la formación de la memoria a largo plazo. Se han descrito algunos de los mecanismos celulares y moleculares asociados a este efecto en cerebros de roedores, pero se desconocen sus mecanismos epigenéticos. La acetilación de histonas, juega un papel importante en la consolidación de la memoria. Dado que el entrenamiento en tareas dependientes del hipocampo y el estresor tiene efectos opuestos en el nivel de acetilación de las histonas del nucleosoma, es concebible que los efectos deletéreos del estrés sobre la memoria estén mediados por la alteración de su balance. Para determinar si la inhibición farmacológica de las desacetilasas de histonas de clase I (HDACs, "isoforma 2") puede revertir los efectos deletéreos del estrés agudo (por nado forzado) sobre una memoria dependiente de hipocampo se trataron grupos independientes de ratones CD1 con inhibidores de las HDACs: IN14 (nuevo inhibidor de las HDACs) y fenilbutirato de sodio (PB, control positivo) a dosis de 100 mg/kg/día, por vía intraperitoneal. Cuatro ratones de cada grupo fueron sacrificados después del entrenamiento para determinar los niveles de corticosterona en plasma y los niveles de HDAC2 en el hipocampo. Se encontró que la inhibición de las HDACs evitó que el estrés agudo deteriorara la consolidación de la memoria e incrementara los niveles de corticosterona después de la prueba de memoria a largo plazo; además la inhibición de las HDACs evitó que el estrés indujera cambios en los niveles de expresión HDAC2 en hipocampo de animales entrenados y no entrenados en la tarea. Estos resultados sustentan la hipótesis de que el deterioro en la consolidación de la memoria causado por estrés agudo podría alterar el balance de acetilación de histonas (medida indirectamente a partir de los niveles de HDAC2), y sugieren que este mecanismo epigenético también tiene un papel en la regulación de la respuesta de estrés y los niveles de expresión de la HDAC2 en regiones del cerebro que participan en la consolidación de la memoria.

ABSTRACT

Memory is a dynamic process that is built in sequential stages: coding, consolidation and retrieval of information by the central nervous system. It has been shown that the presence of a stressor during training facilitates memory in various behavioral tasks, such as the low water temperature in the Morris water maze, or the relatively high intensities of electric shock in fear conditioning. On the other hand, the presence of a stressor 30 minutes prior to training in a hippocampus-dependent task impairs the formation of long-term memory. Some of the cellular and molecular mechanisms associated with this effect have been described in rodent brains, but their epigenetic mechanisms are unknown. Histone acetylation plays an important role in memory consolidation. Since training in tasks dependent on the hippocampus and stressor has opposite effects on the level of acetylation of nucleosome histones, it is conceivable that the deleterious effects of stress on memory are mediated by the alteration of their balance. To determine whether pharmacological inhibition of class I histone deacetylases (HDACs, "isoform 2") would avoid the deleterious effects of stress (by forced swimming) on a hippocampus-dependent memory, independent groups of CD1 mice were treated with inhibitors of HDACs: IN14 (new HDAC inhibitor) and sodium phenylbutyrate (PB, positive control) at doses of 100 mg/kg/day, intraperitoneally. Four mice from each group were sacrificed after training to determine plasma corticosterone levels and HDAC2 levels in the hippocampus. It was found that inhibition of HDACs prevented acute stress from deteriorating memory consolidation and the increase in corticosterone levels after the long-term memory test; In addition, inhibition of HDACs prevented stress induced changes in HDAC2 expression levels in the hippocampus of trained and untrained animals. These results support the hypothesis that the memory consolidation impaired by acute stress involves the alteration of histone acetylation balance (measured indirectly from HDAC2 levels), and suggest that this epigenetic mechanism has a role in the regulation of the stress response and HDAC2 in regions of the brain that participate in the consolidation of memory.

AGRADECIMIENTOS

La alumna Heidy Martínez Pacheco agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgar la beca nacional con el No. 287653 del periodo de Agosto de 2015 a Julio de 2019.

La alumna Heidy Martínez Pacheco agradece al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por aceptarla en su programa de posgrado.

Los estudios conductuales se realizaron en el laboratorio de Neurobiología Conductual de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Gabriel Roldán Roldán. También se contó con el apoyo del Dr. Ofir Picazo Picazo de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

Los estudios de caracterización química se realizaron en el Instituto de Química Aplicada y Teórica de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca bajo la dirección del Dr. Adolfo López Torres y el Dr. Guillermo Ramírez Galicia.

El aprendizaje de técnicas de biología molecular, así como la evaluación de la actividad HDAC2 en hipocampo de ratón se realizó en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Veracruzana, Campus Xalapa, Veracruz bajo la dirección de la Dra. Rossana C. Zepeda Hernández.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Capítulo 1: Introducción general	iii
1.1. Conceptos de aprendizaje y memoria	1
1.2. Mecanismos neuroquímicos implicados en la formación de la memoria	4
1.3. El Hipocampo	5
1.4. Memoria episódica y semántica	6
1.5. Memoria espacial	9
1.6. Epigenética	11
1.7. Memoria, acetilación y desacetilación de histonas	13
Capítulo 2: Pregunta de investigación y objetivo general	16
Capítulo 3: El IN14, un nuevo inhibidor de las HDACs de clase I (artículo publicado)	17
Capítulo 4: Caracterización bioquímica y conductual del IN14 (artículo enviado)	36
Capítulo 5: Efecto de los inhibidores de las HDACs sobre la memoria de largo plazo, tras una sesión estresante (artículo en preparación)	60
5.1. Introducción	61
5.1.1. Eje adrenal hipotalámico-hipofisario	64
5.1.2. Hipocampo y regulación del eje HHA	65
5.1.3. Efectos del estrés sobre la memoria	67
5.1.4. Estrés intrínseco	68
5.1.5. Estrés extrínseco	69
5.1.6. Mecanismos epigenéticos asociados al estrés	70
5.2. Material y métodos	72
5.3. Análisis estadístico	79
5.4. Resultados	80
Capítulo 6: Discusión general	86
Capítulo 7: Conclusiones	91
Referencias	92

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Por muchos años se había considerado que el cerebro adulto era un órgano incapaz de continuar con procesos de remodelación estructural luego de terminadas sus etapas del desarrollo. Se pensó que las sinapsis, eran estructuras estables que transmiten una respuesta postsináptica estereotipada después de la liberación presináptica cuántica del neurotransmisor. En los últimos años estos conceptos han cambiado gradualmente, al punto de aceptar que existe una enorme flexibilidad en la forma y función neuronal del cerebro adulto. Estos cambios son adaptativos, impulsados por patrones de actividad neuronal generados tanto por la experiencia sensorial externa como por las fuentes internas (Leslie y Nedivi, 2011).

Décadas de trabajo han proporcionado evidencia de que la expresión génica, subyacente a la actividad sináptica y neuronal, se encuentra regulada en gran medida por mecanismos epigenéticos. Las modificaciones epigenéticas dentro del SNC, que son cruciales para la adaptación de la conducta a corto y largo plazo, ocurren como consecuencia de diversos estímulos ambientales. La activación o silenciamiento de estos genes, controlados por mecanismos epigenéticos, parece representar un importante regulador de la remodelación sináptica y de la memoria.

1.1. CONCEPTOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

Cuando se habla de “aprendizaje”, se hace referencia a los procesos en virtud de los cuales la conducta varía y se modifica a lo largo del tiempo, que se da como consecuencia de la experiencia y que le permite a los organismos adaptarse al medio ambiente (Aguado, 2001). Se define al aprendizaje como la adquisición de nueva información, mientras que la memoria es la retención, manipulación y recuperación de la información adquirida (Kaldel y Pittenger, 1999). La memoria es en sí misma un proceso dinámico, donde la información almacenada en el cerebro

esta sometida a procesos de reorganización dependientes de numerosos factores, como la adquisición de nuevas informaciones relacionadas, la imposición de nuevas interpretaciones sobre informaciones pasadas, el decaimiento de los recuerdos con el paso del tiempo, etc (Agudo, 2001).

El aprendizaje y la memoria son funciones cognitivas que abarcan una variedad de subcomponentes. Estos componentes se pueden estructurar de diferentes maneras. Por ejemplo, podemos enfocarnos en su dimensión temporal, o diferenciar varias formas de memoria en virtud de su contenido o mecanismos de adquisición (Figura 1). De acuerdo a las peculiaridades conductuales y las estructuras cerebrales implicadas, se han caracterizado tres tipos de memoria: la de trabajo, la implícita y la explícita (Roediger y McDermot, 2013). La memoria de trabajo también llamada cognición ejecutiva, consiste en la representación consciente y manipulación temporal de la información necesaria para realizar operaciones mentales complejas, como el aprendizaje, la comprensión del lenguaje o el razonamiento. Por otra parte, la memoria implícita, procedimental o no declarativa es la memoria de los patrones motores. Se le considera automática, inconsciente y difícil de verbalizar. Su adquisición es gradual y se perfecciona con la práctica. Este tipo de memoria deriva de aprendizajes básicos, como la habituación y la sensibilización, el aprendizaje perceptual y motor o el condicionamiento clásico e instrumental (Squire y Zola-Morgan, 2015). Anatómicamente, la memoria implícita requiere de diferentes estructuras cerebrales que han sido involucradas con el aprendizaje procedimental, por ejemplo, los ganglios basales con el aprendizaje de hábitos y habilidades (Ashby y cols., 2010), el cerebelo con los condicionamientos de respuestas motoras (Timmann y cols., 2010) y la amígdala con los condicionamientos emocionales (Duvarci y Pare, 2014). Aunque la región principal de esta memoria radica en estructuras subcorticales y en algunos casos depende directamente del neocórtex (Sharon y cols., 2011).

El sistema de memoria explícita, también conocida como memoria declarativa, relacional o cognitiva es el almacenamiento cerebral de hechos (memoria

semántica) y eventos (memoria episódica) (Ullman, 2004; Squire y Wixted, 2011; Eichenbaum y cols., 2012). Este tipo de memoria se adquiere en pocos ensayos a diferencia de la memoria implícita y se distingue por expresarse en situaciones y modos diferentes a los del aprendizaje original, por lo que es considerada como una memoria de expresión flexible. Un tipo de memoria declarativa es la memoria espacial que consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales (O'Keefe y Nadel, 1978; Chersi y Burgess, 2015; Buzsáki y Moser, 2013). El hipocampo parece ser la estructura cerebral que está críticamente relacionada en este tipo de memoria declarativa (Abrahams y cols., 1997; Bird y Burgess, 2008).

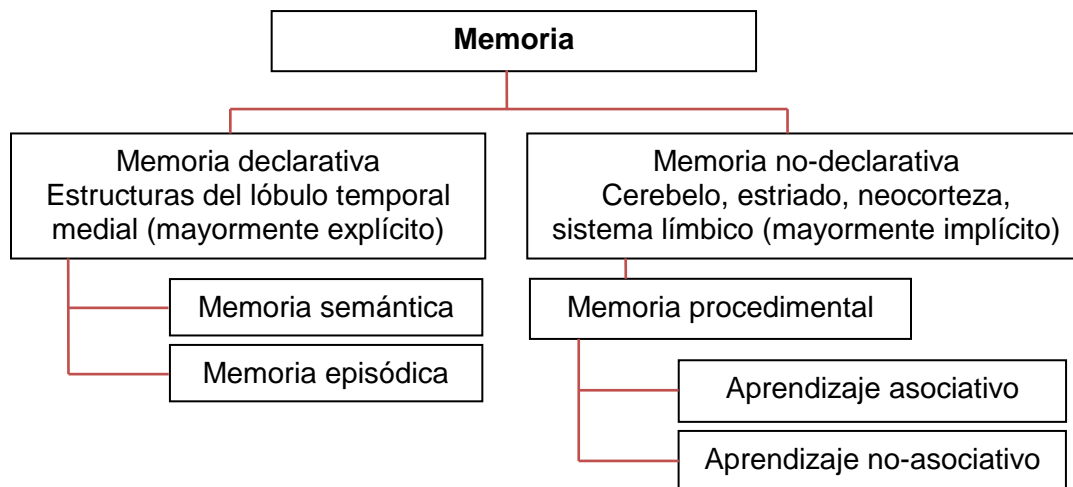


Figura 1. Clasificación básica de los diferentes tipos de proceso de memoria.

La memoria también puede clasificarse de acuerdo a su duración en memoria de corto y de largo plazo. La memoria de corto plazo se define como aquella que permite mantener activa información recientemente adquirida por un período de segundos a minutos, y se basa en cambios efímeros, eléctricos o moleculares, que dependiendo del estímulo, pueden generar cambios persistentes y llevar a un proceso denominado consolidación de la memoria. El resultado de la consolidación es la formación de la memoria de largo plazo, que requiere la síntesis de nuevas proteínas y cambios estructurales a nivel sináptico. La memoria

de largo plazo permite el almacenamiento y organización de la información por períodos prolongados que van desde horas hasta años (Kandel y Pittenger, 1999).

1.2. MECANISMOS NEUROQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA

Durante la adquisición de información se desencadena una cascada de eventos celulares y moleculares que son requeridos para la consolidación de la memoria, de un estado lábil a uno permanente, donde la regulación de la transcripción génica y la síntesis de proteínas *de novo* son eventos críticos para la formación de memorias de largo plazo (Lattal, Radulovic y Lukowiak, 2006).

La cascada de eventos moleculares inicia cuando se estimulan las neuronas aferentes y se liberan los neurotransmisores sinápticos como el glutamato. La estimulación de receptores glutamatérgicos (NMDA, AMPA) permite la entrada de calcio y la activación de segundos mensajeros que inducen la activación de cinasas como la proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC) y calcio-calmodulina II cinasa (α CaMKII). Estas cinasas fosforilan receptores tipo AMPA y NMDA, promoviendo su actividad, proceso que sustenta la adquisición inicial de la memoria. En paralelo, estas cinasas activan las cinasas de la vía MAPK induciendo su translocación al núcleo donde fosforilan factores de transcripción (p.ej. la proteína de unión a CRE, CREB) y acetiltransferasas de histonas (p.ej. CBP), promoviendo que la cromatina se relaje, el reclutamiento de la maquinaria transcripcional básica y la síntesis de RNA. El RNA mensajero es madurado y exportado del núcleo hacia el citoplasma o el retículo endoplásmico rugoso para la traducción en nuevas proteínas, como Arc, que participan en la remodelación de las espinas dendríticas, o en factores de transcripción, como c-Fos, que promueve una segunda oleada de síntesis de RNA (Figura 2). La síntesis de RNA y proteínas *de novo* sustenta el incremento en la eficiencia sináptica y la consolidación de la memoria (Jonathan y cols., 2004).

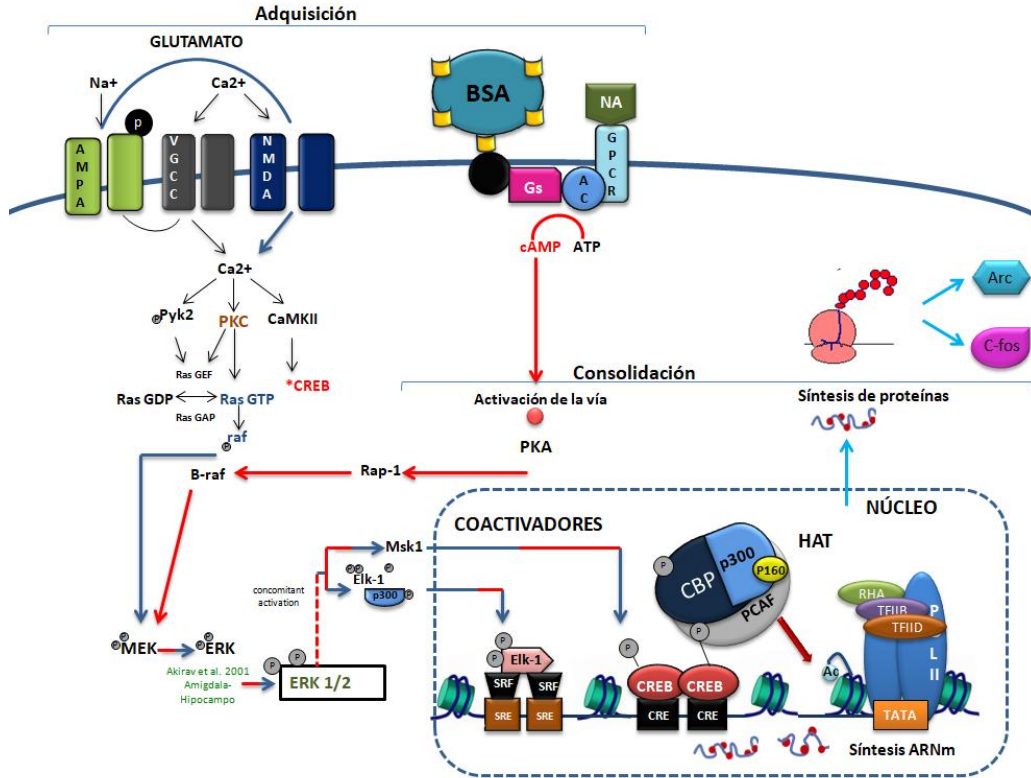


Figura 2. Mecanismos moleculares asociados a la adquisición y consolidación de la memoria. Los receptores glutamatérgicos tipo NMDA (NMDRs) permiten la entrada de Ca^{2+} y activan pequeñas GTPasas (Ras y Raf). El flujo de los iones de Ca^{2+} desencadena diferentes vías de señalización que convergen en la activación de la vía MEK/ERK. La proteína quinasa A (PKA) es activada por el AMP cíclico (cAMP) y actúa directamente sobre ERK y la proteína quinasa ribosomal S6 (RSK) para activar factores de transcripción como la proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB) que inician la transcripción genética.

1.3. HIPOCAMPO

El hipocampo es un componente clave y central de la red de memoria (Kesner y Hopkins, 2006). Esta estructura consta de tres divisiones: el giro dentado (GD), el *cornu Ammonis* (CA), que esta dividida en tres campos (CA1-CA4). Su forma larga y curva está presente en todos los órdenes de los mamíferos, pero su estructura interna y su posición dentro del cerebro difieren entre los roedores y los humanos debido a las variaciones en la migración del hipocampo durante el desarrollo embrionario. El hipocampo humano está involucrado en una rotación completa durante el desarrollo, que lo deja en una posición ventral, con CA1 en la región inferior y CA3 en la región superior (dentro del plano coronal). En la mayoría de los mamíferos, el hipocampo está involucrado solo en la rotación hemisférica parcial

durante el desarrollo. El hipocampo de roedor, por ejemplo, está en una posición dorsal, y la relación de CA1 con CA3 es, por lo tanto, opuesta a la que se encuentra en los humanos (Duvernoy y cols., 2013; Kier y cols., 1997; Figura 3).

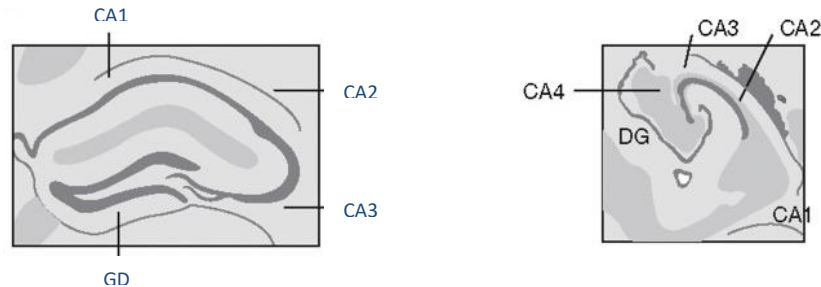


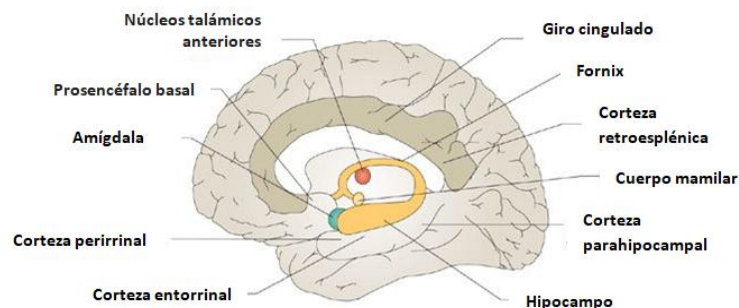
Figura 3. Anatomía del hipocampo en ratones y humanos (Modificado de Glikmann y cols., 2019). Dibujos de cortes transversales de hipocampos de ratón y humanos. DG: giro dentado.

1.4. MEMORIA EPISÓDICA Y SEMÁNTICA

Una característica sorprendente de los problemas de memoria que siguen al daño del hipocampo es la incapacidad de recordar eventos recientes. Sin embargo, los pacientes con daño en el hipocampo suelen tener un vocabulario normal, y su conocimiento general de los hechos permanece intacto. Curiosamente, el patrón opuesto de pérdida de memoria está asociado con una forma específica de enfermedad neurodegenerativa conocida como 'demencia semántica': aquí, los eventos recientes se recuperan con precisión, mientras que el conocimiento de los significados de las palabras y los hechos se ve dramáticamente afectado (Patterson y cols., 2007). El tipo de memoria que involucra eventos experimentados personalmente fue denominado "memoria episódica" por Tulving, quien lo comparó con otros aspectos de la memoria declarativa, como el conocimiento de hechos en ausencia del contexto en el que se aprendieron (memoria semántica) o reconocimiento independiente del contexto de estímulos basados en un sentimiento de familiaridad (Tulving, 1972, 2002).

La teoría declarativa explica estas disociaciones en términos de la edad de los recuerdos. Basado en observaciones clínicas (Scoville y Milner, 1957) y

suposiciones teóricas (Marr, 1971), se propuso que los recuerdos más antiguos se "consolidan" en áreas neocorticales fuera del lóbulo temporal medial. Según esta teoría, los recuerdos episódicos adquiridos recientemente son vulnerables al daño del hipocampo, mientras que los hechos que se aprendieron hace mucho tiempo no lo son. De manera similar, la teoría declarativa predice que el daño del hipocampo perjudica la adquisición de nuevos conocimientos, pero deja intactas las memorias remotas de episodios. No obstante, una explicación alternativa convincente para estos datos, según lo propuesto por la Teoría de rastreo múltiple, es que tanto los recuerdos episódicos recientes como los remotos dependen del hipocampo. De acuerdo con esta teoría, el hipocampo y las regiones adyacentes (las cortezas perirrinal y parahipocampal) conectan y almacenan rastros de la memoria de la información que representa un evento y se almacena en la neocorteza. Cada vez que se recupera la memoria de un evento, se crea una nueva traza mediada por el hipocampo, de manera que las memorias más antiguas se representan con más trazas que las nuevas y, por lo tanto, son menos susceptibles a la interrupción. Además, a medida que se forman más rastros del mismo evento, la información que pertenece a ese evento, que se almacena en la neocorteza, se integra con el conocimiento preexistente en un proceso llamado "semantización" (Moscovitch y cols., 2005). Por lo tanto, los recuerdos de eventos remotos que sobreviven después de un daño en el hipocampo tienden a ser de naturaleza semántica en lugar de episodios (es decir, son recuerdos de estereotipos repetidos a menudo de secuencias de comandos repetidos). En la medida en que los recuerdos remotos son episódicos, continúan dependiendo del hipocampo (Steinvorth y cols., 2005).



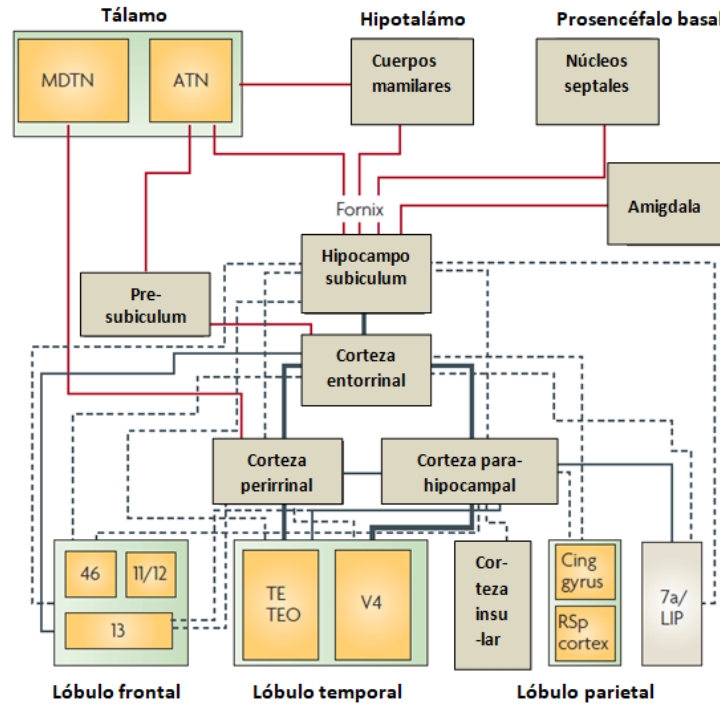


Figura 4. El hipocampo y sus conexiones. A) El hipocampo se encuentra en los lóbulos temporales mediales, rodeados por las cortezas entorrinal, parahipocámpica y perirrinal. Es parte del circuito de Papez y, por lo tanto, está conectado a varias estructuras subcorticales y corticales, como los núcleos talámicos anteriores (ATN), los cuerpos mamilares, los núcleos septales del cerebro anterior basal, la corteza retrosplenial y la corteza parahipocámpica. B) Conexiones corticales y subcorticales del hipocampo. Las conexiones subcorticales se indican mediante líneas rojas; Las conexiones corticales se indican mediante líneas negras. El grosor de las líneas negras se aproxima a la fuerza de las conexiones. La mayor parte de las entradas neocorticales del hipocampo provienen de las cortezas perirrinal y parahipocámpica, a través de la corteza entorrinal, y la mayor parte de su producción neocortical es a través del subículo, que también se proyecta de nuevo a la corteza entorrinal. Tanto la corteza perirrinal como la corteza parahipocámpica se encuentran al final del flujo de procesamiento visual ventral ("qué"). La corteza perirrinal es crucial para la representación de objetos complejos, mientras que la corteza parahipocámpica, con sus fuertes conexiones con el parietal posterior (7a/área intraparietal lateral (LIP)) y los cortes retrosplenial (RSp), tiene un papel más importante en el procesamiento de Información visuoespacial (desde el flujo del procesamiento visual dorsal ("donde")). Algunos investigadores han propuesto que el "recuerdo" depende del hipocampo y sus vínculos con la ATN, mientras que la "familiaridad" puede estar mediada por conexiones directas entre la corteza perirrinal y los núcleos talámicos dorsales mediales (MDTN). Cing gyros: giro cingulado, TE y TEO: áreas temporales inferiores TE y TEO. Modificado de Chris y Burgess, 2008.

Cabe señalar que la mayoría de los estudios de imágenes funcionales en adultos sanos sugieren que el hipocampo tiene un papel en la memoria episódica, independientemente de la edad de la memoria (Cabeza y Jacques, 2007). Sin embargo, tales estudios no proporcionan evidencia de qué aspecto de las tareas activa el hipocampo, ni si la participación del hipocampo es estrictamente necesaria.

1.5. MEMORIA ESPACIAL

La importancia del sistema hipocampal para la memoria espacial se hizo evidente por primera vez en la década de 1950, cuando Scoville y Milner (1957) informaron el caso de un paciente con HM que se volvió amnésico luego de la extirpación de sus lóbulos temporales, incluido el hipocampo, para controlar una epilepsia intratable. La amnesia de HM incluía una pérdida severa de memoria espacial, que fue evidente inmediatamente después de su operación y persistió durante meses (Scoville y Milner, 1957) y años más tarde. A modo de ejemplo, no podía encontrar el camino a casa solo, ni podía recordar dónde se guardaban en su hogar los objetos de uso continuo (Scoville y Milner, 1957). Un hallazgo clave posterior, en la década de 1970, fue el de O'Keefe y Dostrovsky quienes encontraron células que exhiben actividad específica de la ubicación espacial en el hipocampo de la rata, y las denominaron "células de lugar" (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). Este descubrimiento llevó a la hipótesis de que el hipocampo almacena un mapa cognitivo de la distribución espacial del entorno (O'Keefe y Nadel, 1978). Otros tipos de células que soportan la navegación, "celdas de cuadrícula" y "celdas de dirección de la cabeza", se encontraron más tarde en la corteza entorrinal de la rata, que es la entrada principal al hipocampo (Hafting y cols., 2005; Taube, 1998). Estas células forman redes con células ubicadas en el hipocampo para crear un completo sistema de posicionamiento global interno, o GPS, en el cerebro. Miller y cols. (2015), por ejemplo, mostraron que las neuronas individuales en la corteza entorrinal humana se activan en la misma ubicación relativa a través de múltiples rutas durante una tarea de navegación virtual (Miller y cols., 2015).

Los estudios de lesión y estimulación proporcionan otra línea de evidencia de la importancia del hipocampo y las estructuras adyacentes en la memoria espacial en roedores (Albasser y cols., 2013; Kesner y cols., 2015; Morris y cols., 2012) y humanos (Smith y cols., 2011; Spires y cols., 2001; Suthana y cols., 2012). Normalmente, las lesiones en el sistema del hipocampo deterioran el rendimiento de la memoria espacial en una variedad de tareas y la estimulación mejora el

rendimiento de esta. Sin embargo, las lesiones en la corteza perirrinal solo producen resultados inconsistentes, con algunos estudios que muestran un rendimiento deficiente en tareas espaciales (Liu y Bilkey, 1999, 2001), mientras que en otros la memoria espacial está bien preservada (Bussey y cols., 2001; Machin y cols., 2002; Ramos, 2013). Por lo tanto, el daño a la corteza perirrinal puede ser menos perjudicial para la memoria espacial en comparación con las lesiones del hipocampo o de las cortezas parahipocampales y entorrinal.

En los seres humanos, gran parte de lo que sabemos sobre la neurocognición en general, y la memoria espacial en particular, proviene de estudios en personas con epilepsia del lóbulo temporal. Los primeros estudios indicaron la lateralización de la participación del hipocampo en la memoria. Se pensó que el lóbulo temporal medial derecho estaba asociado con el recuerdo de la información visual y las relaciones espaciales (Abrahams y cols., 1997; Maguire y cols., 1997; Pigott y Milner, 1993). En contraste, con el lóbulo temporal medial izquierdo que estaba asociado con el recuerdo de material verbal (Hermann y cols., 1997; Martin y cols., 2002). Sin embargo, hallazgos más recientes respaldan la participación de los lóbulos temporales mediales derecho e izquierdo en la memoria espacial (Glikmann-Johnston y cols., 2008; Zeidman y cols., 2012; Canovas y cols., 2011).

El estriado es el componente más grande de los ganglios basales e incluye el núcleo caudado, el putamen, así como el estriado ventral, que incluye el núcleo accumbens, las partes adyacentes del caudado, el putamen y el cerebro anterior basal. El estriado ventral recibe proyecciones extensas del hipocampo (Chersi y Burgess, 2015). En roedores, las lesiones del cuerpo estriado y las manipulaciones neurofarmacológicas producen déficits significativos en una variedad de tareas de aprendizaje espacial y de memoria (Devan y White, 1999; Sargolini y cols., 2003; Pooters y cols., 2016).

1.6. EPIGENÉTICA

La epigenética es un término acuñado por Waddington para referirse al conjunto de procesos de regulación de la expresión génica, que no incurren en cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN y que tienen un carácter heredable (Waddington, 1957). Hasta la fecha se han descrito 3 mecanismos que participan en forma importante en la regulación génica: 1) la modificación de histonas, 2) la metilación del ADN y, 3) los ácidos ribonucleicos (ARN) no codificantes. Entre estos, la modificación de histonas es el proceso más ampliamente conocido y relacionado con un importante número de enfermedades neurológicas (Waddington, 1953; Malecová y Morris, 2010; Alka y Piero, 2011; Day y Sweatt, 2012).

La formación de memoria requiere de la activación de los receptores glutamatérgicos, ionotrópicos y metabotrópicos, lo que a su vez, conlleva a cambios sinápticos funcionales y estructurales, que requieren alteraciones en la expresión génica (Guan y cols., 2002). La regulación del proceso de transcripción depende del estado de empaquetamiento de la cromatina que permite o no a la maquinaria transcripcional acceder hasta el DNA.

La cromatina, que es un complejo macromolecular dinámico formado por nucleosomas. Un único nucleosoma (Figura 5) se compone de un fragmento de ADN (146pb) enrollado alrededor de un octámero de histonas formado por cuatro núcleos de histonas: un tetrámero H3-H4 y dos dímeros H2A-H2B. Cuando las enzimas que regulan las modificaciones post traduccionales de las histonas actúan de manera conjunta con proteínas co-activadoras y factores de transcripción, se promueve la apertura de la cromatina (eucromatina) y el acceso de la maquinaria transcripcional hasta el DNA, lo que induce la transcripción génica, mientras que en conjunto con factores co-represores, promueven la condensación de la cromatina (heterocromatina) y reprime la expresión génica (Gräff y cols., 2011).

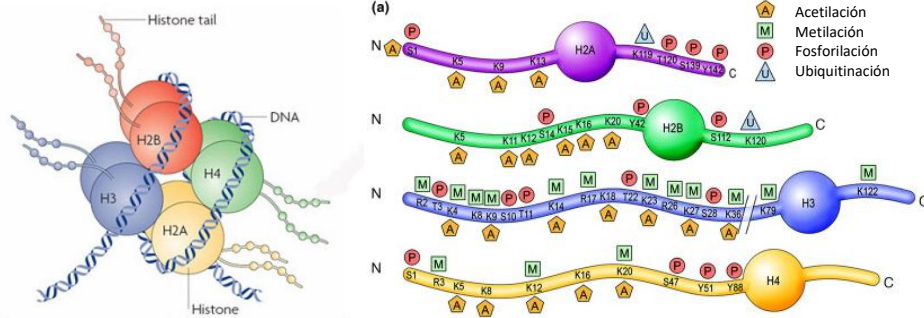


Figura 5. Modificaciones epigenéticas en las histonas que contribuyen a la remodelación de la cromatina. A) Esquema general del nucleosoma: ubicación del tetrámero H3-H4 y de los dímeros H2A-H2B. Este es un octámero de dos moléculas de cada histona H2A, H2B, H3 y H4, envuelto alrededor de 147 pb de ADN. Ac, residuos de lisina acetilada en los extremos N- terminales de las histonas. B) Representación esquemática de los extremos N y C de las histonas centrales con sus principales modificaciones post traduccionales. M representa mono-metilación, bi-metilación o tri-metilación. Modificado de Franklin y Mansuy, 2010.

El tipo de histonas presentes en la cromatina, sus cambios post traduccionales y la metilación del DNA regulan dinámicamente este proceso. Las enzimas que regulan las modificaciones post traduccionales de las histonas incluyen a) las acetil-transferasas (HATs) y desacetilasas (HDACs) de histonas, que regulan el balance entre acetilación y desacetilación en residuos de lisina; b) las proteínas quinasas (PKs) y fosfatasa (PPs), que regulan la fosforilación de residuos de serina treonina y tirosina y c) las metiltransferasas (HMTs) y demetilasa (HDMTs) de histonas que modulan la metilación, di-metilación o tri-metilación de sus residuos de lisina o arginina.

1.7. MEMORIA, ACETILACIÓN Y DESACETILACIÓN DE HISTONAS

La evidencia reciente ha demostrado que los mecanismos epigenéticos, a través de la acetilación/desacetilación de histonas, están relacionados con los procesos de aprendizaje y la memoria. La acetilación de histonas en la memoria de largo plazo implica a la proteína de unión a CREB (CBP), un coactivador transcripcional con actividad HAT endógena (Goodman y Smolik, 2000). Una deficiencia de CBP en el cerebro del ratón perjudica la memoria de miedo contextual y afecta la

adquisición de memoria espacial y el reconocimiento de objetos (Korzus y cols., 2004; Alarcon y cols., 2004). Estos estudios informaron que la acetilación de histonas regula la función cognitiva dependiente de hipocampo (Levenson y Sweatt, 2005; Jarome y Lubin, 2014) y un desequilibrio en las enzimas HAT/HDAC puede alterar los niveles celulares de histonas acetiladas que regulan la transcripción génica (Saha y Pahan, 2006; Peserico y Simone, 2011). En ratones control, tal desequilibrio a favor de HAT inducido por la inhibición de HDAC con butirato de sodio mejora el reconocimiento de objetos familiares y prolonga la memoria de objetos (Stefanko y cols., 2009). Además, la infusión intra-amígdala de butirato de sodio (NaB) o tricostatina A (TSA) aumenta la memoria de la tarea de sobresalto potenciado por el miedo (Yeh y Lin, 2004), y la TSA infundida en el hipocampo mejora el condicionamiento del miedo contextual, pero se cree que recluta la CBP a través de un complejo transcripcional de CREB / CBP (Vecsey y cols., 2007).

Actualmente se han encontrado 11 isoformas de las HDAC, las cuales se dividen en cuatro clases principales: clase I (HDAC1-3 y 8), clase II (HDAC4-7, 9 y 10), clase III (Sirtuinas 1-7), clase IV (HDAC11); siendo las clases I, II y IV dependientes de zinc (Baltan y cols., 2011; Choi y Howe, 2009). Aunque existen varios tipos de HDACs en el cerebro, se ha propuesto que HDAC2 es uno de los más importantes para la regulación de la memoria. Estudios previos han demostrado que HDAC2 regula negativamente la plasticidad sináptica estructural y funcional, así como la formación de memoria dependiente de hipocampo (Guan y cols., 2009; Morris y cols., 2013). Un mecanismo adicional que puede controlar la actividad de HDAC2 (dependiente de la fosforilación de S211) en el cerebro es la regulación transcripcional por la señalización del receptor de glucocorticoides (GR) que se correlaciona con la aparición de defectos cognitivos, (Penney y Tsai, 2014; Gräff y cols., 2012). Las HDACs adicionales que se han estudiado parecen desempeñar roles más específicos en ciertos tipos de memoria. Por ejemplo, la eliminación focal de HDAC3 del área CA1 del hipocampo mejora la memoria de ubicación de objetos en ratones (Stefanko y cols., 2009; McQuown y cols., 2011),

mientras que la supresión de HDAC4 específica del prosencéfalo causa varios defectos conductuales y de plasticidad, y los ratones nulos de HDAC5 no muestran comportamiento de alterancia condicionada (Kim y cols., 2012). Los ratones que carecen de HDAC6 muestran un aprendizaje normal del miedo, pero mejoran el aprendizaje espacial (Govindarajan y cols., 2013). Aunque HDAC1 no juega un papel importante en la plasticidad sináptica del hipocampo o en la formación de la memoria, promueve la extinción de recuerdos de miedo recientemente formados (Bahari-Javan y cols., 2012).

Se ha descrito que distintas formas de entrenamiento inducen la acetilación de histonas en distintas regiones del cerebro y que la administración de fármacos inhibidores de las HDACs favorece la consolidación de la memoria. Por ejemplo, varias cepas de ratones mutantes para CBP (CREBBP) muestran déficit en la memoria y la plasticidad sináptica y los fármacos que inhiben la actividad de las HDACs aumentan la potenciación a largo plazo (LTP, a través de los receptores de NMDA y de MEK) en hipocampo (Alarcon y cols., 2004; Korzus y cols., 2004). En forma compatible con estas observaciones, la administración de los inhibidores de las HDACs (fenilbutirato, PB o TSA) revierte los déficits de aprendizaje en los ratones transgénicos que muestran pérdida de sinapsis (Fischer y cols., 2007). Estos efectos fueron atribuidos a la HDAC 2 y la HDAC 3 como reguladores negativos de la formación de la memoria en lugar de la HDAC1 a través de la utilización de los ratones que sobre-expresan o carecen de estas enzimas (Guan y cols., 2009; McQuown y cols., 2011; Gräff y cols., 2012). Por otro lado, el PB revierte los déficits de memoria en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer (Tejedor y cols., 2013), mientras que la administración de inhibidores de las HDACs de tipo I,II y IV, como la TSA o el NaB favorece la consolidación de la memoria espacial (Dagnas y cols., 2015; Villain, Florian y Rouillet, 2016). Es posible que es te efecto de mejora en la consolidación de la memoria espacial inducido por la inhibición de las HDACs sea mediado específicamente por el bloqueo de HDAC2, pues esta enzima regula negativamente la expresión de genes como Bdnf, Egr1, cFos, Camk2a, Creb, Cbp, Sinapsina 2, Psd 95, Grin2a y

Grin2b en el hipocampo y su sobre expresión deteriora la consolidación de la memoria espacial (Guan y cols., 2009).

Tabla 1. Acetilación de histonas, inhibidores de las HDACs y consolidación de la memoria.

Proceso	Tarea	Mecanismo	Referencias
Memoria dependiente de hipocampo	Memoria espacial	El entrenamiento induce aumento de la acetilación de las histonas H3 (K14) y H4 (K12) en el hipocampo de roedores. La administración de TSA y NaB mejora la memoria.	Bousiges y cols., 2013; Dagnas y Mons, 2013; Dagnas y cols., 2015.
	Condicionamiento de miedo al contexto	El entrenamiento induce aumento de la acetilación de la histona H3 en el hipocampo de roedores. La administración de TSA y NaB mejora la memoria.	Levenson y cols., 2004; Vecsey y cols., 2007
	Localización de objeto novedoso	El entrenamiento induce aumento de la acetilación de las histonas H3 (K14) y H4 (K5) en el hipocampo. La administración de TSA, NaB o MS275 mejora la memoria.	Fontán-Lozano y cols., 2008; Hawk, Florian y Abel, 2011.
Memoria independiente de hipocampo	Condicionamiento del miedo a los estímulos	El entrenamiento induce aumento de la acetilación de histona H3 en la amígdala basolateral. La administración de TSA, NaB o VPA mejora la memoria.	Yeh, Lin y Gean, 2004; Bredy y Barad, 2008; Fontán-Lozano y cols., 2008; Monsey y cols., 2011

Abreviaturas: TSA: tricostatina A; NaB: butirato de sodio; VPA: ácido valproico.

CAPÍTULO 2

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Los efectos deletéreos del estrés agudo sobre la memoria dependiente de hipocampo, producirá cambios en la expresión de la Histona Desacetilasa Isoforma 2 (HDAC2) y los niveles de corticosterona en plasma ?

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de la inhibición de la HDAC2 sobre la acción deletérea del estrés agudo en la consolidación de la memoria en tareas dependiente de hipocampo de ratones machos de la cepa CD1.

Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto del estrés agudo sobre el aprendizaje y la consolidación de la memoria en tareas dependientes de hipocampo: laberinto elevado en T (LET) y localización de comida enterrada (PLCE).
- Determinar la concentración de corticosterona circulante inducida por una sesión estresante.
- Determinar la expresión de la HDAC2 en hipocampo provocada por la adquisición de las tareas LET y PLCE en ratones CD1 sometidos a una sesión estresante por nado.
- Evaluar el efecto de la inhibición sistémica de las desacetilasas de histonas de tipo I con IN14 y PB sobre la actividad deletérea del estrés agudo en el aprendizaje y la consolidación de la memoria.

Para responder la pregunta de investigación nos planteamos dos objetivos previos mostrados en el capítulo 3 y 4 con la finalidad de complementar el proyecto establecido.

CAPITULO 3

El diseño y la síntesis de nuevas moléculas que puedan ser utilizadas a nivel terapéutico involucra una etapa de cernimiento que permita reducir el tiempo de evaluación farmacológica y su costo. En los últimos años, se ha visto que un solo fármaco puede tener uno o varios efectos, mismos que pueden ser utilizados en diversas áreas terapéuticas. En el caso de los inhibidores de las HDACs, estas han sido utilizados en psiquiatría y neurología, más recientemente, han sido empleados como mitigadores en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, el uso clínico de los inhibidores de las HDACs es reducido debido a poca afinidad hacia la enzima objetivo.

OBJETIVO: diseñar y sintetizar un nuevo inhibidor de la HDACs con un mejor potencial terapéutico y selectividad hacia la enzima HDAC isoforma 2, mediante metodología *in silico*.

“EI IN14, un nuevo inhibidor de las HDACs de clase I”

EXPERIMENTO 1. Publicado en Medicinal Chemistry Research, January 2018, Volume 27, Issue 1, pp 206–223.

Design (Docking and QSAR Studies) and Synthesis of Histone Deacetylase 2 (HDAC2) Inhibitors Series

Heidy Martínez-Pacheco¹ · Judith Espinosa-Raya² · Ofir Picazo² · Omar Viñas Bravo³ · Guillermo Ramírez-Galicia³ · Gabriel Roldán-Roldán¹

✉ Heidy Martínez-Pacheco
Heidymartinezp@gmail.com

Design (Docking and QSAR Studies) and synthesis of histone deacetylase 2 (HDAC2) inhibitors series

Heidy Martínez-Pacheco¹ · Judith Espinosa-Raya² · Ofir Picazo² · Gabriel Roldán-Roldán¹  · Omar Viñas-Bravo³ · Guillermo Ramírez-Galicia³

Received: 25 February 2016 / Accepted: 28 August 2017 / Published online: 12 September 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract In recent years, it has been shown that histone deacetylase 2 (HDAC2) inhibitors increase histone acetylation and enhance memory processes, probably due to an increase in the gene transcription rate that emerges during memory formation. Histone acetylation generally favors long-term memory, whereas histone deacetylation impinges on it. However, until today there is no specific drug that can target the HDAC2 active site. In this work we applied the method of rational drug design, through enzyme-structural-chemical properties to generate new molecules as HDAC inhibitors. By the application of Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) and molecular modeling methodologies our aim is to predict more potent HDAC inhibitors. 76 small molecules with potential activity were analyzed using QSAR methodology. The best model was constructed by merging the properties of electronegativity, atomic mass, polarizability, van der Waals forces and some conformational aspects, with the following statistical parameters: $r^2 = 0.8935$, $q^2_{LOO-CV} = 0.8498$, and $q^2_{LGO-CV} = 0.7598$. The molecular docking of the ligands on the template was performed by blind docking. The results showed

intermolecular interactions between small molecules and some amino acids, such as His145, His146, Asp179, Asp186, and internal-H₂O and Zn²⁺ of which IN01, IN04, and IN14 showed theoretically better biological activity compared with that of TSA and SAHA. Mainly, the IN14 synthesized molecule is a theoretical inhibitor of HDAC class I.

Keywords Rational design · QSAR studies · Docking studies · HDAC2 · Cognitive impairment

Introduction

Research in recent years has raised the notion that epigenetic mechanisms, which exert lasting control over gene expression without altering the genetic code, may mediate fixed changes in brain function implicated in memory formation, since storage involves changes in synaptic and structural functions that lead to alterations in gene expression (Anne et al. 2001; Guan et al. 2002). The mechanisms underlying this process are still unknown. One epigenetic mechanism recently recognized as a key to regulating gene expression is chromatin remodeling, especially through histone acetylation, in which the compact chromatin structure is altered, changing the accessibility of DNA to regulatory proteins (Kurdistani and Grunstein 2003; Goldberg et al. 2007). Histone deacetylases (HDAC) are a type of enzyme that removes acetyl groups from ε-N-acetyl lysine on a histone, allowing the histones to wrap the DNA more tightly.

Two categories of HDACs have been identified so far: the “zinc dependent” and the “nicotinamide-adenine-

✉ Heidy Martínez-Pacheco
heidymartinezp@gmail.com

¹ Departamento de Fisiología, Laboratorio de Neurobiología Conductual, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico

² Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Salvador Díaz Mirón s/n, Casco de Santo Tomás, 11340 Ciudad de México, Mexico

³ Instituto de Química Aplicada, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central 200, Parque Industrial, Tuxtepec, 68301 Oaxaca, Mexico

dinucleotide (NAD)-dependent" sirtuin proteins. The zinc-dependent HDAC category is composed of class I (HDACs 1, 2, 3, and 8), IIa and IIb (HDACs 4, 5, 6, 7, 9, and 10), as well as IV (HDAC 11). Class I HDACs are mostly located within the nucleus with the exception of HDAC3, which can shuttle out to the cytoplasm. HDAC1, HDAC2, and HDAC3 are expressed in brain regions that are associated with learning and memory. Class II HDACs can leave the nucleus to modify nonhistone proteins. Little is known about class IV HDAC, HDAC11, as data have yet to emerge about their role in the adult brain (Gibson and Murphy 2010; Haberland et al. 2009). A separate family of HDACs referred to as sirtuin proteins make up class III HDACs; this type of HDACs possesses deacetylase activity, but functions via a different mechanism from that of the rest of the HDAC family (Michan and Sinclair 2007; Finkel et al. 2009). Specifically, the HDAC isoform 2 (class I HDAC) plays an important role in the modification of chromatin structure and regulation of gene expression. Guan et al. (2009) and Gräff et al. (2012) demonstrated that HDAC2 binds to the promoters of multiple genes critical to synaptic plasticity and to genes known to be regulated in an activity-dependent manner, where the overexpression of HDAC2 impairs synaptic plasticity; whereas loss of HDAC2 function facilitates synaptic plasticity. Together, these data indicate an inverse relationship between levels of HDAC2 and synapse numbers, which in turn affects synaptic plasticity, as well as learning and memory (Guan et al. 2009). These topics have shown that the damaging effects of HDAC2 overexpression can be offset by treatment with HDAC inhibitors; for example, SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid or Vorinostat) was able to improve memory and decrease the levels of expression of HDAC (Guan et al. 2009). Hence, these results suggest that HDAC2 inhibitors may improve synaptogenesis and memory consolidation. In further support of this notion, virus-mediated delivery of a short-hairpin-RNA (shRNA) that selectively targets HDCA2 in the hippocampus of adult mice was sufficient to restore synaptic plasticity deficits, enhance synaptogenesis, and ameliorate behavioral deficits in a mouse model of neurodegeneration (Gräff et al. 2012). On the other hand, HDAC3 has been established as a memory suppressor (McQuown et al. 2011). These data provide clear evidence for a role of HDCA-containing co-repressor complexes in the epigenetic regulation of synaptic plasticity and memory organization. Notably, it has been shown that the non-selective HDAC inhibitors sodium butyrate (SB) and sodium phenylbutyrate (SPB) reset learning ability and promote recovery of long-term memory even after massive neuronal loss (Fischer et al. 2007). The inhibitor, SPB, should independently reverse spatial learning and memory deficits in a model of Alzheimer's Disease (AD) suggesting that this drug may have more or less

efficacy in its treatment (Ricobaraza et al. 2009). Different HDACs appear to have specific roles in different types of learning and memory regulation. Bahari-Javan et al. (2012) demonstrated that fear memory extinction is impaired by pharmacologically (MS-275) inhibiting class I HDAC. Hait et al. (2014) have reported that the phosphorylated form of FTY720 (fingolimod) inhibits class I HDAC activity and facilitates fear extinction memory.

In order to discover potent HDAC inhibitors as a new therapeutic tool for cognitive impairment, our work group developed a series of novel carboxylic acids that may exert strong inhibitory activity against these enzymes. Through the generation of a Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) model by Artificial Neural Networks (ANN), which have been viewed as the most reliable method to anticipate the theoretical outcome of a novel chemical compound, the docking approach was used to ascertain the best compounds and investigate the interactions of HDAC2. The best theoretical compound was synthesized.

Materials and methods

Database

The compounds used to build QSAR models were divided into training, prediction and validation sets by the activity value. As is customary, the IC_{50} values were transformed to pIC_{50} values ($pIC_{50} = -\log IC_{50}$) and used as dependent variables in the QSAR calculations. The training set was formed by 54 hydroxamic acid derivatives selected from the results of Juvalé et al. (2006). These compounds were selected in such a way as to contained information in terms of both their structural features and biological activity ranges that could provide critical information on pharmacophore requirements, in order to predict more potent HDAC inhibitors. The structure and activity data of these compounds are listed in Table 1. The great majority of HDAC inhibitors reported in literature generally consist of a Zn^{2+} -binding group and a five- or six- carbon hydrophobic spacer attached to a hydrophobic group via a connection unit (Yoshida et al. 1990). Trichostatin A (TSA) and SAHA (hydroxamic acids) are potent HDAC inhibitors and are a well-known example of this design (Fig. 1).

The prediction set is formed by 14 molecules that were designed based on the chemical structure and activity mechanism of HDAC class I and II (Table 2), including the long chain found in the lysine substrate, as well as in these molecules, which should make several favorable contacts with the hydrophobic residues of the protein lining this channel. The carboxylic acid group that binds to the Zn^{2+} center in the active site is located at the bottom of this

Table 1 Structures and biological activities of hydroxamate analogs (training set)

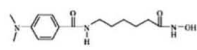
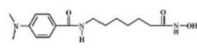
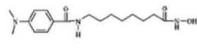
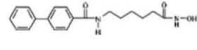
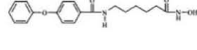

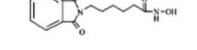
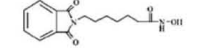
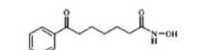
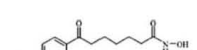



Molecule	Structure	pIC_{50} Experimental ^a	Predicted activity ^b	Difference
MOL1		7.300	7.061	-0.239
MOL2		8.00	7.258	-0.742
MOL3		7.540	7.477	-0.063
MOL4		7.280	7.848	0.568
MOL5		7.360	7.686	0.326
MOL6		6.950	6.983	0.033
MOL7		6.990	7.027	0.037
MOL8		7.150	7.293	0.143
MOL9		6.300	6.638	0.338
MOL10		6.350	7.428	1.078
MOL11		6.820	7.006	0.186
MOL12		7.300	7.178	-0.122
MOL13		7.020	6.735	-0.285

Table 1 continued

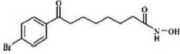
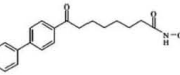
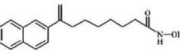
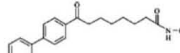
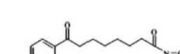
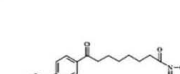
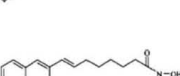
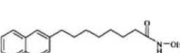
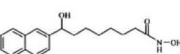
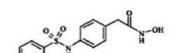
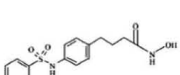
Molecule	Structure	pIC_{50} Experimental ^a	Predicted activity ^b	Difference
MOL14		7.350	7.487	0.137
MOL15		8.300	8.241	-0.059
MOL16		8.100	8.059	-0.041
MOL17		8.700	8.684	-0.0159
MOL18		8.020	7.605	-0.415
MOL19		8.350	8.501	0.151
MOL20		8.220	8.197	-0.023
MOL21		7.600	7.679	0.079
MOL22		7.460	7.907	0.447
MOL23		6.000	5.698	-0.302
MOL24		6.000	6.202	0.202

Table 1 continued

Molecule	Structure	pIC_{50} Experimental ^a	Predicted activity ^b	Difference
MOL25		6.700	6.442	-0.258
MOL26		5.700	6.240	0.540
MOL27		4.770	5.754	0.985
MOL28		7.120	6.375	-0.745
MOL29		7.000	7.304	0.304
MOL30		6.520	6.513	-0.007
MOL31		6.150	6.296	0.146
MOL32		6.100	-	-
MOL33		6.220	6.749	0.529
MOL34		6.520	6.387	-0.133

Table 1 continued

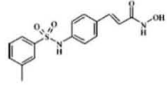
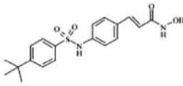
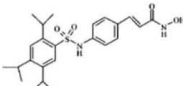
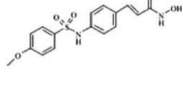
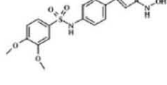
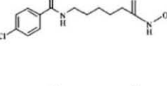
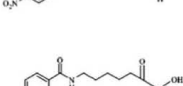
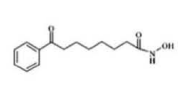
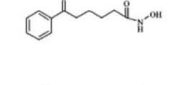
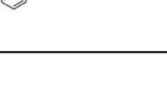

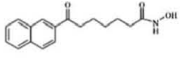
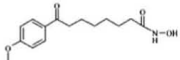
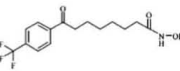
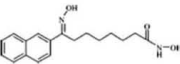
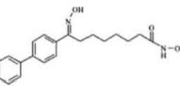
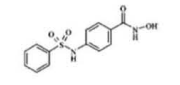
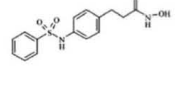
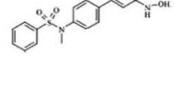
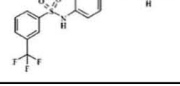
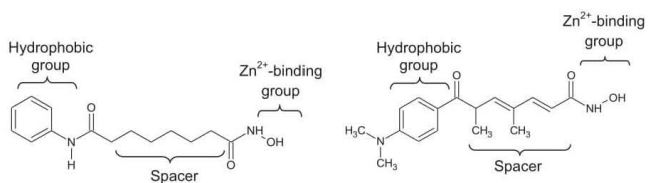
Molecule	Structure	pIC_{50} Experimental ^a	Predicted activity ^b	Difference
MOL35		7.000	6.703	-0.297
MOL36		7.000	6.846	-0.154
MOL37		6.220	6.450	0.230
MOL38		7.220	6.958	-0.262
MOL39		7.050	-	-
MOL40		7.130	6.963	-0.167
MOL41		6.520	6.651	0.131
MOL43		7.520	7.347	-0.173
MOL44		5.820	6.324	0.504
MOL45		7.190	6.795	-0.395
MOL46		6.870	7.012	0.142

Table 1 continued

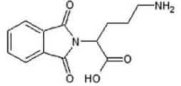
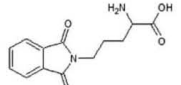
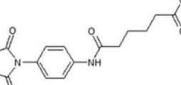
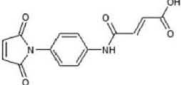
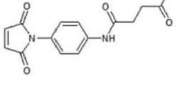
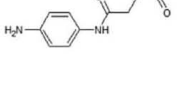
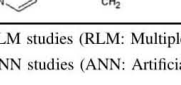
Molecule	Structure	pIC_{50} Experimental ^a	Predicted activity ^b	Difference
MOL47		7.460	7.694	0.235
MOL48		7.820	7.420	-0.399
MOL49		7.350	7.037	-0.313
MOL51		8.070	7.783	-0.287
MOL52		8.400	7.890	-0.510
MOL53		6.050	5.639	-0.412
MOL54		7.000	6.571	-0.429
MOL55		6.220	6.397	0.177
MOL56		7.000	6.768	-0.232

^a Observed activity, normalized pIC_{50} values^b Predicted activities from ANN

Fig. 1 SAHA and TSA**Table 2** Structures and biological activities of carboxylic acid analogs (prediction set)

Molecule	Structure	^a pIC ₅₀ RLM	^b pIC ₅₀ ANN	Difference
IN01		8.707	8.739	-0.032
IN02		8.184	7.938	0.246
IN03		9.000	8.512	0.488
IN04		8.909	9.014	-0.105
IN05		9.280	8.646	0.634
IN06		8.999	8.667	0.332
IN07		8.787	8.680	0.107

Table 2 continued

Molecule	Structure	^a <i>pIC</i> ₅₀ RLM	^b <i>pIC</i> ₅₀ ANN	Difference
IN08		7.810	8.969	-1.159
IN09		7.184	8.771	-1.587
IN10		7.829	7.479	0.35
IN11		8.589	8.946	-0.357
IN12		8.681	8.860	-0.179
IN13		9.069	8.657	0.412
IN14		9.054	8.717	0.337

^a Predicted activities from RLM studies (RLM: Multiple Linear Regression)

^b Predicted activities from ANN studies (ANN: Artificial Neural Networks)

channel. Just adjacent to the channel, there is a 14 Å deep internal cavity formed by Arg, Tyr, and Cys residues. This internal cavity is thought to be a common structural feature of class I HDACs, at least for the HDAC1, HDAC2, and HDAC3 isoforms which have high sequence similarity (Wang 2009). The test set was built from 10 HDAC inhibitors, which were already available on the market with their respective *pIC*₅₀ and have been extensively studied in neurodegenerative and mood disorder models (Table 3).

Molecular modeling

The ligands were built using the ChemDraw Ultra module of the CS ChemOffice 2005 molecular modeling software version 9, supplied by Cambridge Software Company. Each molecule was “cleaned up” by minimizing the structures for minimum energy after applying force fields to the ligands. All molecules were optimized using the semiempirical

Table 3 Structures and biological activities of histone deacetylase inhibitors class I and II (validation set)

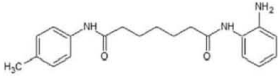
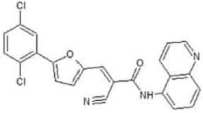
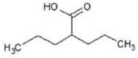
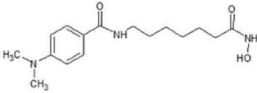
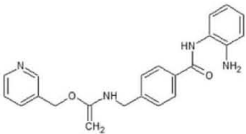
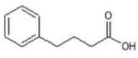
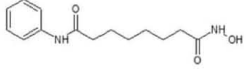
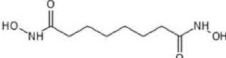
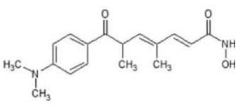
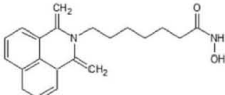
Molecule	Structure	pIC_{50} Experimental ^a	Predicted activity ^b	Difference
106		6.830	8.339	1.509
AGK2		5.500	9.850	4.350
AVP		3.770	2.903	-0.867
M344		7.030	7.638	0.608
MS275		6.700	8.247	1.547
PB		3.800	5.281	1.481
SAHA		7.860	7.314	-0.546
SBHA		5.340	6.498	1.158
TSA		7.770	7.547	-0.223

Table 3 continued

Molecule	Structure	pIC_{50} Experimental ^a	Predicted activity ^b	Difference
Scriptaid		8.190	7.734	-0.456

^a Observed activity, normalized pIC_{50} values

^b Predicted activities from QSAR studies

AVP valproic acid, PB sodium phenylbutyrate, SAHA suberoylanilidehydroxamic acid, Suberoyhydroxamic Acid, TSA trichostatin A

method AM1 (Dewar et al. 1993), using the Gaussian 03 program (Frisch et al. 2003).

Protein preparation

The crystal structure of the HDAC2 (PDB: 4LKZ) was obtained from the protein database site (<http://www.rcsb.org/pdb>). The receptor protein was prepared using PyMOL (2010) software by deleting cofactors, ligands and adding hydrogens. The crystal structure of the HDAC2 includes three chains labeled A, B, and C.

Docking

The AUTODOCK (Morris et al. 1998) program was used for the docking method, with the evaluation function Lamarckian, leaving genetic algorithm parameters by default. For this study, chain A was selected for docking methodology and the active sites were created. The 78 ligands taken from our database were docked in the active site of the chain-A-4LKZ structure, and their scores were compared with those of the docking of SAHA, AVP, SBHA, SPB, NaB, AGK2, TSA, and Scriptaid.

QSAR

The best molecular conformation of ligands obtained from our molecular docking study was considered as the new data set. These compounds (hydroxamate analogs and carboxylic acid) were selected in order to quantitatively correlate and summarize the relations between chemical structure alterations and relevant changes in the biological endpoint to determine the chemical properties that are the most likely determinants of the biological activities of the untried compounds (Murgueitio et al. 2012). Several molecular descriptors were calculated using DRAGON (Todeschini et al. 2002) software, followed by a Multiple Linear Regression (MLR) and an Artificial Neural Network (ANN) methodology, which can be applied to derive correlation models between the

molecular structures and attributes. It is noteworthy that the accepted MLR models were optimized using ANN with back-propagation of the error algorithm. This ANN subroutine was written in MATLAB version 7.2.0 (Caballero and Fernández 2008). The optimality of the linear models was determined by applying the *t* statistic (models with all absolute values of 4.0 were accepted), as well as the overall *F* statistic tests. The accepted linear models were subjected to a cross-validation (CV) analysis by Leaving One Out (LOO-CV) and Leaving Group Out (LGO-CV) methodologies in which a compound and a group are removed from the data set, and their actions are predicted using the model derived from the residual of the set of molecules employed. The optimal number of factors utilized to derive invalidated models was determined as the number of components that generated the greatest cross-validation and the least standard error of prediction. The LOO-CV and LGO-CV algorithms were written in MATLAB.

Synthesis of IN14

All chemicals and solvents were of analytical reagent grade and were used as received. The *m/z* (mass-charge ratio) spectrum was obtained on a Bruker Daltonics micrOTOF-Q II mass spectrometer with a resolution of 17,500–20,000 FWHM. ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were obtained on a Varian Mercury spectrometer at 400 and 100 MHz, respectively, using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*₆) as the solvent. Reactions were monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) on aluminum-backed sheets with silica gel 60 GF₂₅₄ (CAS #: 7631-86-9) with a fluorescent indicator, and visualized with a UV light lamp (254 nm). Flash chromatography was performed using silica gel 60 (230–400 mesh).

IN14 compound was prepared by adding the maleic anhydride (1 mmol) drop wise to a suspension of isonicotinic acid hydrazide (1 mmol) in tetrahydrofuran (5 ml). The reaction was maintained at ambient temperature with continuous stirring for 3 h (Fig. 2) and a white solid (IN14

Fig. 2 Synthesis of the target compound IN14 ((2E)-4-oxo-4-[2-(pyridin-4-ylcarbonyl)hydrazinyl]but-2-enoic acid). Reagents: isonicotinic acid hydrazide (A), anhydride maleic (B)

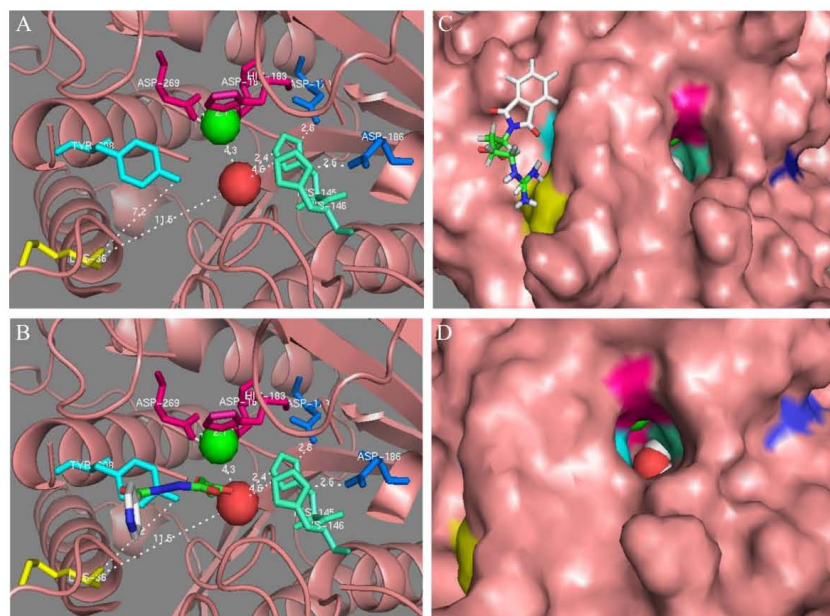
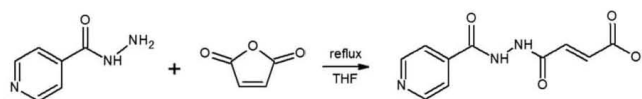


Fig. 3 Stereo view of the docked conformation of the IN01 and IN14 compounds. **a** Residues that make up the active site of the enzyme HDAC2. **b** The amino acids Lys36, His145, His146, Asp179, Asp182, His183, Asp186, Asp269, and Tyr308 were involved in interaction with compound IN14. **c** IN01 was bound to the adjacent pocket next to

the active site. **d** Hydrophobic channel of the HDAC2. Lys36 (yellow), Asp182, His183 and Asp269 (pink), His145 and His146 (green/cyan), Asp179 and Asp186 (blue), and Tyr308 (cyan); H₂O-791 (red sphere); Zn²⁺ ion (green sphere), distances Å (white dashed lines) (color figure online)

compound) was filtered, rinsed with EtOH, dried under reduced pressure and recrystallized with MeOH.

Compound IN14: white solid, mp: 90–95 °C; Yield: 93%; Anal. Calc. for C₁₀H₉N₃O₄: 235.1964 u. Found HRMS (ESI) for C₁₀H₉N₃O₄ + ¹H: 236.0743 u. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆; δ .p.p.m.): 13.0 (OH), 11.0 (NH), 7.8–8.8 (m, 4 H, pyridine ring protons), 6.3–6.5 (d, CH=CH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆; δ p.p.m.): 167.578–163.510 (C=O), 150.160–121.813 (aromatic carbons), 133.398–127.066 (CH=CH).

Results and discussion

The catalytic site is the focus of the docking study of the interaction between HDAC2 and its inhibitors. The

potential active site is not readable, except through some key residues such as Asp, His, and Tyr, which sustain a tight relationship with inhibition activities (Van Ommeslaeghe et al. 2005). Broadly speaking, the active site is the pocket formed by a series of conservative amino acids. As shown in Fig. 3d, the active site is a hydrophobic channel where the aliphatic chain stabilizes the pocketed entrance and the aromatic ring blocks.

All ligands (78 molecules) were docked in the active site of the chain-A-4LKZ structure. The docking results show that most of the ligands have good binding interaction with HDAC2 (Table 2) except for two molecules (MOL32 and MOL39) of the training set because they do not dock at the site of HDAC2 inhibition. The structure of the A-chain-monomer shows the Lys36 (*e*-acetyl) of the substrate protruding into the active site cavity and the interaction with

Table 4 Multiple Linear Regression models of the training set

Model	Constant	DP06	MATS5e	Mor18e	Mor13p	GATS1e	GATS8p	GATS8e
1	0.518	0.656						
2	2.712	0.483	3.448					
3	2.74	0.595	3.825	0.673				
4	1.649	0.671	3.556	0.728	−0.905			
5	0.348	0.624	2.946	0.857	−1.038	1.48		
6	−0.967	0.541	3.317	0.721	−1.349	1.433	1.015	
7	−1.235	0.41	3.005	0.648	−1.517	1.275	1.535	0.261

Zn²⁺ ion is through its carbonyl oxygen (Fig. 3a). This residue is deacetylated by class I HDACs, the Zn²⁺ ion is complexed with the Asp181 (2.0 Å), Asp269 (1.9 Å), His183 (2.1 Å) and with a water molecule (H₂O-791, 4.3 Å); this analysis provides evidence that the zinc coordination sphere is made up of four ligands and adopts a tetrahedral coordination geometry. In addition, the water molecule (H₂O-791) forms hydrogen bonds with His145 (2.4 Å) and with the carbonyl oxygen of the ligand IN14 (2.6 Å) (Fig. 3b). His145 is part of the buried and conserved charge relay system, whereas His146 is part of the exposed putative charge relay system; This system is stabilized by Asp179 (2.6 Å) and Asp186 (2.6 Å) through electrostatic forces. From the predicted set, only the IN01 ligand has two active sites. The first one is similar to that described before (Fig. 3a), whereas the second active site is located on Lys36, approaching the first active site, which in turn is deacetylated by HDAC2 (Fig. 3c). IN14 ligand, with a docking score of −6.9 kcal/mol, shows interactions with Lys36, Try308, His183, His145, and His146 (Fig. 3b). The result reveals that Try308, Asp269, Asp181, His183, His145, His146, Asp179, Asp186, and Lys36 are common amino acids in the active site that interact with the H₂O-791 molecule, Zn²⁺ and the ligands of the training, prediction and validation sets. The results obtained in the comprehensive analysis of blind docking indicate that the best compounds were IN01, IN04, and IN14 ligands, as these compounds showed the lowest dissociation constants (*K_d*), indicating a greater affinity for the catalytic site. The lower *K_d* the lesser concentration of ligand needed to saturate the protein; hence the greater its affinity (Lehninger and Nelson 2012).

QSAR studies were initiated with the calculation of 1230 descriptors using DRAGON software following the multicollinearity tests; the number of these descriptors was reduced to 1220, belonging to 16 different theoretical types. These 1220 calculated descriptors were then analyzed for the search of constant values, resulting in the elimination of about 85% of their elements. After this process, 1116 descriptors remained. In addition, for each one of the analyzed data sets, the correlation between the constituent descriptors was investigated. Those descriptor pairs with a

Table 5 Statistical linear regression coefficients

Variable	R ²	RSS	AIC	FIT
1	0.540225	14.76592	0.28953	1.10847
2	0.609961	12.50885	0.25018	1.36837
3	0.660969	10.89707	0.22239	1.53410
4	0.707281	9.40965	0.19603	1.67005
5	0.748225	8.08053	0.17193	1.77536
6	0.777924	7.15689	0.15558	1.79129
7	0.802816	6.32438	0.14054	1.77368

Bold values represent the smallest AIC value and the highest FIT value

high collinear relationship ($r > 0.80$) were eliminated; this, in order to establish a better set of variables that are non-collinear, leaving out 151 descriptors plus 10 quantum mechanic descriptors obtained from the minimization of energy using semiempirical method AM1, and nine molecular mechanic descriptors obtained from blind docking. A linear stepwise regression was performed with the SPSS program, using the dependent variable *pIC₅₀* and 171 independent descriptors. The linear stepwise regression yielded the following seven descriptors: DP06, MATS5e, Mor18e, Mor13p, GATS1e, GATS8p, and GATS8e that establish the relationship between activity and chemical structure (Table 4).

Table 5 shows the statistical parameters of the linear relationship, where model 6 is the best according to the statistical parameters of the validation metrics for regression: squared correlation coefficient ($R^2 = 0.7779$), a $R^2 > 0.7$ reflect the model's ability to accurately predict the bioactivities in a QSAR model (MLR and PLS) according to little variation between the predicted and experimental activities (Ravichandran et al. 2011); root squared error (RSS = 7.1568), the smallest value of the Akaike information criterion (AIC = 0.1555), as with the smallest AIC are likely to have the most information regardless of the number of independent variables (Akaike 1974) and the highest value of the fitness function of Kubinyi (FIT = 1.7912). The FIT function is closely related to the *F*-statistic but proved to be a useful parameter for the assessment of the quality of the models (Kubinyi 1994). The disadvantage of the

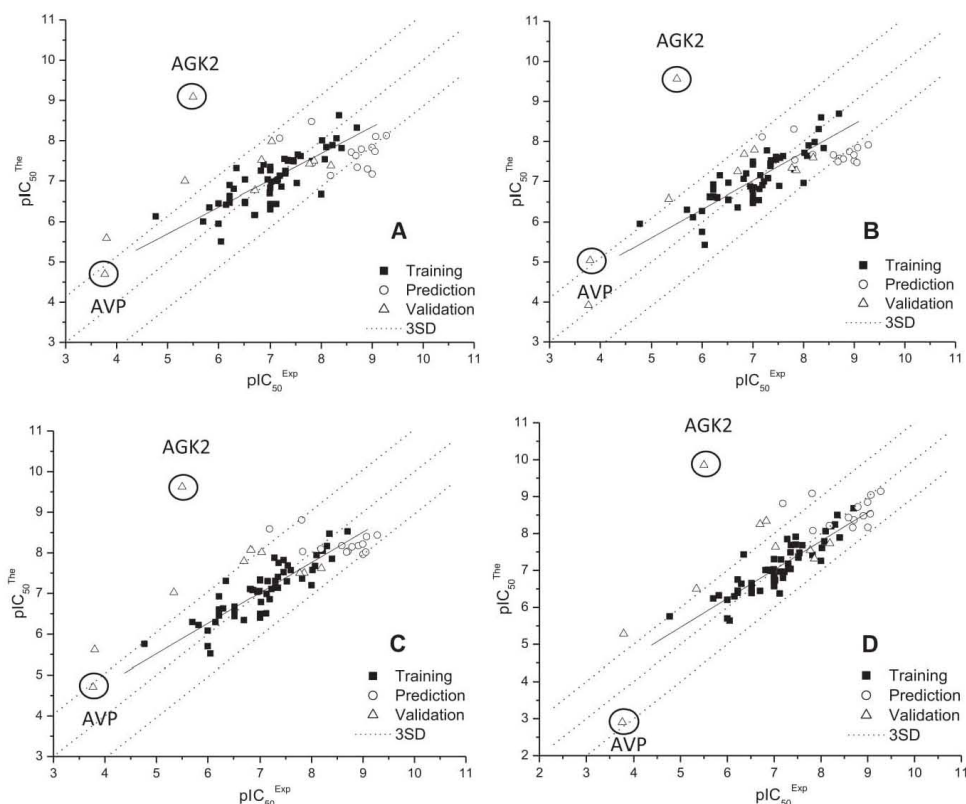


Fig. 4 Graphs of experimental vs. predicted biological activity of the test set from MLR analysis. **a** Model M76-3; **b** Model M76-4; **c** M76-5; and **d** Model M76-6. Each model was built with 52 molecules in the training (analogs of Hydroxamate) set, 14 molecules in the prediction

set (14 new HDAC inhibitors) and 10 molecules in the validation set (inhibitor class I and II). Black circles represent the most important HDAC inhibitors of the validation set (AVP, AGK2). In all cases, AGK2 is outside three standard deviations (3SD)

F -value is its sensitivity to changes in the number of independent variables.

These statistical results reveal model M76-6 to be the best one. This model included 52 hydroxamate analogs, 14 carboxylic acid derivatives, and 10 HDAC inhibitors. Equations 1 and 2 were obtained from this variable composition. Figure 4 clearly indicates that AVP and AGK2 have deficient activities compared with those of TSA, SAHA, and Scriptaid. This deficiency is the result of AVP and AGK2 as they are nonselective inhibitors of HDAC2, and do not have a bulky group in their chemical structure. On the other hand, AGK2 is a selective inhibitor of HDAC class III. Only IN01, IN04, and IN14 derivatives are within the limits set of three standard deviations of the mean (3SD). To verify that model M76-6 is the optimal model,

we determined the F -statistic Total (Eq. 1). The resulting regression coefficient of 0.882 implies that hydroxamate analogs are linearly related, thus allowing us to reject the null hypothesis that R is zero, with a regression line of zero. This model was also subjected to an analysis of cross-validation in order to determine the model's robustness and predictive ability. In this case, the cross-validation (CV) was performed in two ways, by Leave-One-Out methodology (q^2_{LOO-CV}), and by Leave-Group-Out (q^2_{LGO-CV}). From Eq. 1, q^2_{LOO-CV} value was 0.6993, whereas q^2_{LGO-CV} value was 0.5614. A q^2 value greater than 0.5 is considered acceptable (Golbraikh and Tropsha 2002). It has been shown that an appropriate value of q^2 is necessary but not sufficient to verify the predictive ability of the model. Q^2 tends to be over-optimistic, especially in those cases in

which the training set is not structurally diverse. Therefore, the best mathematical model to predict the activities of HDAC inhibitors is a function of 2D autocorrelations (MAT5e, GATS1e, and GATS8p) and 3D-MORSE descriptors (Mor18e, Mor13p) representing the properties of electronegativity and polarizability.

Training set

$$pIC_{50}^{Exp} = 1.5742(\pm 0.4181) + 0.7774(\pm 0.0588) pIC_{50}^{Cal} \quad (1)$$

Or

$$pIC_{50}^{Exp} = -0.967(\pm 0.583) + 0.541 DP06(\pm 0.097) + 3.317 MATS5e(\pm 0.963) + 0.721 Mor18e(\pm 0.224) - 1.349 Mor13p(\pm 0.326) + 1.433 GATS1e(\pm 0.512) + 1.015 GATS8p(\pm 0.421) \quad (2)$$

$$R^2 = 0.7779 \text{ SD} = 0.3336, p < 0.0001,$$

$$N = 52, \text{SEE} = 7.1568, q_{LOO}^2 = 0.6993,$$

$$q_{LGO}^2 = 0.5614, \text{FIT} = 1.7912, \text{AIC} = 0.1555,$$

$$F = 21.0859$$

After determining the best mathematical model for the MLR, we proceeded to the application of ANN using various combinations of neurons (2, 2.5, 3.5, and 4 neurons for descriptor) in order to improve the M76-6 model. The application of ANN with a combination of 2.5 neurons improved the linear correlation of the model RLM-M76-6. Figure 5 represents the theoretical biological activity of carboxylic acid derivatives in relation to the biological activity experimental of the hydroxamate analogs and HDAC inhibitor class I and II, after applying ANN. As in the first model, M76-6 was determined to be the optimal model, with the *F*-statistic, the CV_{LOO} , and CV_{LGO} , all yielding q^2 values greater than 0.5.

In this model, it was observed that AVP and AGK2 (selective inhibitor for SIRT2) are outside the lower limit set to 3σ because valproic acid does not have the bulky lipophilic group nor does the AGK2 inhibitor, although a non-selective inhibitor of all class I and II HDACs, is a selective inhibitor of HDACs III.

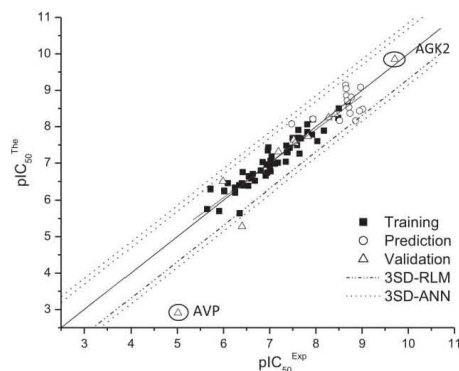


Fig. 5 Model M76-ANN. Graph of experimental vs. predicted biological activity of the test set from ANN analysis. 52 analogs of Hydroxamate (training set), 14 new HDAC inhibitors (prediction set) and 10 HDAC inhibitors class I and II (validation set). Black circles represent HDAC inhibitors of the validation set (AVP, AGK2). 3 SD: three standard deviations

Training set

$$pIC_{50}^{Exp} = 1.2328(\pm 0.3538) + 0.8267(\pm 0.0498) pIC_{50}^{Cal} \quad (3)$$

$$R^2 = 0.8462, \text{SD} = 0.2823, p < 0.0001, N = 52$$

$$pIC_{50}^{Exp} = 0.5052(\pm 0.3217) + 0.9275(\pm 0.0452) pIC_{50}^{Cal} \quad (4)$$

$$R^2 = 0.8934, \text{SD} = 0.2306, p < 0.0001, N = 52$$

This result suggests that the best model could be established from 76 HDAC inhibitors, which is described by the mathematical Eq. 4. The theoretical biological activity of the carboxylic acid derivatives could be determined using the above mathematical equation (see Tables 1, 2 and 3), where IN14 molecule is the best theoretical compound with a value of biological activity: $pIC_{50} = 9.054$.

Once a QSAR model was obtained, another crucial problem was the definition of its applicability domain (AD). For any QSAR model, only the predictions for chemicals falling within its AD can be considered reliable and not model extrapolations. There are several methods for defining the AD of QSAR models (Eriksson et al. 2003) but the most common is determining the leverage values for each compound (Gramatica 2007). Our study exploited the plot of standardized residuals vs. leverage values (*h*) (the Williams plot) to visualize the AD of a QSAR model. The warning leverage (h^*) is defined as (Eriksson et al. 2003):

$$h^* = \frac{3p}{n}$$

where n is the number of training compounds, and p is the number of model variants plus one. The leverage (h) greater than the warning leverage (h^*) suggests that the compound is very influential in the model. Secondly, it presented the Euclidean distances of the compounds to the model, measured by cross-validated standardized residuals. The cross-validated standardized residuals greater than 3SD units were classified as response outliers.

The Williams plot for the M76-ANN model is shown in Fig. 6. From this plot, the applicability domain is established in a secured area within $\pm 3SD$ and a leverage threshold h^* of 0.47. For making predictions, activity data must be

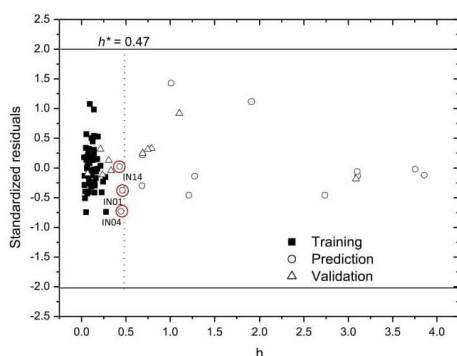
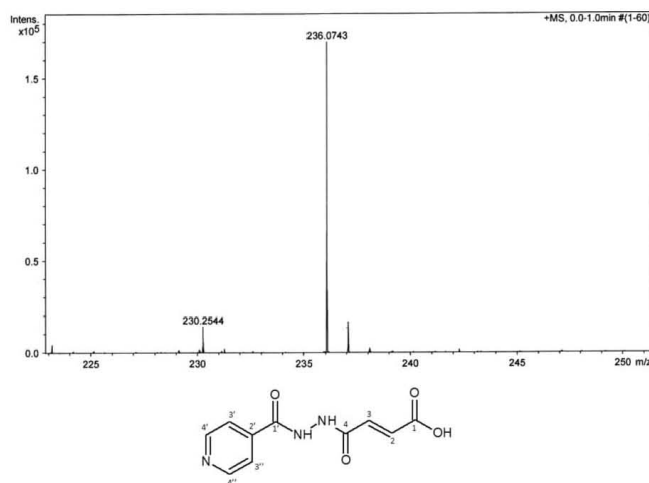


Fig. 6 Williams plot: standardized residuals vs. h from the training set ($h^* = 0.47$, dashed line). Red circles represent the three best HDAC inhibitors designed for the prediction set (IN01, IN04, and IN14) (color figure online)

Fig. 7 Mass spectrum of IN14. The higher signal represents the molecular ion (236.0743 g/mol)



considered true only for those compounds that settle within this AD on which the model was built. It can be observed from Fig. 4 that the compounds of the training set are in this area. However, five compounds in the validation set (AVP, AGK2, SBHA, 106 and MS275) and 11 compounds in the prediction set (IN02, IN03, IN05, IN06, IN07, IN08, IN09, IN10, IN11, IN12, and IN13) exceed the critical value. The developed M76-ANN model, therefore, has been well generalized and predicted. Note that this study used HDAC inhibitors that are non-selective of the HDAC2 in order to validate the mathematical model obtained; thus, the resulting compounds related to the HDAC2 are: IN01, IN04, and IN14.

The 1H NMR spectrum of $[C_{10}H_9N_3O_4]$ in DMSO- d_6 shows signals at δ 12.60 and 10.941 p.p.m. for the acid carboxylic protons and amide protons, respectively. The HC = CH protons appear as doublet between δ 6.304 and 6.468 p.p.m. and aromatic protons appear as multiplet between δ 7.766 and 8.787 p.p.m. The ^{13}C NMR spectrum of $[C_{10}H_9N_3O_4]$ shows signals at δ 167.578 (C1), 164.229 (C4), and 163.510 (C1') p.p.m. due to the acid carboxylic carbons. The aromatic carbons appear in δ 121.813 (C3' and C3''), 139.700 (C2'), and 150.870 (C4' and C4'') p.p.m. while alkene groups appear in δ 127.066 (C2) and 133.398 (C3) p.p.m.

The m/z spectrum shows dominant ions at m/z 236.0743 (Fig. 7), which are consistent with the expected protonated molecular ions ($M + H^+$). Protonated molecular ions were expected because the sample was analyzed under positive ionization conditions. These m/z ions are singly charged, and so the m/z value is consistent with the molecular mass, as the value of z (number of charges) equals 1. Hence, the

measured molecular weight is concluded to be 236.0743 Da, in good agreement with the theoretical value.

Considerable evidence suggests that chromatin changes regulate synaptic plasticity important for learning and memory; mainly, histone acetylation has been implicated in acquisition, retention, and memory extinction (Levenson et al. 2004; Bredy et al. 2007; Peleg et al. 2010). Results indicate that HDAC2 negatively regulates memory formation (hippocampus-dependent) associated with neurodegenerative diseases (Guan et al. 2009; McQuown et al. 2011; Gräff et al. 2012). In recent years, increased histone acetylation has been linked to improved memory; this has driven research on Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) as memory-enhancers. IN14 is a compound that is structurally novel and, in accordance with our theoretical results, it could be a new HDAC Inhibitor truly selective to HDAC2 because most current HDAC2 inhibitors do not show isoforms selectivity and suffer from metabolic instability.

Conclusion

The docking and QSAR methods allow the generation of an ideal model that can guide further design and synthesis of new inhibitors of HDACs by revealing active ingredients, allowing the design and optimization of bioactive molecules and enabling the selection of potentially bioactive compounds. These computational methods are part of a multidisciplinary effort and should be integrated into the field of pharmaceutical chemistry. In this study, the binding interaction between inhibitors of HDACs and HDAC2 was shown, finding that Try308, Asp269, Asp181, His183, His146, His147, Asp179, Asp186, and Lys36 are important amino acids in the active site of Zn^{2+} ion and H_2O molecule. The best model was built by 6 variables combining properties of electronegativity, atomic mass, polarizability, van der Waals forces, and conformational aspects. Results from these studies show that the best inhibitor is IN14 compound.

Acknowledgements This work was supported by Conacyt grant (513312) and partially supported by COFAA and SIP-IPN. The authors want to thank the staff of the Laboratories of Theoretical Chemistry and Organic Chemistry of the Universidad del Papaloapan campus Tuxtpec for excellent support during this project and for giving us access to their facilities, to Mrs. Josefina Bolado, Head of the Scientific Paper Translation Department, División de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM, for editing the English-language version of this manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

 Springer

References

- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* 19:716–723
- Anne EW, Wen GC, Matthew BD, Ricardo ED, Jon MK, Adam JS, Mari AT, Xu T, Michael EG (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11024–11031
- 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
- Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, 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
- Caballero J, Fernández M (2008) Artificial neural networks from MATLAB in medicinal chemistry. Bayesian-regularized genetic neural networks (BRGNN). Application to the prediction of antagonist activity against human platelet thrombin receptor (PAR-1). *Curr Top Med Chem* 8:1580–1605
- Dewar MJS, Zoebisch EG, Healy EF, Stewart JJP (1993) Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J Am Chem Soc* 115:5348–5348
- Eriksson L, Jaworska J, Worth AP, Cronin MTD, McDowell RM, Gramatica P (2003) Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification and regression-based QSARs. *Environ Health Perspect* 111:1361–1375
- Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R (2009) Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 460:587–591
- Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodeling. *Nature* 447:178–182
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel GE, Scuseria MA, Robb JR, Cheeseman VG, Zakrzewski JA, Montgomery RE, Stratmann JC, Burant S, Aprich JM, Millam AD, Daniels KN, Kudin MC, Strain O, Farkas J, Tomasi V, Barone M, Cossi R, Cammi B, Ennucci C, Pomelli C, Adamo S, Clifford J, Ochterski GA, Peterson PY, Ayala QK, Morokuma DK, Malick AD, Rabuck K, Raghavachari JB, Foresman J, Cioslowski JV, Ortiz AG, Baboul BB, Stefanov GA, Liashenko P, Piskorz I, Komaromi R, Gomperts RL, Martin DJ, Fox T, Keith MA, Al-Laham CY, Peng A, Nanayakkara M, Challacombe PM, Gill B, Johnson W, Chen MW, Wong JL, Andres C, Gonzalez M, Head-Gordon ES, Replogle JA (2003) Gaussian 03, Revision E.01. Gaussian, Inc, Pittsburgh, PA
- Gibson CL, Murphy SP (2010) Benefits of histone deacetylase inhibitors for acute brain injury; a systematic review of animal studies. *J Neurochem* 115:806–813
- Golbraikh A, Tropsha A (2002) Beware of q²! *J Mol Graph Model* 20:269–276
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128:635–638
- Gräff J, Woldemichael BT, Berchtold D, Dewarrat G, Mansuy IM (2012) Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation. *Nat Commun* 3:991
- Gramatica P (2007) Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR Comb Sci* 26:694–701
- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai LH (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459:55–60

- Guan Z, Giustetto M, Lomvardas S, Kim JH, Miniaci MC, Schwartz JH, Thanos D, Kandel ER (2002) Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell* 111:483–493
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 10:32–42
- Hait NC, Wise LE, Allegood JC, O'Brien M, Avni D, Reeves TM, Knapp PE, Lu J, Luo C, Miles MF, Milstien S, Lichtman AH, Spiegel S (2014) Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nat Neurosci* 17:971–980
- Juvale DC, Kulkarni VV, Deokar HS, Wagh NK, Padhye SB (2006) 3D-QSAR of histone deacetylase inhibitors: hydroxamate analogues. *Org Biomol Chem* 4:2858–2868
- Kubinyi H (1994) Variable selection in QSAR studies: 2. A highly efficient combination of systematic search and evolution. *QSAR* 13:393–401
- Kurdistani SK, Grunstein M (2003) Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:276–284
- Lehninger AL and Nelson DL (2012) *Lehninger principles of biochemistry. Protein function*. Worth Publ Inc; Edición: Revised, pp 157–162
- Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279:40545–40559
- McQuown SC, Barrett RM, Matheos DP, Post RJ, Rogge GA, Alenghat T, Mullican SE, Jones S, Rusche JR, Lazar MA, Wood MA (2011) HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci* 31:764–774
- Michan S, Sinclair D (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404:1–13
- Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comp Chem* 19:1639–1662
- Murgueitio MS, Bermudez M, Mortier J, Wolber G (2012) In silico virtual screening approaches for anti-viral drug discovery. *Drug Discov Today Technol* 9:219–225
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, 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
- PyMOL (TM) (2010) Educational Product-Copyright (C) Schrodinger, LLC
- Ravichandran V, Harish R, Abhishek J, Shalini S, Christopher PV, Ram KA (2011) Validation of QSAR Models-Strategies and Importance. *Int J Drug Des Discov* 2:511–519
- Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Perez-Mediavilla A, Frechilla D, Del Rio J, Garcia-Osta A (2009) Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology* 34:1721–1732
- Todeschini R, Consonni V, Pavan M (2002) *Dragon Software version 2.1* Pisani 13, Milano. Dragon Software and references therein
- Van Ommeslaeghe K, Loverix S, Geerlings P, Tourwe D (2005) DFT-based ranking of zinc-binding groups in histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 13:6070–6608
- Wang D (2009) Computational studies on the histone deacetylases and the design of selective histone deacetylase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 9:241–256
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265:17174–17179

CAPITULO 4

OBJETIVO: evaluar el efecto inhibitorio del compuesto IN14 frente a las HDACs de clase I, la toxicidad y la biodisponibilidad, así como la acción antidepresiva en el modelo del nado forzado.

"CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CONDUCTUAL DEL IN14"

EXPERIMENTO 2. Enviado a "ACS Medicinal Chemistry Letters"

Biochemical and behavioral characterization of IN14, a new inhibitor of HDACs with antidepressant-like activity

Heidy Martínez-Pacheco^a, Ofir Picazo^b, Adolfo López-Torres^c, Jean-Pascal Morin^a, Gabriel Roldán-Roldán^a

^a Laboratorio de Neurobiología Conductual, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, México.

^b Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Salvador Díaz Mirón s/n, Casco de Santo Tomás, Ciudad de México, 11340, México.

^c Instituto de Química Aplicada, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central 200, Parque Industrial, 68301 Tuxtepec, Oaxaca, México.

Corresponding author: Gabriel Roldán-Roldán, gabaergico@gmail.com

ABSTRACT

It has been suggested that histone deacetylases (HDACs) inhibitors could be used as an effective treatment for some psychiatric diseases such as depression and anxiety and may also ameliorate cognitive disorders. However, non-selective HDACs have a clear disadvantage regarding their efficacy and safety, thus the need to develop more selective HDACs. The present study evaluated the toxicity and HDAC activity of three new HDAC inhibitors, IN01, IN04, IN14 characterized and reported previously. Our data show that IN14 possesses a better profile than the other two. Therefore, the pro-cognitive and antidepressant effects of IN14 were then evaluated. Intraperitoneal administration of IN14 (100 mg/Kg/day) for 5 days significantly decreased immobility in the forced swimming test, while sparing the retention latency (RT) in the elevated T-maze (ETM). These results suggest that HDAC class I inhibitor IN14 may serve as a useful antidepressant with low toxicity that does not interfere with cognition in intact mice.

Keywords

HDAC inhibitors; IN14; Antidepressant; toxicity; cognitive functions

1. Introduction

Epigenetic mechanisms involving chromatin-modifying enzymes have been implicated in the pathophysiology of mental and neurodegenerative diseases such as depression, anxiety and cognitive deficits (Barrett and Wood, 2008; Fischer et al., 2007; Lattal et al., 2007; Levenson et al., 2004; Monsey et al., 2011; Morris et al., 2013; Vecsey et al., 2007), as well as in the therapeutic mechanisms of some antidepressants (Lee et al., 2010; Nestler, 2009). One of the major categories of epigenetic biochemical mechanism is histone post-translational modification of which histone acetylation - the addition of an acetyl group in the N-terminal lysine residues in the nucleosomal core of histone proteins (Borrelli et al., 2008; De Sa Nogueira et al., 2018)- has been highly implicated in neuroplasticity (Sweatt, 2013). Histone acetylation is associated with the opening of chromatin structure that facilitates the binding of transcription activating protein complexes that modulate gene expression (Verdone et al., 2005), while deacetylation leads to a transcriptionally inactive chromatin state (Goldberg et al., 2007; Kurdistani and Grunstein, 2003).

HDACs enzymes include subtypes comprising class I (HDAC1, 2, 3 and 8) and class II (HDAC 4–7, 9 and 10). Recent findings indicate that the activity of specific class I HDAC enzymes may be altered in psychiatric and neurodegenerative disorders and may therefore constitute a target for novel pharmacological treatments. The HDAC inhibitors targeting class I, sodium butyrate and MS-275 were reported to produce antidepressant-like effects (Covington et al., 2009; Lin et al., 2012; Yamawaki et al., 2012). MS-275 was also associated with increased histone acetylation and decreased levels of HDAC2 (Covington et al., 2009; Lin et al., 2012). Recent studies by two distinct groups have demonstrated that neuron-specific over-expression of HDAC2 impaired memory formation in adult mice, whereas HDAC2 deficiency resulted memory facilitation, similar to that induced by the treatment with nonselective HDACs inhibitors, suggesting that HDAC2 inhibition may be a useful strategy in the treatment of some cognitive impairments associated with psychiatric diseases (Gräff et al., 2012; Guan et al., 2009).

As efficacy and safety data from non-selective HDAC inhibitors emerge, the inquiry remains as to whether it will be advantageous to develop class I-selective inhibitors to improve the therapeutic index over non-selective inhibitors. In the present study, three recently designed HDAC inhibitors (Martínez-Pacheco et al., 2018) were characterized in animal models. First the toxic (LD₅₀) effects were examined by means of *A. salina* test, which is one of the most widely approved test organisms available for toxicity testing (Nunes et al., 2006). A specific ELISA-based test was then used to explore the HDAC selectivity of these three HDACs inhibitors. Based on the results obtained in these assays, only IN14 was evaluated to ascertain its antidepressant properties in the forced swimming test (FST), while the elevated T-maze (ETM) was used to explore its actions on learning and memory.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult-young male CD1 mice weighing 22 to 25 g were obtained from the colony of the Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). They were housed in groups of 8 in a temperature-controlled room (22 ± 1°C) with a 12 h light-dark cycle (lights on at 07:00 A.M.) and *ad libitum* access to food and water. Experiments were performed in accordance with the protocols approved by the Committee on the Use of Live Animals in Teaching and Research of the UNAM (FM/DI/036/2017) which comply with the "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals", Council for International Organizations of Medical Sciences, 2010. Efforts were taken to minimize animals' suffering throughout the experiments.

2.2. Chemicals and reagents

As mentioned, the compounds IN01, IN04 and IN14 were previously synthesized and characterized by our group (Martínez-Pacheco et al., 2018). Sodium phenylbutyrate, pentobarbital, desipramine hydrochloride (DMI, C₁₈H₂₂N₂ · HCl) and

potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma[®], St Louis, MO, USA). Doses were selected based on previous studies and preliminary experiments. MS grade methanol and formic acid was purchased from Merck, S. A de C.V. (Naucalpan de Juárez, México). MS grade ammonium formate was obtained from Sigma. Deionized water (resistivity 18.2 M Ω -cm) for sample pre-processing and mobile phase preparation was obtained from water purification system (ThermoFisher Scientific; Naucalpan de Juárez, México).

2.3. *Artemia salina* toxicity test

2.3.1. Hatching of *A. salina*

A. salina cysts were hatched in seawater (3%). The seawater was prepared by dissolving salt for aquarium (San-Halita, Biomaa; Jilotzingo, México) in deionized water and stirred for 24 h under aeration and then filtered through 30- μ m Millipore cellulose filters before use. Approximately 0.1 g of cleansed *Artemia* cysts were incubated in 1 L of seawater (pH 8.5-9) at $25 \pm 2^\circ$ C with a light intensity of 8.6 Klux. Air was pumped through the bottom of the container to prevent settling of cysts. Hatching completed within 15 to 24 h, however, only the nauplii which hatched from the cysts during the 24 h of incubation were used to start the toxicity tests.

2.3.2. Toxicity of HDAC inhibitors to *A. salina*

A. salina nauplii were exposed to 0.1, 1, 10, 100, 300 and 9000 ppm solutions of PB, IN01, IN04 and IN14. For all HDAC inhibitors, the procedure of toxicity tests was identical. Crustaceans were chemically exposed in a 48 h toxicity test, following the guideline for *Artemia* toxicity screening test (Artoxkit, 1990). Three replicates were prepared per test concentration. We added 10 nauplii per well in the well plates and incubated at in the dark at 25 °C for 48 h. The numbers of surviving nauplii in each well were counted under a stereoscopic microscope (SZ-PT, Olympus) after 48 h. The experiments were conducted in triplicate for each concentration. To compare the sensitivity of the animals used in the different tests,

a toxicity test with the reference compound potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) prepared in seawater was performed with each set of toxicity tests. The % mortality vs. log $[K_2Cr_2O_7]$ (p.p.m.) was plotted to obtain the classic sigmoidal dose-response graph, where the inflection point represents the LC_{50} .

2.4. ELISA-Based HDAC Activity Assay (BML-AK500)

HDAC activity assay was determined using the fluorometric HDAC activity assay Fluor de Lys (see instruction Manual, BML-AK500-0001). The fluorescent signal was detected by fluorometer (Molecular Devices; GeminiXS) at 450 nm. In this experiment, the HDAC inhibitor PB was used as a positive control.

2.5. Pharmacokinetics of compound IN14

Considering the toxicity data (compound with low toxicity) and HDAC activity (HDAC inhibitor), we decided to determine if compound IN14 crossed the blood-brain barrier (BBB) using the following methodology:

2.5.1. Mice treatment

Mice received either a unique injection or a daily injection for 5 consecutive days of saline solution or IN14 (100 mg/kg; i.p.)

2.5.2. Rodent biofluid harvesting and purification

Control or treated mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of Pentobarbital (50 mg/kg). The skin at the back of the neck, the chest and the lower abdomen was shaved and alcohol pads were used to clean the hairless skin. A horizontal incision opened the lower abdominal wall, and a 1 mL syringe was used to withdraw urine directly from the bladder. A longitudinal incision in the back of the neck skin was then made through which the foramen magnum was uncovered. A 1 mL syringe was used to puncture through the dura and withdraw cerebrospinal fluid (CSF). Finally, through an incision in the chest, blood was withdrawn from the right atrium using an ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) 5 mL syringe. The blood samples were centrifuged at 1000 g for 1 min at 4 °C and plasma was

collected. One volume of mobile phase (10 mM HCOONH₄, pH = 4.1) and two volumes of MeOH were added to the plasma, urine and CSF samples, which were vortex mixed for 1 minute and incubated for 2 hours at -20 °C. Subsequently samples were centrifuged at 15000 g for 10 min at 4 °C and the supernatants were collected. Samples were then stored at 20°C until use.

Extracts were cleansed with a Supel-Select HLB SPE Tube (30 mg, Supelco). Before loading the plasma, urine and cerebrospinal fluid samples onto the SPE system, the cartridge was activated with 1.5 mL MeOH and conditioned with 1.5 mL MeOH 50% (v/v). Samples were loaded onto SPE tube, eluted with 1.5 mL of 50 % MeOH, totally recovered and evaporated to dryness. Samples were resuspended in 150 µL of mobile phase A and kept at -20 °C until chromatographic analysis.

2.5.3.UPLC–ESI-TOF-MS analysis

The compound IN14 was monitored in biological samples using a chromatographic system ultra-performance liquid chromatography (UPLC) Acquity I-Class (Waters) coupled to Q-TOF mass spectrometer system Synapt G2-Si (Waters) equipped with ESI source. One µL of extract was injected onto a column Luna omega C18 1.6 µm (2.1 mm x 150 mm, Phenomenex) heated at 40 °C, using the Mobile phase A: 10 mM HCOONH₄ pH 4.1; and mobile phase B: MeOH at a flow rate of 0.1 mL/min with the following gradient elution method: 0 – 3 min, 5% B; 3 – 5 min, 20 % B, 5 – 8 min, 20 % B, 8 – 8.1 min, 5 % B, 8.1 – 10 min, 5 % B.

Detection was carried out in positive mode using the following settings: capillary 3 kV, temperature 120°C, sampling cone 40, source offset 70, cone gas flow 50 L/h, desolvation gas flow 500 L/h, desolvation temperature 350 °C. Full-scan mass spectra were acquired in centroid mode from 100-1200 *m/z*. The mass spectrometer was calibrated using NaI and leucine enkephalin was used as the lock mass. MassLynx software version 4.1 (Waters) was used to control the instrument and data analysis.

2.6. Behavioral assays

All behavioral experiments were carried out between 10:00 and 16:00 h and the sessions were recorded using a video camera. Every test day, mice were habituated for 1 h prior to testing by placing their cage in the experimental room with no water bottle or feeder bin during 5 minutes.

2.6.1. Treatment

Mice were given IN14, PB or DMI intraperitoneally for 5 days at a dose of 100 mg/kg (IN14 and PB) or 30 mg/kg (DMI) based on earlier reports (Vaugeois et al., 1997; Gavioli et al., 2004; Wouter et al., 2018) at 09:00 A.M. (day 5 of administration: first day of test). Vehicle groups were injected with saline solution.

2.6.2. FST

The FST task employed in this manuscript was based on the originally published procedure (PORSOLT et al., 1977). Briefly, mice were placed individually in a cylindrical glass tank (25 cm height × 19 cm diameter) filled with water (25 ± 1°C) to a depth of 15 cm for 15 min. Immediately after the 15-min swim, mice were removed from the tank, dried with a towel and put in a warming cage (37°C) that contained a heating pad covered with towels for 15 min. Mice were then returned to their home cage. The forced swim occurred between 10:00 AM and 2:00 PM. On the following day (24 h after the first swimming session), mice were placed in the same water tank for 5 min. The entire process was videotaped using a digital camera and behavioral activity was recorded during a period of 5 min per session. Each session was divided in 60 accounts of 5 seconds during which three behavioral responses were recorded: immobility -motions necessary to hold their head above water-, swimming -crosses from one quadrant to another- and climbing -actions to escape by climbing the cylinder walls-. The duration of immobility, was regarded as an indication of helplessness and was used as an index of depression-like behavior as reported previously (Yankelevitch-Yahav et al., 2015).

2.6.3.ETM

The ETM apparatus was made of acrylic, had three arms of equal dimensions (33 cm × 5 cm) and was elevated 50 cm above the floor. One arm, enclosed by walls of 25 cm high, was perpendicular to the two opposed open arms. Independent groups of control and treated animals (n = 8/ group) were trained. During the acquisition session each mice was placed at the end of the enclosed arm of the maze and the time to exit this arm and enter with all four paws to any of the open arms was recorded (acquisition latency, AL). The same maneuver was then repeated in the subsequent trials at intervals of 1 min (acquisition latencies AL1, AL2, AL3...) until the whole group reached the learning criterion, i.e., an AL of 180 s. In addition, a cutoff time of 180 s was established for the acquisition latencies, thus if a mouse did not leave the enclosed arm in this period, the trial was ended and a latency of 180 was assigned. To be on an open arm is an aversive experience since rodents have an innate fear to height and openness (Montgomery, 1955; Pellow et al., 1985; Treit et al., 1993). Thus, when the animal is repeatedly placed inside the enclosed arm and allowed to explore the maze they acquire an inhibitory avoidance to the open arms. In order to verify that the animals did not have any motivational or motor impediment that prevented them from performing the task, once each mouse had reached the learning criterion it was placed at the end of one open arm on which they had been pre-exposed and the latency to leave this arm and enter to the enclosed arm with all four paws was recorded in a single trial (escape latency, EL). Forty-eight hours later long-term memory was evaluated in a single-trial identical to those of the acquisition session where the time to leave the enclosed arm was recorded (retention latency, RL).

2.7. Data Analysis

All data are expressed as the mean ± standard error of mean (SEM) and were analyzed using ANOVA with post-hoc Tukey tests where appropriate. The GraphPad Prism® software version 6.01 was used to perform all analyses. Differences between groups were considered statistically significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. LC₅₀ of three new compounds: IN01, IN04 and IN14

The new compounds and the HDAC inhibitor PB showed a concentration-dependent increase in the toxicity for the 24-h-old nauplii. IN01 showed significantly higher toxicity compared to IN04, IN14 and PB ($p < 0.001$). The concentration of 900 mg / L of IN01, IN04, IN14 and PB was lethal to nauplii. The LC₅₀ value of IN01, IN04, IN14 and PB was found to be 166.0 mg/L, 393.9 mg/L, 327.0 mg/L and 295.5 mg/L, respectively with 95% Confidence. No sign of mortality was observed in the control (seawater-only) group. The concentration–response curves obtained for each compound tested on *A. salina* are plotted in Fig. 1.

Compound	Log ₁₀ LC ₅₀	LC ₅₀ (mg/L)
K ₂ Cr ₂ O ₇	1.3838	26.00
IN01	2.2200	166.0
IN04	2.5950	393.9
IN14	2.5150	327.0
PB	2.4710	295.5

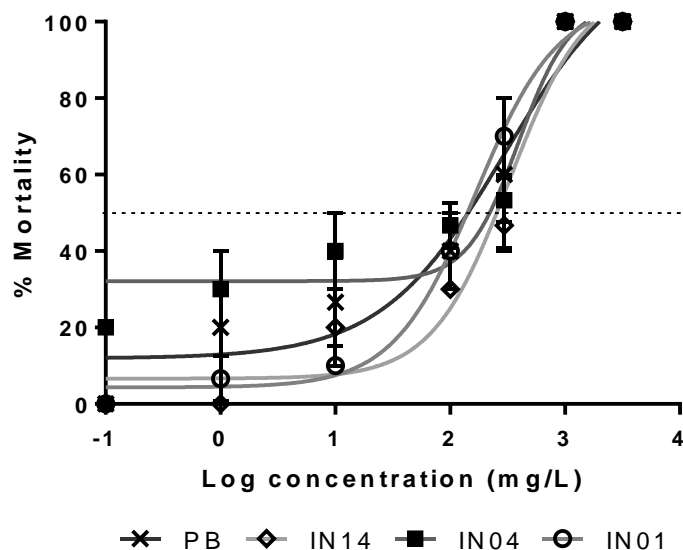


Fig. 1. % Mortality of *A. salina* exposed to HDAC inhibitors. Acute toxicity (LC_{50}) of IN01, IN04, IN14 and PB on *A. salina* in seawater medium. The concentrations of the compounds (IN01, IN04 and IN14) and the HDAC inhibitor, phenylbutyrate (PB), are expressed in \log_{10} concentration. Each point represents the mean \pm SEM of the 30 nauplii.

3.2. Inhibitory activity of IN01, IN04 and IN14 against class I HDACs.

To evaluate the degree of HDAC activity inhibition by each of the compounds, we next measured HDAC activity with FLUOR DE LYS®. A One-Way ANOVA revealed significant differences between groups ($F_{5, 12} = 0.213$; $p < 0.001$). Post hoc Tukey test revealed that, IN14 significantly inhibited HDAC activity ($p < 0.001$; Fig. 2), interestingly, the compound IN01 increased HDAC activity ($p < 0.05$; Fig. 2). Given that the most potent class I HDAC inhibition was obtained with IN14, we decided to use this compound for the next experiments.

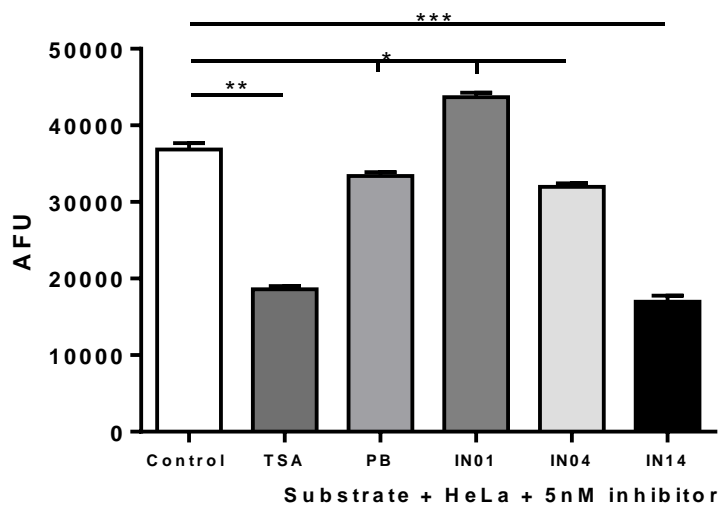


Fig. 2. IN14 inhibits HDAC activity in HeLa Nuclear Extract. Data are expressed as mean \pm SEM. Experiments were performed by triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control. HDAC activity (arbitrary fluorescent units [AFU]); PB: phenylbutyrate; TSA: trichostatin A (positive control); IN01-IN04-IN14: synthesized compounds.

3.3. Compound IN14 crosses the blood-brain barrier

Presence of IN14 in different biofluids from mice was monitored by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). Fig. 3 shows representative extracted ion chromatograms (EIC) of molecular ion (m/z 236), which corresponds to the protonated form of IN14 (figure 3A), from IN14, samples of plasma, urine and cerebrospinal fluid of mice treated for one or five days. IN14 was detected in plasma, urine and cerebrospinal fluid since the first day of administration suggesting its easy distribution.

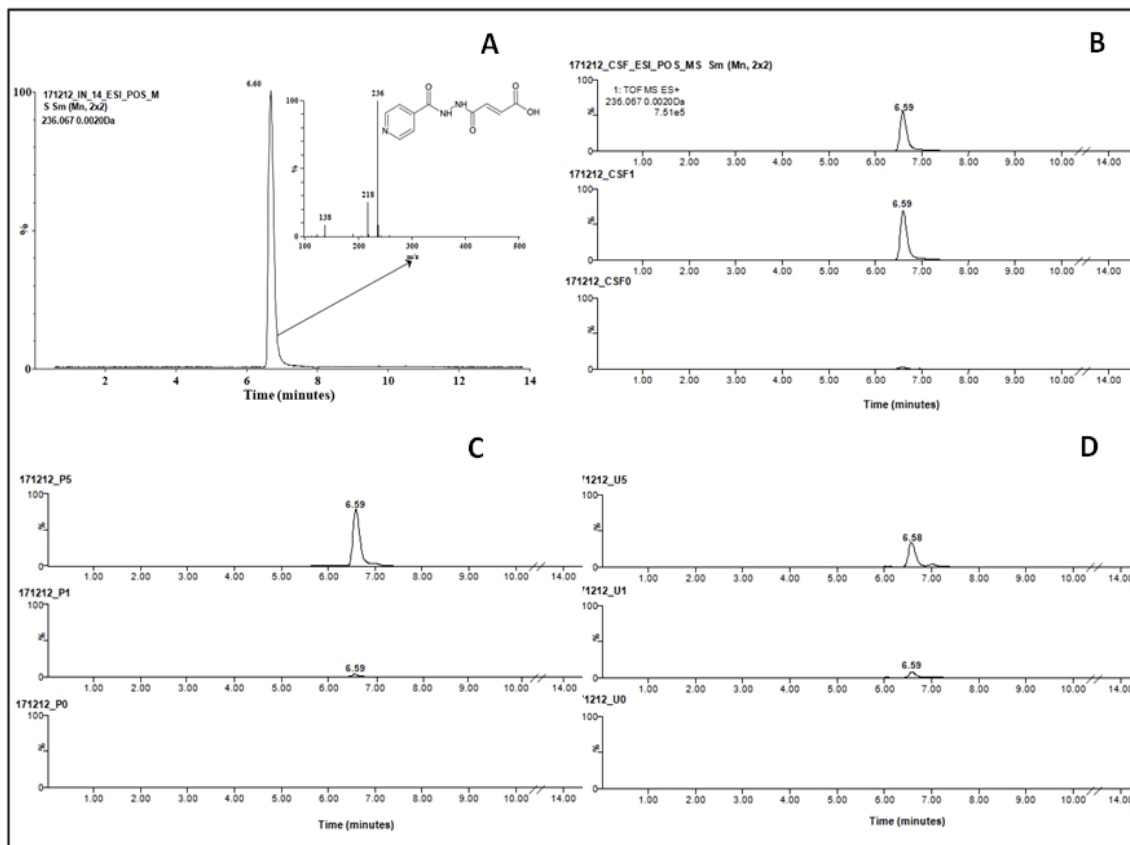


Fig. 3. Detection of IN14 by LC-MS. A) IN14 chromatogram and ESI (+) mass spectrum. Extracted ion chromatograms (EIC) of $m/z = 236$ in samples of cerebrospinal fluid (B), plasma (C), and urine (D). Mice were treated with IN14 by one day (red line) and five days (black line), fluid extraction and LC-MS analysis is described in Methods section.

3.4. Behavioral assays

In the FST, the incidence of immobility in the animals treated with IN14, PB and DMI was decreased in comparison to control mice. One-way ANOVAs showed that immobility ($F_{3,28} = 123$, $p < 0.001$), swimming ($F_{3,28} = 74.0$, $p < 0.001$) and climbing behaviors ($F_{3,28} = 123$, $p < 0.001$) varied significantly between groups. Post-hoc Tukey test revealed that IN14 and PB significantly decreased the immobility time, a putative indicator of helplessness, in comparison to vehicle ($p < 0.001$). Notably also, IN14 was better (~20% more) at increasing climbing when compared to PB ($p < 0.001$). On the other hand, swimming did not differ between the experimental

(IN14) and the vehicle groups ($p = 0.9062$), but treatment with PB increased this behavior (Tukey post hoc test, $p < 0.001$). Interestingly, DMI-treated mice had significantly decreased immobility time ($p < 0.001$) and increased climbing behavior ($p < 0.001$), while swimming time was lower in these mice in comparison to vehicle ($p < 0.001$, Fig. 4).

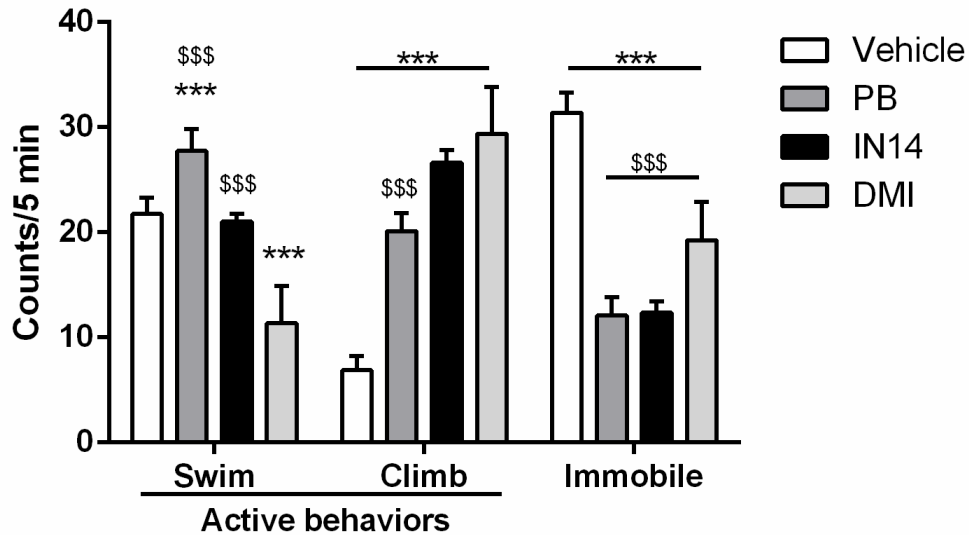


Fig. 4. Performance of mice treated with IN14, PB or DMI during forced swimming test. Bars indicate the incidence of swimming (swim), climbing (climb) and immobility (immobile) during a 5-min test, Data are expressed as mean \pm SEM (8 mice/group). Tukey test; *** $p < 0.001$ vs. vehicle, \$\$\$ $p < 0.001$ vs. DMI.

In the ETM test, two-way repeated measures ANOVA yielded no effect of treatment ($F_{2, 24} = 0.8338$, $p = 0.4466$) nor treatment \times trial interaction ($F_{14, 168} = 1.122$, $p = 0.3419$) but did unveil a significant main effect of trial ($F_{7, 168} = 177.6$, $p < 0.001$; Fig. 5A), indicating that all groups performed similarly in this task. Fig. 5A shows that during the acquisition, the mice of the three groups reached the criterion of learning by remaining 180 seconds in the closed arm after 7 training trials. Long-term memory test 48 hours after training revealed a near perfect performance in all groups. Furthermore, there were no significant differences in escape latencies (Fig. 5B), ruling out the possibility that motor impediment could

have compromised mice performance during the test (One-Way ANOVA, $F_{2, 24} = 0.662$, $p = 0.525$).

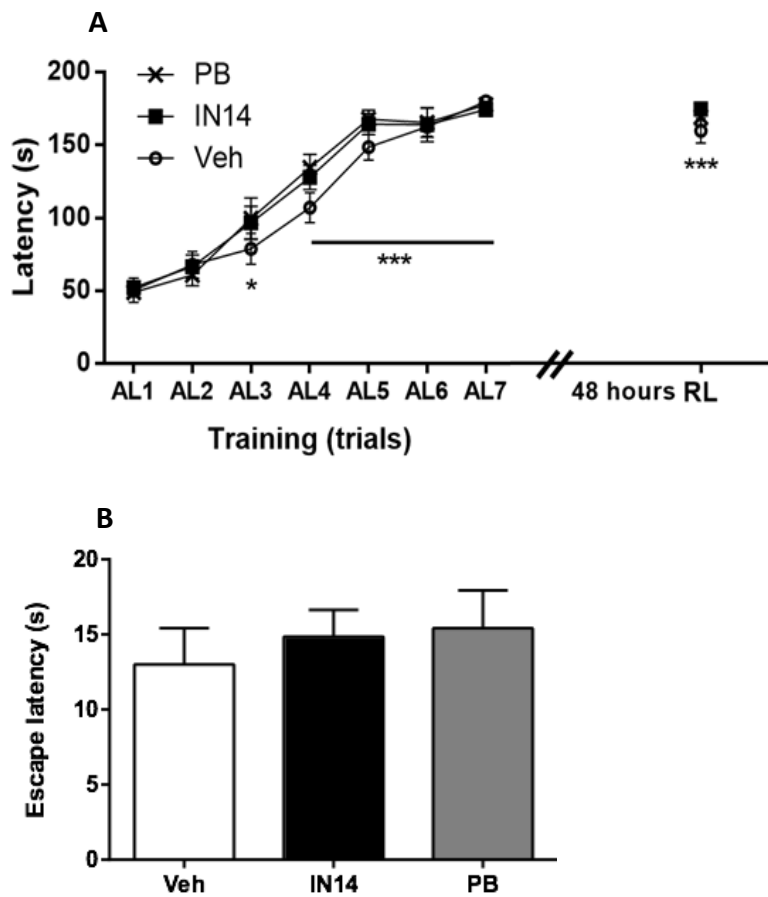


Fig. 5 Pre-training intraperitoneal administration of PB and IN14 does not affect memory performance. A) Elevated T-maze learning curves of intact mice during the training session and retention latencies. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs AL1, Two-way repeated measures ANOVA with Tukey's multiple comparisons post hoc test. $N = 9$ mice/group. B) Escape latency of the open arm in the ETM test. No significant differences were observed among different groups. ns = 0.5250, $n = 9$ mice/group. PB: phenylbutyrate; AL (1, 2, 3...): acquisition latency; EL: escape latency; RL: retention latencies.

4. Discussion

The present study evaluated the biochemical properties and behavioral effects of recently designed (Martínez-Pacheco et al., 2018) HDAC inhibitors. We first performed a lethality bioassay and found that among the compounds tested, IN04 and IN14 appeared to be the least toxic. For a substance to be considered highly toxic the LC₅₀ is to be reached at concentrations of 1-10 µg/mL (Moshi et al., 2010). All three compounds tested herein had LC₅₀, which shows that they are safe under the parameters of the *Artemia salina* test.

The capacity of IN14 (AFU: 16993) to inhibit (class I) HDAC was comparable to that of Trichostatin A (AFU: 18602), a potent histone deacetylase inhibitor, which induces cell proliferation, cell differentiation and apoptosis *in vitro* (Vigushin et al., 2001). IN04 (AFU: 31994), on the other hand has an inhibition effectiveness similar to that of PB (AFU: 33402), a reversible inhibitor of class I and II HDACs (Koutsounas et al., 2013). In contrast, IN01 potentiated the activity of the HDAC enzyme, which suggests that this compound could be useful in models where HDACs hyperactivity is required.

To evaluate possible effects of IN14 on behavior, we chose CD1 mice because of their higher genetic variability an outbred mouse strain which is probably desirable when testing new compounds with possible translational applications. Furthermore, CD1 mice have been used in inducible models of depression (Frenois et al., 2007; Harkin et al., 2002; Painsipp et al., 2011) and are responsive to antidepressants such as imipramine (Harkin et al., 2002) and desipramine (Bechtholt-Gompf et al., 2011).

Our results also show that intraperitoneal injection of IN14 decreased behavioral despair, as observed by a decrease in immobility in the FST task, within 5 days of treatment, similar to what is observed with PB. Strikingly, both PB and IN14 were superior to tricyclic antidepressant DMI at reducing immobility. These findings are at odds with previous observations on hybrid 129SvEv/C57Bl/6 mice that showed no effect of chronic treatment with class I inhibitor sodium phenylbutyrate on the

FST at a dose that did increase histone acetylation (Gundersen and Blendy, 2009)). However, in a chronic social defeat mouse model of depression, it was reported that the administration of the HDAC inhibitors suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA] and MS-275 in the Nucleus Accumbens, resulted in increased acetylation of the histone H3K14; an effect accompanied by a significant antidepressant-like effect, including decreased immobility in the FST (Covington et al., 2009). Furthermore, SAHA was shown to decrease immobility in the FST in *Crtc1* knockout mice, who exhibit a depressive-like phenotype, as well as in C57BL/6 wildtypes (Meylan et al., 2016). These discrepancies are likely due to differences in the characteristics of the specific class I HDAC inhibitors employed as well as variations in the behavioral protocols.

Also noteworthy is the observation that IN14 was more efficient than PB at increasing climbing behavior whereas it left swimming behavior unaltered, suggesting a more potent and specific effect in promoting motivational behavior. In this sense, multiple studies have reported that the inhibition of HDACs increases motivation, the search for reinforcements and reduce symptoms in models of depression when administered in the hippocampus, prefrontal cortex, amygdala or the nucleus accumbens (McQuown and Wood, 2010). However, these actions are influenced by differences in HDAC inhibitor potency, specificity, tissue distribution and effectiveness at crossing the BBB (Sandi et al., 2011).

The overexpression of HDACs enzymes in the forebrain has been related to cognitive deficits. For instance, HDAC2 was reported to negatively regulate the structural and functional synaptic plasticity, as well as memory formation in the hippocampus (Guan et al., 2009). In line with this, the majority of studies searching the histone acetylation-memory relationship have used HDACs inhibitors to demonstrate that the increase in lysine acetylation resulting from the inhibition of HDACs enhances cognition in animal models of neurodegenerative diseases (Barrett and Wood, 2008; Fischer et al., 2007; Lattal et al., 2007; Levenson et al., 2004; Monsey et al., 2011; Morris et al., 2013; Vecsey et al., 2007). The current study did not find any alteration or beneficial effect of IN14 and PB on learning as

assessed by the ETM task in contrasts with an earlier study reporting that HDAC2 knockout mice performed significantly better in this task (Guan et al., 2009). This discrepancy could be due to the fact that IN14 inhibit all class I HDACs, not just HDAC2 and HDAC inhibiting compounds such as TSA have been reported to have an anxiolytic effect (Sakharkar et al., 2014; Schmauss, 2015). Given the anxiogenic nature of the ETM task (Asth et al., 2012), it is possible that an anxiolytic effect of IN14 and/or PB could have masked a memory enhancing effect. In addition, in the current study only intact, cognitively unimpaired mice were used; therefore, it remains to be demonstrated whether IN14 may facilitate learning and memory in cognitively impaired animals, a possibility that we are currently assessing. Finally, class I HDAC inhibitor sodium butyrate was recently demonstrated to promote consolidation and reconsolidation of spatial memory in intact mice when administered after a weak training that normally allowed for short-term but not long-term memory retention (Villain et al., 2016). Further studies are needed to determine whether IN14 may improve learning and memory and if so, under what circumstances and which step of the memory formation process. Taken together, the data presented herein suggest that the new agent IN14, which inhibits all class I HDACs *in vitro*, may represent a new anti-depressant drug candidate since it has low toxicity, is permeable to the BBB and shows clear actions within 5 days of treatment initiation. Further *in vivo* studies are needed to evaluate the therapeutic potential of this promising new compound.

Acknowledgments

HMP (CVU: 513312) is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and was supported by a Ph.D. scholarship from CONACYT. GRR receives support from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), grant PAPIIT IN224019. JPM is supported by DGAPA grant PAPIIT IA206019. The authors would like to thank the Laboratory of Instrumental Chemistry; Papaloapan

University, Campus Tuxtepec, for giving access to their facilities (INFRA-2015-01-252013). OP acknowledges the support of COFAA and SIP-IPN.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Asth, L., Lobão-Soares, B., André, E., Soares, V. de P., Gavioli, E.C., 2012. The elevated T-maze task as an animal model to simultaneously investigate the effects of drugs on long-term memory and anxiety in mice. *Brain Res. Bull.* 87, 526–533.
- Barrett, R.M., Wood, M.A., 2008. Beyond transcription factors: The role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn. Mem.* 15, 460–467.
- Bechtholt-Gompf, A.J., Smith, K.L., John, C.S., Kang, H.H., Carlezon, W.A., Cohen, B.M., Öngür, D., 2011. CD-1 and Balb/cJ mice do not show enduring antidepressant-like effects of ketamine in tests of acute antidepressant efficacy. *Psychopharmacology (Berl)*. 215, 689–695.
- Belovicova, K., Bogi, E., Csatosova, K., Dubovicky, M., 2017. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdiscip. Toxicol.* 10, 40–43.
- Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C.A., Rios, M., Monteggia, L.M., Self, D.W., Nestler, E.J., 2006. Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Science (80-)*. 311, 864–868.
- Borrelli, E., Nestler, E.J., Allis, C.D., Sassone-Corsi, P., 2008. Decoding the Epigenetic Language of Neuronal Plasticity. *Neuron* 60, 961–974.
- Covington, H.E., Maze, I., Laplant, Q.C., Vialou, V.F., Ohnishi, N., Berton, O.,

- Fass, D.M., Renthal, W., Iijima, A.J.R., Wu, Y., Ghose, S., Krishnan, V., Russo, S.J., Tamminga, C., Haggarty, J., Nestler, E.J., 2009. Antidepressant Actions of HDAC Inhibitors. *J Neurosci* 29, 11451–11460.
- De Sa Nogueira, D., Merienne, K., Befort, K., 2018. Neuroepigenetics and addictive behaviors: Where do we stand? *Neurosci. Biobehav. Rev.*
- Dulawa, S.C., Holick, K.A., Gundersen, B., Hen, R., 2004. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 1321–1330.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., Tsai, L.H., 2007. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178–182.
- Frenois, F., Moreau, M., O'Connor, J., Lawson, M., Micon, C., Lestage, J., Kelley, K.W., Dantzer, R., Castanon, N., 2007. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* 32, 516–531.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E., 2007. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 128, 635–638.
- Gräff, J., Woldemichael, B.T., Berchtold, D., Dewarrat, G., Mansuy, I.M., 2012. Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation. *Nat. Commun.* 3.
- 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., DePinho, R.A., Jaenisch, R., Tsai, L.H., 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55–60.
- Gundersen, B.B., Blendy, J.A., 2009. Effects of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in models of depression and anxiety. *Neuropharmacology* 57,

67–74.

- Harkin, A., Houlihan, D.D., Kelly, J.P., 2002. Reduction in preference for saccharin by repeated unpredictable stress in mice and its prevention by imipramine. *J. Psychopharmacol.* 16, 115–123.
- Jia, H., Wang, Y., Morris, C.D., Jacques, V., Gottesfeld, J.M., Rusche, J.R., Thomas, E.A., 2016. The Effects of Pharmacological Inhibition of Histone Deacetylase 3 (HDAC3) in Huntington's Disease Mice.
- Koutsounas, I., Giaginis, C., Theocharis, S., 2013. Histone deacetylase inhibitors and pancreatic cancer: Are there any promising clinical trials? *World J. Gastroenterol.* 19, 1173–1181.
- Kurdistani, S.K., Grunstein, M., 2003. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 276–284.
- 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>
- Lee, S., Jeong, J., Kwak, Y., Park, S.K., 2010. Depression research: Where are we now? *Mol. Brain* 3, 1–10.
- 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.
- Lin, H., Geng, X., Dang, W., Wu, B., Dai, Z., Li, Y., Yang, Y., Zhang, H., Shi, J., 2012. Molecular mechanisms associated with the antidepressant effects of the class i histone deacetylase inhibitor MS-275 in the rat ventrolateral orbital cortex. *Brain Res.* 1447, 119–125.
- Martínez-Pacheco, H., Espinosa-Raya, J., Picazo, O., Roldán-Roldán, G., Viñas-Bravo, O., Ramírez-Galicia, G., 2018. Design (Docking and QSAR Studies) and synthesis of histone deacetylase 2 (HDAC2) inhibitors series. *Med. Chem.*

Res. 27, 206–223.

McQuown, S.C., Wood, M.A., 2010. Epigenetic regulation in substance use disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* 12, 145–153.

Meylan, E.M., Halfon, O., Magistretti, P.J., Cardinaux, J.R., 2016. The HDAC inhibitor SAHA improves depressive-like behavior of CRT1-deficient mice: Possible relevance for treatment-resistant depression. *Neuropharmacology* 107, 111–121.

Monsey, M.S., Ota, K.T., Akingbade, I.F., Hong, E.S., Schafe, G.E., 2011. Epigenetic Alterations are Critical for Fear Memory Consolidation and Synaptic Plasticity in The Lateral Amygdala. *PLoS One* 6;5.

Montgomery, K.C., 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48, 254–260.

Morris, M.J., Mahgoub, M., Na, E.S., Pranav, H., Monteggia, L.M., 2013. Loss of Histone Deacetylase 2 Improves Working Memory and Accelerates Extinction Learning. *J. Neurosci.* 33, 6401–6411.

Moshi, M.J., Innocent, E., Magadula, J.J., Otieno, D.F., Weisheit, A., Mbabazi, P.K., Nondo, R.S.O., 2010. Brine shrimp toxicity of some plants used as traditional medicines in Kagera Region, north western Tanzania. *Tanzan. J. Health Res.* 12, 7.

Nestler, E.J., 2009. Epigenetic Mechanisms in Psychiatry. *Biol. Psychiatry* 65, 189–190.

Nunes, B.S., Carvalho, F.D., Guilhermino, L.M., Van Stappen, G., 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ. Pollut.* 144, 453–462.

Painsipp, E., Köfer, M.J., Sinner, F., Holzer, P., 2011. Prolonged depression-like behavior caused by immune challenge: Influence of mouse strain and social environment. *PLoS One* 6.

- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- PORSOLT, R.D., LE PICHON, M., JALFRE, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732.
- Sakharkar, A.J., Zhang, H., Tang, L., Baxstrom, K., Shi, G., Moonat, S., Pandey, S.C., 2014. Effects of histone deacetylase inhibitors on amygdaloid histone acetylation and neuropeptide y expression: A role in anxiety-like and alcohol-drinking behaviours. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 1207–1220.
- Sandi, C., Pinto, R.M., Al-Mahdawi, S., Ezzatizadeh, V., Barnes, G., Jones, S., Rusche, J.R., Gottesfeld, J.M., Pook, M.A., 2011. Prolonged treatment with pimelevic o-aminobenzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol. Dis.* 42, 496–505.
- Schmauss, C., 2015. An HDAC-dependent epigenetic mechanism that enhances the efficacy of the antidepressant drug fluoxetine. *Sci. Rep.* 5, 4–11.
- Sweatt, J.D.D., 2013. The emerging field of neuroepigenetics. *Neuron* 80, 624–32.
- Tanaka, S., Young, J.W., Halberstadt, A.L., Masten, V.L., Geyer, M.A., 2012. Four factors underlying mouse behavior in an open field. *Behav. Brain Res.* 233, 55–61.
- Treit, D., Menard, J., Royan, C., 1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44, 463–469.
- Tsankova, N.M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R.L., Nestler, E.J., 2006. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat. Neurosci.* 9, 519–525.
- 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, 6128–40.

Verdone, L., Caserta, M., Mauro, E. Di, 2005. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem. Cell Biol.* 83, 344–353.

Vialou, V., Robison, A.J., Laplant, Q.C., Covington, H.E., Dietz, D.M., Ohnishi, Y.N., Mouzon, E., Rush, A.J., Watts, E.L., Wallace, D.L., Īíguez, S.D., Ohnishi, Y.H., Steiner, M.A., Warren, B.L., Krishnan, V., Bolāos, C.A., Neve, R.L., Ghose, S., Berton, O., Tamminga, C.A., Nestler, E.J., 2010. Δ fosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nat. Neurosci.* 13, 745–752.

Vigushin, D.M., Ali, S., Pace, P.E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I., Coombes, R.C., 2001. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin. Cancer Res.* 7, 971–6.

Villain, H., Florian, C., Roullet, P., 2016. HDAC inhibition promotes both initial consolidation and reconsolidation of spatial memory in mice. *Sci. Rep.* 6, 1–9.

Yamawaki, Y., Fuchikami, M., Morinobu, S., Segawa, M., Matsumoto, T., Yamawaki, S., 2012. Antidepressant-like effect of sodium butyrate (HDAC inhibitor) and its molecular mechanism of action in the rat hippocampus. *World J. Biol. Psychiatry* 13, 458–467.

Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., Doron, R., 2015. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J. Vis. Exp.*

CAPÍTULO 5

"EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LAS HDACs SOBRE LA MEMORIA DE LARGO PLAZO, TRAS UNA SESIÓN ESTRESANTE"

EXPERIMENTO 3. En preparación

CLASS I HISTONE DEACETYLASE INHIBITION REVERSES MEMORY IMPAIRMENT INDUCED BY ACUTE STRESS

Heidy Martínez-Pacheco^a, Ofir Picazo^b, Rossana C. Zepeda^c, Gabriel Roldán-Roldán^a

^a Laboratorio de Neurobiología Conductual, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, México.

^b Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Salvador Díaz Mirón s/n, Casco de Santo Tomás, Ciudad de México, 11340, México

^c Centro de Investigaciones Biomédicas, Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, 91000, Veracruz, México.

Corresponding author: Gabriel Roldán-Roldán, gabaergico@gmail.com

4.1. INTRODUCCIÓN

Los organismos se enfrentan a una amplia variedad de condiciones ambientales que pueden perturbar su homeostasis. Para responder eficazmente a estos "factores de estrés", el organismo debe iniciar una respuesta coordinada a través de una variedad de sistemas fisiológicos. Hans Selye definió por primera vez el término estrés como la respuesta fisiológica del organismo ante diversos eventos que ponen en peligro su integridad y que representa un esfuerzo generalizado para adaptarse a las nuevas condiciones (Selye, 1998). Por otra parte Cannon (1929 a, b), con su definición de "homeostasis", postuló que la médula suprarrenal y el sistema nervioso autónomo ejercían un papel crucial para la ejecución de este tipo de respuestas. Pacák y Palkovits (2001) plantearon que el estrés es como una respuesta inespecífica que involucra múltiples circuitos fisiológicos que permiten movilizar recursos energéticos con el fin de controlar las consecuencias de eventos que perturban la homeostasis del organismo. La respuesta al estrés varía en función de: 1) la intensidad y duración del estímulo; 2) el estado funcional del organismo; y, 3) la evaluación del sujeto de su capacidad para predecir y controlar tal estímulo (Jeansok y cols., 1998).

4.1.1. EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISIS-ADRENAL

Los estímulos estresantes, por su parte, pueden ser de diversa naturaleza: 1) alteraciones del medio interno; 2) modificaciones ambientales; o 3) estados emocionales. A nivel del sistema nervioso, estos eventos estresantes desencadenan la activación del sistema simpático adrenomedular (SSAM) y del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) en interacción con estructuras del sistema nervioso central y órganos y tejidos en la periferia. El SSAM incluye la rama simpática del sistema nervioso autónomo (SNA) y la médula adrenal. La división simpática del SNA se activa poco después del inicio del evento estresante, liberando noradrenalina desde sus neuronas pos-ganglionares, neurotransmisor que se une a receptores adrenérgicos localizados en los órganos inervados por esta vía. Las neuronas pre-ganglionares de la rama simpática del SNA inervan

directamente la médula adrenal, estructura que libera adrenalina y noradrenalina en el torrente sanguíneo, estimulando órganos y tejidos que no son inervados de forma directa por el SNA simpático. La activación del SSAM produce vasoconstricción esplénica, dilatación pupilar y dilatación bronquial, aumento rápido de la capacidad respiratoria, la glucemia, el flujo sanguíneo en el músculo esquelético y la frecuencia y fuerza de las contracciones cardíacas, cambios fisiológicos que aumentan la disponibilidad de oxígeno y glucosa en músculos y cerebro y permiten al organismo desplegar respuestas pertinentes para controlar los potenciales efectos nocivos del evento estresante. Poco después de la activación del SSAM, se activa el eje HHA cuya función principal es prolongar la disponibilidad de recursos metabólicos (Kim y Diamond, 2002). Como primer paso para activar el eje HHA, el cerebro integra información sensorial externa e interna relacionada con el desafío inmediato, y esta información se traduce en respuestas endócrinas dentro del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Las neuronas hipofisiotrópicas dentro de la PVN secretan hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP) en el sistema portal hipofisario, un sistema de vasos sanguíneos que conectan el hipotálamo con la hipófisis (Herman y Cullinan, 1997). Al llegar a la hipófisis anterior, la CRH estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) a la circulación. Los niveles elevados de ACTH, a su vez, estimulan la síntesis y liberación de GCs(cortisol/corticosterona) a través de la unión a los receptores de melancortina-2 dentro de la corteza de las glándulas suprarrenales (Malek, 2001). Los glucocorticoides (GCs) liberados al torrente sanguíneo alcanzan sus receptores en órganos como el hígado y el riñón, donde estimulan la conversión de grasas y proteínas en metabolitos intermedios que finalmente son transformados en glucosa (glucogénesis), lo que proporciona a los tejidos la energía adicional requerida para responder a las exigencias metabólicas impuestas por la situación de estrés (Smith y Vale, 2006). Los GCs atraviesan la barrera hematoencefálica y activan sus receptores intracelulares o de membrana en células de estructuras del SNC, modulando de forma diferencial, según el contexto celular, vías de señalización intracelular, la expresión génica, la remodelación del citoesqueleto (densidad de espinas dendríticas y de tipo de

receptores en ellas) y la liberación de neurotransmisores, neuropéptidos y neurotrófinas en hipocampo, amígdala y corteza prelímbica (Shirazi y cols., 2015).

La activación de HHA da como resultado un aumento máximo en los GCs circulantes después de 15 a 30 minutos, y vuelve a los niveles de referencia aproximadamente una hora después de la finalización de un factor estresante (Sapolsky y cols., 1984). La capacidad crucial para terminar la respuesta al estrés, o inhibir la secreción de CRH y ACTH, es a través de retroalimentación negativa de GCs en regiones neurales clave, como la PVN, la hipófisis anterior, la corteza prefrontal medial (mPFC) y el hipocampo. Mientras la activación de los receptores de glucocorticoides (GR) en la amígdala favorece la liberación de glutamato en axones que proyectan sobre el PVN y potencia la respuesta de estrés, la activación de GR en el hipocampo y la corteza prelímbica promueve la liberación de glutamato en axones que proyectan sobre el núcleo del lecho de la estría terminal (BnST) que, a su vez, envía proyecciones inhibitoras sobre neuronas del PVN (Franklin, Saab y Mansuy, 2012) inhibiendo la actividad del eje HHA.

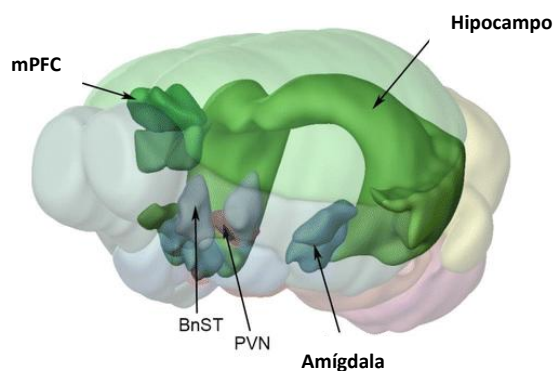


Figura 1. Estructuras límbicas seleccionadas involucradas con la regulación del eje HHA.

Los receptores de mineralocorticoides (MR) y los GR se localizan en regiones del cerebro que son importantes en los procesos de formación de memoria, como lo es el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (de Kloet, 2005). Tanto MR como GR pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y funcionan como factores de transcripción que regulan la expresión génica (Reul y Kloet, 1985). A

ambos subtipos de receptores se les une a la corticosterona, los MR tienen una afinidad diez veces mayor por GCs en relación con los GR (Kd de ~ 0.5 nM para MR vs. Kd ~ 2.0–5.0 nM para GR). En consecuencia, los GCs se unen de manera preferencial a los MR que a los GR, alcanzan niveles de casi saturación durante las depresiones del ciclo circadiano (es decir, niveles basales bajos), y están completamente saturados durante los picos circadianos y el estrés. Los GR se activan solo cuando los niveles de GCs alcanzan una alta concentración más allá del nivel que satura los MR. Se ha planteado la hipótesis de que los MR median acciones de respuesta rápida y no genómicas, mientras que los GR ocupados a concentraciones más altas de corticosterona, median las acciones de respuesta después del estrés (Atkinson y cols., 2008).

4.1.2. HIPOCAMPO Y REGULACIÓN DEL EJE HHA

Dentro del cerebro de roedores, el hipocampo expresa el nivel más alto de GR y MR, por lo que no es de extrañarse que sirva como un importante centro de retroalimentación negativa y regulador de la respuesta al estrés (Herman y cols., 1992). La evidencia de retroalimentación HHA negativa surge de estudios iniciales en los cuales la lesión o el bloqueo de los receptores GCs del hipocampo dieron como resultado una regulación al alza del ARNm de CRH y AVP dentro de la PVN. La consecuencia de esto es la hipersecreción de GCs (Sapolsky y cols., 1984; Jacobson y Sapolsky, 1991). A la inversa, la activación de los receptores GCs del hipocampo produce una inhibición del eje HHA (Sapolsky y cols., 1984). En roedores, el hipocampo dorsal parece estar más involucrado en el aprendizaje y la memoria, mientras que el hipocampo ventral está implicado en la modulación del comportamiento similar a la ansiedad y la regulación de eje HHA (Bannerman y cols., 2004). Las lesiones del hipocampo dorsal dan lugar a déficits de memoria espacial, mientras que las lesiones del hipocampo ventral producen alteraciones similares a la ansiedad (Bannerman y cols., 2004; Pentkowski y cols., 2006; Fanselow y Dong, 2010). Estas diferencias en la función pueden explicarse en parte por la conectividad de cada región. Por ejemplo, las regiones del hipocampo

ventral proyectan hacia áreas involucradas en la regulación emocional, en particular, la mPFC, la amígdala, el BnST y el PVN (Fanselow y Dong, 2010).

4.1.3. EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE LA MEMORIA

Los efectos del estrés en los procesos de aprendizaje y formación de nuevas memorias han sido ampliamente estudiados. Los resultados al respecto han sido muy variables, facilitando o deteriorando la memoria en función del tipo de estrés, intensidad, duración, tipo de aprendizaje, modelo experimental y del momento en que ocurra (dentro o fuera del contexto de aprendizaje). Estos estudios se han centrado en el hipocampo, aportando evidencia de que es una estructura crucial para la consolidación de la memoria mediada por los GCs (Roosendaal, 2003). La exposición intensa o repetida a eventos estresantes, al igual que la administración crónica de GCs deteriora la formación de memorias dependientes del hipocampo (McEwen, 2007; Kim y Diamond, 2002), efecto asociado con cambios morfológicos y en el metabolismo celular en las neuronas hipocámpicas (disminución de la actividad basal, de la ramificación dendrítica, reducción en la densidad de espinas dendríticas, supresión de la LTP, disminución de la expresión de factores tróficos, etc). El estrés crónico promueve además la retracción de la arborización dendrítica, reducción de la densidad de espinas dendríticas y supresión de la LTP en neuronas de la corteza prefrontal medial, alteraciones asociadas deterioro en la memoria de trabajo (McEwen, Nasca y Gray, 2016). En contraste al estrés crónico, el estrés agudo facilita la adquisición y consolidación de memorias emocionales de naturaleza aversiva, efecto asociado a un aumento de la actividad neural, incremento en la longitud de las ramificaciones dendríticas, mayor densidad de espinas dendríticas, mejora de la LTP y la expresión de factores tróficos en neuronas de la amígdala basolateral (McEwen y cols., 2015). Sin embargo, los efectos del estrés agudo en memorias dependientes del hipocampo son variados y se relacionan con el momento de su inducción (durante la fase de adquisición, consolidación o recuperación de la memoria) y las concentraciones de GCsalcanzadas (Sandi y Pinelo Nava, 2007).

Para explicar, al menos parcialmente, tanta variabilidad en los resultados, se ha postulado un modelo que asume que un evento estresante mejora la memoria si se experimenta dentro del contexto del episodio de aprendizaje (estrés intrínseco) y si las hormonas y los neurotransmisores que se liberan en respuesta al estrés actúan en los circuitos cerebrales que se activan por el episodio mismo de aprendizaje. Por otro lado, la sesión estresante afecta negativamente la memoria si se experimenta fuera del contexto de aprendizaje (Joëls y cols., 2006). Esta visión se basa principalmente en los diferentes cursos temporales de las acciones de catecolaminas y GCs. Las catecolaminas ejercen efectos rápidos y de relativamente corta duración, mientras que las acciones de los GCs son principalmente genómicas, es decir, diferidas y de larga duración. Además de las acciones genómicas, los GCs tienen efectos rápidos, no genómicos, que están mediados por receptores unidos a la membrana (Groeneweg y cols., 2011; Karst y cols., 2005, 2010). Las catecolaminas y los GCs de acción rápida facilitan los procesos de aprendizaje y memoria a corto plazo en un estado de "modo de formación de memoria" (Diamond y cols., 2007; Roozendaal y cols., 2009). En el "modo de formación de memoria", se mejora la percepción, la atención, la codificación y la consolidación temprana de los eventos en curso; las capacidades cognitivas del organismo están dirigidas a hacer frente al evento estresante actual y, por lo tanto, mejora su almacenamiento en la memoria. Sin embargo, a medida que transcurre el episodio estresante, los niveles de catecolaminas vuelven a los valores basales y se inician las acciones genómicas de los GCs; las acciones de GCs mediados por genes pueden suprimir el procesamiento de nueva información y, por lo tanto, perjudicar los procesos de memoria a largo plazo no relacionados con la liberación de GCs (estrés extrínseco).

4.1.4. ESTRÉS INTRÍNSECO

Como se mencionó en el apartado anterior, un evento estresante de tipo intrínseco mejora la memoria si se experimenta dentro del contexto del propio aprendizaje. En este panorama, el estrés por inmovilidad, activa una vía típicamente involucrada en procesos de aprendizaje y memoria, es decir, la vía ERK-MAPK mediada por receptor NMDA (Canevari y cols., 1994; Sweatt y cols., 2004; Cammarota y cols., 2000; McHugh y cols., 2007). Existe una gran cantidad de evidencia que indica que las catecolaminas de acción rápida y los efectos GCs no genómicos facilitan la consolidación de la memoria mediados por receptores unidos a membrana (Groeneweg y cols., 2011, Karst y cols., 2005 y Karst y cols., 2010). Las catecolaminas al no atravesar barrera hematoencefálica activan adrenoceptores en aferentes vagales que terminan en el núcleo del tracto solitario (Williams y Clayton, 2001). Las células noradrenérgicas del núcleo del tracto solitario estimulan la amígdala basolateral directa o indirectamente a través del *locus coeruleus*. En la amígdala basolateral, el β -adrenoceptor se acopla directamente a la adenilato ciclasa para estimular la formación de cAMP. Los GCs afectan el sistema noradrenérgico presinápticamente en grupos de células noradrenérgicas del tronco encefálico que se proyectan a la amígdala basolateral e interactúan con el sistema β -adrenérgico post-sinápticamente. Evidencias recientes sugieren que estos efectos rápidos de los GCs en el sistema noradrenérgico pueden estar mediados por receptores unidos a membrana que activan una cascada de señalización no genómica acoplada a proteína G que conduce a alteraciones de desarrollo rápido en la excitabilidad neuronal (Barsegyan y cols. 2010 y Roozendaal y cols., 2010). Finalmente, la activación inducida por GCs y noradrenalina de la amígdala basolateral puede modular procesos de memoria en otras áreas cerebrales tales como el hipocampo y la corteza prefrontal.

4.1.5. ESTRÉS EXTRÍNSECO

Las catecolaminas de acción rápida y los efectos no genómicos de los GCs facilitan la consolidación de la memoria mediada por receptores membranales, mientras que sus acciones genómicas tardías suprimen el procesamiento de nueva información después del aprendizaje original y, por lo tanto, promueven su consolidación en la memoria de largo plazo (Buchanan y Lovallo, 2001 y Cahill y cols., 2003). Sin embargo, si un individuo es expuesto a una sesión estresante tiempo antes de aprender una tarea específica (~30 a ~60 min) y el "modo de acción glucocorticoide genómico" ya está activo durante la adquisición de la tarea, la sesión estresante puede obstaculizar los procesos tanto de aprendizaje como de consolidación de la memoria. Los efectos deletéreos de la sesión estresante y los GCs en la memoria (Buchanan y cols., 2006, De Quervain y cols., 1998 y Kuhlmann y cols., 2005) podrían deberse al hecho de que no existe una relación directa entre el factor estresante y la tarea de aprendizaje, es decir, el estresor puede ser experimentado como "fuera de contexto".

Diversos estudios han demostrado que el estrés agudo inducido antes del entrenamiento tiene un efecto perjudicial sobre la consolidación de la memoria sin afectar la adquisición (Kim y col., 2001, Park y cols., 2008, Sandi y cols., 2005); tal deterioro de consolidación inducido por estrés se ha asociado a alteraciones celulares y moleculares, incluyendo una reducción de la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (pCAMK-II) total y fosforilada, el elemento de respuesta a cAMP fosforilado (pCREB), la expresión de c-fos, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM), la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc) y la densidad dendrítica en el hipocampo (Almaguer-Melian y cols., 2012, Diamond y cols., 2006, Sandi y cols., 2005, Sardari y cols., 2015, Vanelzakker y cols., 2011, Zoladz y cols., 2012).

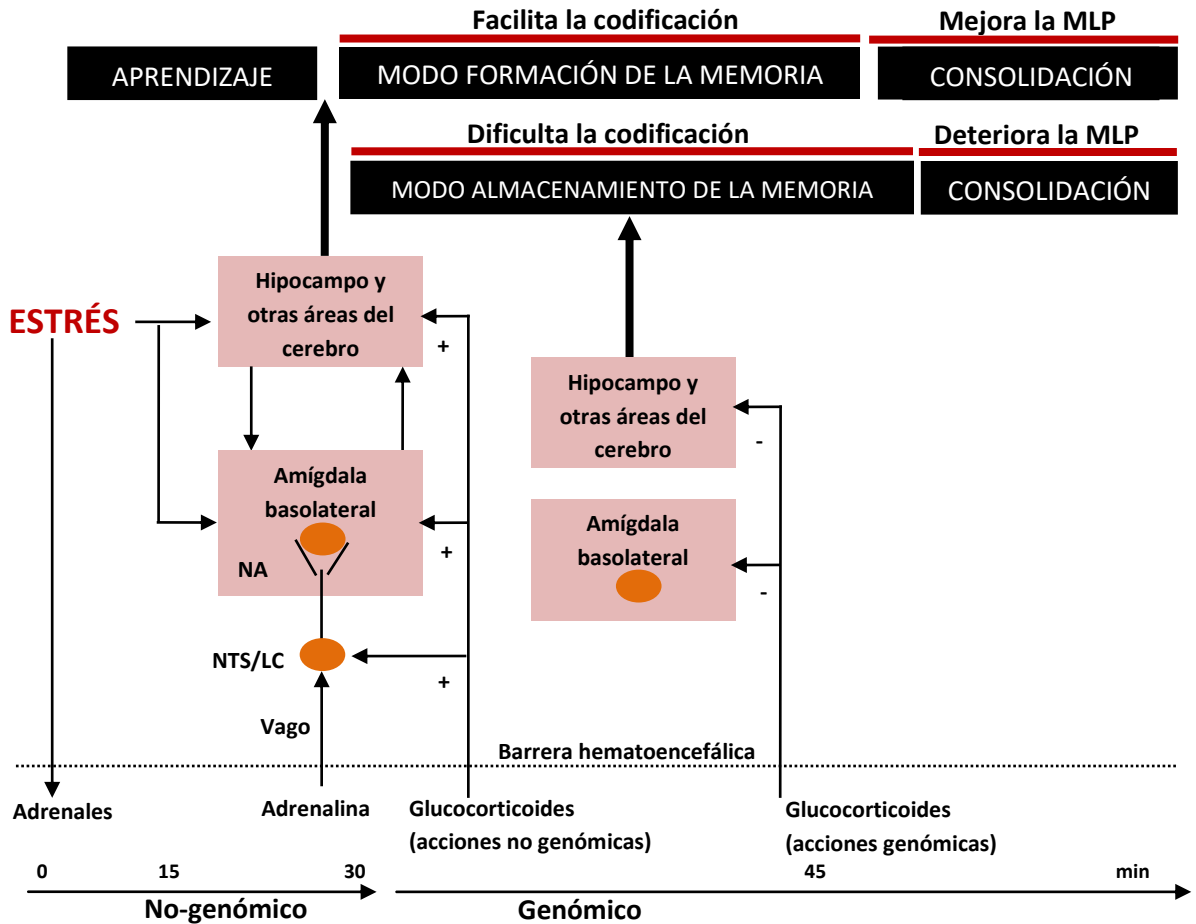


Figura 2. Efectos opuestos de una sesión estresante sobre el aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo. a) sesión estresante dentro del contexto o intrínseco. b) sesión estresante fuera del contexto o extrínseco. A. El estrés intrínseco promueve la excitabilidad de las neuronas del hipocampo por aumento de la liberación de norepinefrina (NE) y glutamato (Glu), y por los efectos no genómicos de la corticosterona. Posteriormente, la actividad hipocámpica entra en una fase refractaria debida a la desensibilización de receptores de glutamato tipo NMDA y a los efectos genómicos de la corticosterona B. El estrés agudo inducido inmediatamente antes o después del entrenamiento facilita los procesos la consolidación de la memoria; por el contrario, su inducción con anticipación al entrenamiento deteriora la memoria a largo plazo. Adaptado de Cadle y Zoladz 2015 y McEwen 2007 NA: Noradrenalina; NTS: Nucleus tractus solitaries; LC: Locus coeruleus. Modificado de Schwabe, 2017.

4.1.6. MECANISMOS EPIGENÉTICOS ASOCIADOS AL ESTRÉS

Hasta donde sabemos, no se han reportado posibles mecanismos epigenéticos implicados en el deterioro agudo de la memoria inducida por estrés fuera del contexto de aprendizaje. Se han descrito, sin embargo, algunos de los mecanismos que participan en la regulación de la expresión génica a consecuencia tanto del estrés crónico como el agudo, y algunos de sus efectos sobre el comportamiento. Actualmente existe un gran interés en los mecanismos epigenéticos involucrados en el aprendizaje y la memoria. Levenson y cols., (2004), Gräff y cols., (2012), Dagnas y cols., (2015) han demostrado que el entrenamiento en varias tareas dependientes del hipocampo promueve la acetilación de histonas en dicha estructura y en la corteza prelímbica. Por otra parte, se ha informado que el estrés persistente o de alta intensidad reduce la acetilación de histonas (Benoit y cols., 2015, Rei y cols., 2015) y deteriora la memoria de reconocimiento a través de la regulación de la actividad de los receptores de GCs y la expresión de la HDAC2, así como la regulación a la baja de algunos genes relacionados con la memoria (Rei y cols., 2015; Guan y cols., 2009). Se ha observado que el bloqueo farmacológico de la actividad de HDAC2 resuelve los trastornos cognitivos producidos por la activación prolongada de GR en un modelo de enfermedad de Alzheimer con niveles crónicos de GCs que, se sabe, empeoran las características neuropatológicas (Graff y cols., 2012; de Quervain y cols., 2004). Por el contrario, la expresión de HDAC2 está regulada a la baja en los casos resistentes al glucocorticoide de asma grave y activación farmacológica de HDAC2 con teofilina y antioxidantes con valor terapéutico actual (Ito y cols., 2005; Barnes y cols., 2009). Teniendo en cuenta esta evidencia, es razonable suponer que el deterioro de la memoria inducido por estrés agudo pueda estar mediado, en parte, por la actividad de las HDACs. De hecho, la inhibición farmacológica de estas enzimas previene la ansiedad inducida por el estrés agudo y crónico (Tran y cols., 2014), el dolor visceral inducido por el estrés crónico y la hipersensibilidad somática (Tran y cols., 2013), así como los déficits cognitivos observados en las enfermedades neurodegenerativas (Didonna y Opal,

2015; Rumbaugh y cols., 2015). Sin embargo, no se ha estudiado su eficacia en la prevención del deterioro de la memoria inducido por estrés. Por otra parte se ha demostrado que el estrés inducido por la natación forzada, aumenta pElk-1 en neuronas del giro dentado del hipocampo 15 minutos después, y corresponde a un mecanismo no genómico de los GCs. Tras la fosforilación por pERK1/2, pElk-1 puede unirse al sitio de unión Elk-1 dentro de los elementos de respuesta a SRE y ejercer influencias trans-activacionales dentro los promotores del gen c-fos o egr1 (O'Donnell y cols., 2008; Thiel y cols., 2010), a través del reclutamiento de la histona acetiltransferasa p300 que acetila los residuos de K14 de las histonas H3 (O'Donnell y cols., 2008; Li y cols., 2003), facilitando la consolidación de la memoria. Por lo tanto, la participación de la vía NMDA/ERK1/2/MSK1/2-Elk-1 en respuesta al estrés se pensó que se había resuelto. Un estudio demostró que los GRs actúan como un andamio para facilitar la fosforilación de MSK1/2 y Elk-1 por pERK1/2 (que a su vez activa a la proteína cinasa activada por estrés o mitógeno (RSK2/MSK), las cuales a nivel nuclear ocasionan la activación de factores de transcripción como el elemento de unión de respuesta a cAMP (CREB) y Elk1. La activación de estos factores de transcripción ocasiona el reclutamiento de CBP y P300 que acetilan las Lys de las histonas y por tanto relajan la cromatina (Day y Sweatt, 2011). Estos efectos de los GRs se producen dentro de los 15 minutos posteriores de la natación forzada, por lo que no son tan rápidos como los efectos mediados por los GR membranales reportados (Groeneweg y cols., 2012), pero sí mucho más rápidos que los clásicos efectos genómicos de este receptor corticosteroide (30-60 min). Por lo tanto, ésta representa una novedosa vía no genómica del modo de acción de los GCs. Sin embargo, la identificación de esta vía no proporciona información sobre el mecanismo de acción de los GR sobre el comportamiento del estrés fuera del contexto de aprendizaje.

Existe una evidencia indirecta que proviene de un estudio con ratones que fueron modificados genéticamente de tal forma que los GR no se homodimerizan y, por lo tanto, no pueden unirse a los elementos de respuesta a glucocorticoides, (GRE) malogrando así la formación de memoria espacial, al unirse a otros factores de

transcripción (a la proteína de unión a CREB, e inhibir su actividad HAT) (Oitzl y cols., 2001). Teniendo en cuenta lo anterior, es probable que el deterioro de la memoria a largo plazo inducido por el estrés fuera del contexto de aprendizaje esté regulado, por la actividad de las enzimas HDACs y HATs, y que, este deterioro, a su vez, pueda ser revertido por la administración de inhibidores de las HDACs. Cabe entonces, la siguiente pregunta ¿Existe una relación directa entre la desacetilación de histonas y el deterioro de la memoria inducido por estrés agudo extrínseco?

4.2. MATERIA Y MÉTODOS

4.2.1. ANIMALES

Se utilizaron ratones machos jóvenes de la cepa CD1 entre 20 y 25 g, de la colonia de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo un régimen de luz/oscuridad de 12X12 hrs, con agua y comida *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en el laboratorio durante una semana antes de cualquier procedimiento experimental para permitirles aclimatarse a sus nuevas condiciones de vivienda. Los procedimientos conductuales se llevaron a cabo entre las 08:00 y las 13:00 para evitar el pico de corticosterona circadiano. El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales estuvieron establecidos de acuerdo con las normas establecidas por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de título “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

Durante 3 días (antes de iniciar el entrenamiento) los animales se habituaron a los elementos a los que luego estuvieron expuestos durante el entrenamiento. Para ello, se trasladó cada ratón en una caja de poliestireno sin botella de agua o recipiente de alimentación del bioterio a la habitación experimental durante 5 minutos.

4.2.2. TRATAMIENTOS

Para inhibir las desacetilasas de histonas se utilizó el fenilbutirato de sodio (PB) y el IN14, un fármaco que se puede administrar efectivamente de forma sistémica ya que atraviesa la barrera hematoencefálica con facilidad (ver capítulo 3). El PB y IN14 se administraron por vía intraperitoneal en dosis de 100 mg/kg de peso corporal a las 09:00 a.m. durante 2 días (un día antes de la prueba y el día de la prueba, 1 hora antes de la sesión estresante). Los grupos de vehículo fueron inyectados con solución salina.

4.2.3. SESIÓN ESTRESANTE

El procedimiento de la sesión estresante que se utilizó se basó en el descrito por Porsolt y cols. (1977). Los ratones se colocaron individualmente en un tanque cilíndrico de vidrio (25 cm de altura x 19 cm de diámetro) con $\frac{3}{4}$ partes de agua ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 15 min. Inmediatamente después de la natación, se extrajeron del tanque, se secaron con una toalla y se colocaron en una jaula de calentamiento (37°C) que contenía una almohadilla térmica cubierta con toallas durante otros 15 minutos. Los ratones fueron devueltos a su jaula hogar.

4.2.4. MODELOS CONDUCTUALES

4.2.4.1. LABERINTO ELEVADO EN T (LET)

El LET consta de 2 brazos abiertos opuestos que miden cada uno 33 cm x 5 cm y un brazo cerrado (33 x 5 x 25) que están elevados 50 cm del piso. Los tres brazos se extienden de la plataforma central, donde el sujeto puede entrar libremente tanto a los brazos abiertos como al cerrado.

Se entrenaron grupos independientes: control y tratados ($n = 8$). Durante la sesión de adquisición, cada ratón se colocó al final del brazo cerrado del laberinto y se registró el tiempo para salir de este brazo y entrar con las cuatro patas a cualquiera de los brazos abiertos (latencia de adquisición, LA). La misma operación se repitió en n ensayos posteriores a intervalos de 1 minuto (latencias

de adquisición LA1, LA2, LA3 ...) hasta que todo el grupo alcanzara el criterio de aprendizaje, es decir, una AL = 180 segundos (tiempo de corte); por lo tanto, si un ratón no abandona el brazo en este tiempo, se termina la prueba y se asigna una latencia de 180 segundos. Estar en un brazo abierto es una experiencia aversiva ya que los roedores tienen un miedo innato a la altura y los espacios abiertos (Montgomery, 1955; Pellow y otros, 1985; Treit y otros, 1993). Por lo tanto, cuando el animal se coloca repetidamente dentro del brazo cerrado y se le permite explorar el laberinto, aprenden a evitar los brazos abiertos. Para verificar que los animales no tuvieran ningún impedimento motivacional o motriz que les impidiera realizar la tarea, se realizó un ensayo de latencia de escape (LE), donde se coloca al ratón al final de un brazo abierto en el que ya había estado expuesto previamente y se registra la latencia para dejar este brazo y entrar al brazo cerrado. La memoria a largo plazo se evaluó 48 horas después de la adquisición en un solo ensayo idéntico a los de la sesión de adquisición donde se registra el tiempo para abandonar el brazo cerrado (latencia de retención, LR).

4.2.4.2. PRUEBA DE LOCALIZACIÓN DEL ALIMENTO ENTERRADO (PLAE)

La prueba de búsqueda de alimento enterrado se describió por primera vez en 1971 (Alberts y Galef, 1971). Desde entonces, se han descrito algunas versiones adicionales. Esta prueba se ha utilizado principalmente para investigar las el deterioro olfativo en las enfermedades neurodegenerativas (Lehmkuhl y Fleming, 2014). En el presente trabajo nos dimos a la tarea de modificar la prueba de alimento enterrado con el objetivo de evaluar la memoria espacial, tarea que llamamos “prueba de localización del alimento enterrado”. Los animales se habituaron en la jaula de prueba para reducir la actividad exploratoria inducida por la novedad, y así disminuir la variabilidad de la respuesta dentro de los grupos. El procedimiento consistió en estandarizar el tamaño de la jaula, profundidad de la cama, tamaño de la comida, tiempo de privación de alimentos, tipo de alimento (según la cepa).

La prueba consiste de dos sesiones (fig. 1). La sesión de entrenamiento (adquisición) que consta de n ensayos (intervalo inter-ensayo de 1 minuto), en los que cada ratón se colocó al azar en una esquina de la caja de acrílico (40 x 52 x 20 cm) cubierta con una capa de aserrín de 3 cm y una comida muy apetecible (cereal azucarado, "Fruit Loops de Kellog's") enterrada aproximadamente a 1 cm debajo del aserrín en un cuadrante fijo de la caja. La ubicación del cereal en todas las pruebas fue la misma con sus respectivas claves espaciales (ver fig. 1). Si los ratones no encuentran el trozo de cereal en 180 segundos, se les guía con cuidado hacia el cuadrante objetivo donde el alimento fue colocado en la superficie (ensayo 0). Una vez encontrado el alimento se permite que los ratones lo consuman durante 5 segundos. En esta sesión, los animales deben ayunar durante 24 horas con acceso *ad libitum* al agua. Una semana previa al inicio del experimento, los ratones se habitúan al cereal en su caja hogar. Cabe mencionar que no se debe omitir este paso porque los ratones son neofóbicos a los alimentos y no buscarán el alimento durante el entrenamiento si no lo han comido anteriormente. Después de cada ensayo de adquisición, los ratones se devuelven a su caja hogar, se remueve el aserrín de la caja de prueba y se limpia con una solución de etanol al 10%, con el fin de eliminar las marcas odoríferas. Cuarenta y ocho horas después de la adquisición se evaluó la memoria a largo plazo en una sola sesión en la cual la comida se retira del aserrín y se les permite explorar a los ratones durante 300 segundos, se registra el tiempo en que el ratón llega al sitio donde se encontraba el alimento enterrado (la misma ubicación que en la adquisición), y el tiempo de exploración en este primer cuadrante. Todas las sesiones se grabaron con una cámara de video para cuantificar el tiempo en encontrar el cereal y el tiempo de exploración.

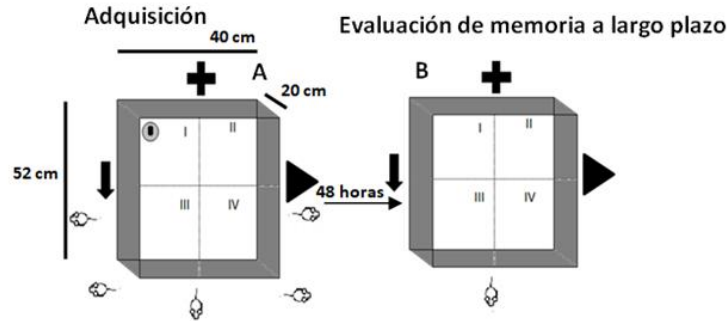


Figura 3. Esquema de la prueba de localización de alimentos enterrados. Vista superior de la caja, donde se observa la comida enterrada (frutloop) en uno de los cuatro cuadrantes (cuadrante 1, punto negro). A) Sesión de adquisición que consiste en n nsayos, donde los ratones se colocaron al azar dentro de la caja. B) Evaluación de la retención de la memoria espacial a largo plazo: exploración de 300 s sin el alimento enterrado. La cruz, la flecha y el triángulo corresponden a las claves espaciales reales que se colocaron en las paredes de la sala experimental.

4.2.5. ANÁLISIS DE CORTICOSTERONA

Cuatro animales por grupo fueron sacrificados por decapitación y se tomaron muestras de sangre inmediatamente después de la adquisición. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 20 min a 4°C, el plasma se recogió y se almacenó a -20 °C. La concentración plasmática de corticosterona se midió usando el kit de ensayo inmunosorbente ligado a enzimas de corticosterona (ab108821, Abcam), siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia a 450 nm se leyó inmediatamente en un lector de microplacas (Biorad-Ultramark). Cada muestra se ejecutó por triplicado y la densidad óptica media se convirtió en concentración.

4.2.6. ACTIVIDAD DE LA HDAC2 EN HIPOCAMPO DE RATÓN

4.2.6.1. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES

Se partió de fragmentos de tejido de hipocampo de ratón de 100 mg, a los que se les añadió 1 mL de Tampón 1 (10mM HEPES pH 7.5; 10 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA, 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 µg/mL Aprotinina; 1 µg/mL Leupeptina. El tejido se homogenizó cuidadosamente en tubos eppendorf. Este procedimiento se realizó en frío (~ 4 °C). Se incubó por 15 minutos en hielo, posteriormente se

agregó 25 μ L de NP40 al 10% y se agitó en vortex (10 segundos). Finalmente se centrifugó durante 1 minuto a 10,000 rpm a 4°C, se guardó el sobrenadante a -70 °C (extracto citoplasmático).

El pellet (extracto nuclear) se resuspendió en 250 μ L de Tampón 2: 20mM Hepes pH 7.9; 400mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA, 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 μ g/mL Aprotinina; 1 μ g/mL Leupeptina. Se incubó en hielo durante 30 minutos en el agitador vortex de manera continua. Se procedió a centrifugar durante 5 minutos a 9000 rpm a 4°C, se colectó el sobrenadante (extracto nuclear) y se almacenó a –70°C hasta su valoración y utilización en alícuotas de 10 μ L.

En los cálculos de concentración de proteínas nucleares se empleó el método de Bradford. La unión de las proteínas con el reactivo de Bradford produce un cambio en el color del reactivo, y por tanto un cambio en su absorbancia. El reactivo Bradford contiene ácido fosfórico, metanol y azul de Comassie que al unirse a los residuos aminoacídicos de proteínas y en especial de arginina, cambia su máximo de absorbancia de 465 a 595 nm. (276)

PROCEDIMIENTO:

Se realiza una recta patrón de BSA, para posteriormente interpolar las muestras de proteínas nucleares de concentración desconocida. En cada pozo de la placa se coloca 180 μ l de Bradford (1x) con 20 μ l de H₂Odd, correspondiente al blanco o de la dilución de BSA: 20 μ l de BSA en 180 μ l de H₂Odd (ver tabla 1). Para las muestras de proteínas nucleares se añade 20 μ l del extracto nuclear (100%) o de la dilución extracto nuclear con H₂Odd, más 180 μ l de Bradford (1x), y se lee la absorbancia a 550nm.

Tabla 1. Curva patrón.

Concentración final	BSA (20 μ l de BSA en 180 μ l H ₂ Odd)	H ₂ Odd (μ l)	Volumen final (μ l)	Volumen en cada pozo (μ l)	Volumen de Bradford (1x) en cada pozo (μ l)
0	0	80	80	20	180
1	4	76	80	20	180
2	8	72	80	20	180
3	12	68	80	20	180

6	24	56	80	20	180
12	48	32	80	20	180
Muestra de hipocampos (n=4 por grupo)	Proteínas nucleares (µl)	H ₂ Odd (µl)	Volumen final (µl)	Volumen en cada pozo (µl)	Volumen de Bradford (1x) en cada pozo (µl)
	4	76	80	20	180
	8	72	80	20	180
	20	60	80	20	180
	40	40	80	20	180
	80	0	80	20	180

Los cálculos consisten en realizar una recta patrón de concentración de proteínas con BSA e interpolar en esa recta los valores de absorbancia obtenidos de nuestras muestras. El valor que se utiliza para hacer la recta y para calcular la concentración de las muestras es:

$$\Delta Abs = Abs_{\text{muestra}} - Abs_{\text{blanco}}$$

KIT DE ENSAYO EPIQUIK™ HDAC2

La actividad HDAC se determinó utilizando un kit colorimétrico de actividad HDAC2 Fluor de Lys (consulte el Manual de instrucciones, P-4006), que mide de manera semicuantitativa la cantidad de HDAC2 sin la necesidad de usar la técnica de electroforesis. La señal de absorbancia se detectó a 450 nm mediante un Espectrofotómetro para Microplacas Epoch de BioTek. En este experimento, el inhibidor de las HDACs, PB, se usa como control positivo, mientras que en el compuesto IN14 se evalúa su capacidad inhibitoria *in vivo* sobre las HDAC2 en hipocampo de ratón.

4.2.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la Figura 4 se presenta el diseño utilizado en esta investigación. Los factores incluidos en el diseño fueron: 1) inhibición de las HDACs (vehículo, IN14 y PB); 2) estrés agudo (presente o ausente) y, 3) entrenamiento (presente o ausente), lo que supuso la conformación de 12 grupos experimentales. Dada

la complejidad del diseño, y el hecho de que en los animales entrenados las muestras fueron recolectadas inmediatamente después de la prueba de memoria, se analizaron los efectos del estrés y la inhibición de las HDACs de manera separada en animales sin entrenamiento y animales con entrenamiento.

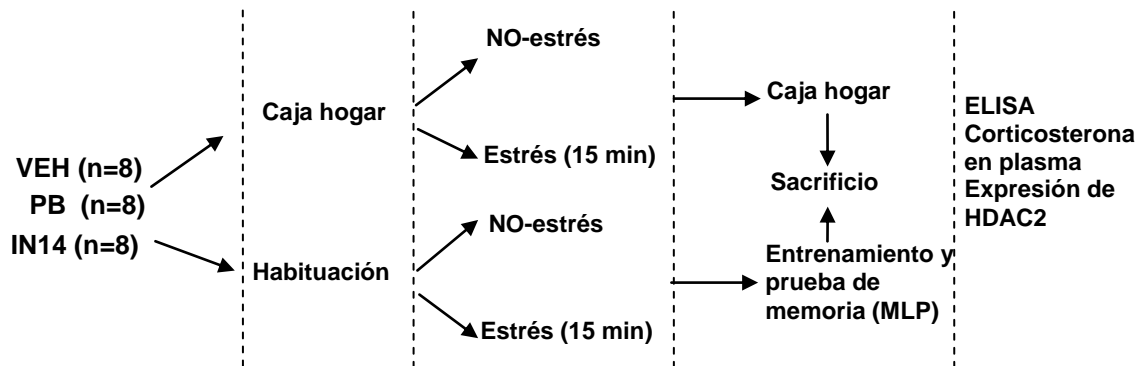


Figura 4. Diseño experimental. Los animales de cada grupo experimental recibieron una inyección de vehículo, IN14 y PB. Los sujetos experimentales fueron habituados a los cuartos de conducta, mientras que el resto permaneció en su caja hogar. Después de la habituación y no-habituación, fueron estresados por nado (15 min) y el resto permaneció en la caja hogar. Los animales habituados fueron entonces entrenados en el laberinto elavado en T y a la prueba de la localización de la comida enterrada. Veinticuatro horas después se recolectaron muestras de plasma sanguíneo y tejido cerebral en sujetos de todos los grupos experimentales para realizar ensayos de ELISA para corticosterona y expresión de HDAC2.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, seguidos de un análisis *post-hoc*. Se hicieron comparaciones planeadas entre grupos mediante la prueba de *t-student* y comparaciones contra el azar mediante una prueba t de una muestra (*one-sample t test*). Para los análisis de correlación entre variables dependientes se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. El valor crítico de significancia para todos los análisis estadísticos se estableció en 0,05. Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SigmaStat 3.01. Las Figuras muestran los valores promedio (\bar{x}), error estándar (SEM) de los datos de cada grupo experimental.

4.4. RESULTADOS

LET

La figura 5 muestra que durante la adquisición, los ratones de los 6 grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje al permanecer 180 segundos en el brazo cerrado después de 4 ensayos de entrenamiento. Sin embargo en el grupo vehículo estresado (sin inhibidor de las HDACs) la memoria no se consolidó 48 horas después la adquisición. El ANOVA de medidas repetidas de dos vías mostró un efecto significativo de los tratamientos ($F_{5, 22} = 51.72, p > 0.0001$), así como en la interacción ($F_{20, 168} = 14.07, p > 0.0001$) y del ensayo ($F_{4, 168} = 410.7, p < 0,0001$). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró que hay diferencias significativas en las LA de los grupos sin estrés (LA1 vs. LA2, LA3, LA4, $*** p < 0.001$), sin embargo no hay diferencias significativas entre las LA4 y la LR (ns). En los grupos estresados se observan diferencias significativas en las LA, Veh-E: LA1 vs LA2, $* p < 0.05$; LA1 vs LA3, LA4, $*** p < 0.001$; PB-E, IN14-E: LA1 vs LA2, LA3, LA4, $*** p < 0.001$, mientras que la comparación entre en las LA4 vs. LR solo se observan diferencias significativas en el grupo Veh-E ($*** p < 0.001$), de igual forma se observan diferencias significativas entre tratamientos (Veh-E vs Veh, PB-E, IN14-E, $*** p < 0.001$).

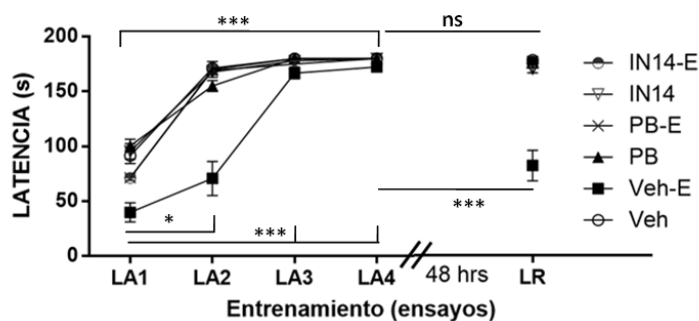


Figura 5. La administración intraperitoneal de IN14 y PB revierten el efecto de la sesión estresante en la memoria de largo plazo. A) Curvas de aprendizaje en laberinto elevado en T durante la sesión de entrenamiento (LA1, LA2, LA3 y LA4) y latencias de retención (LR). $* p < 0.05$, $*** p < 0.001$. ANOVA de medidas de dos vías con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey. N = 8 ratones / grupo.

La LE es un parámetro importante para descartar efectos sobre procesos no mnemónicos (por ejemplo motores) que pudieran afectar de manera inespecífica en la ejecución de la prueba. A través de los datos obtenidos para este parámetro y su respectivo análisis se deduce que los sujetos ejecutaron de manera óptima la prueba y que no tuvieron algún impedimento motivacional o motriz severo que limitara su desempeño. Otro parámetro de suma importancia es la latencia de retención que se mide en la sesión de prueba e indica la retención de la memoria a largo plazo; el valor máximo es de 180 s.

En figura 6 se observa que los grupos tratados con los inhibidores de las HDACs y el grupo control permanecieron casi los 180 s en el brazo cerrado, lo que sugiere que estos animales consolidaron perfectamente lo aprendido en la sesión de adquisición (LA1-LA4); sin embargo los animales estresados no consolidaron este evento ya que, como se esperaba, el estrés extrínseco (30 minutos antes del aprendizaje) inhibe la consolidación de la memoria, lo cual se evidencia en que los animales estresados no recuerdan el episodio de hallarse en el laberinto, por lo que tienden a explorar nuevamente los brazos abiertos.

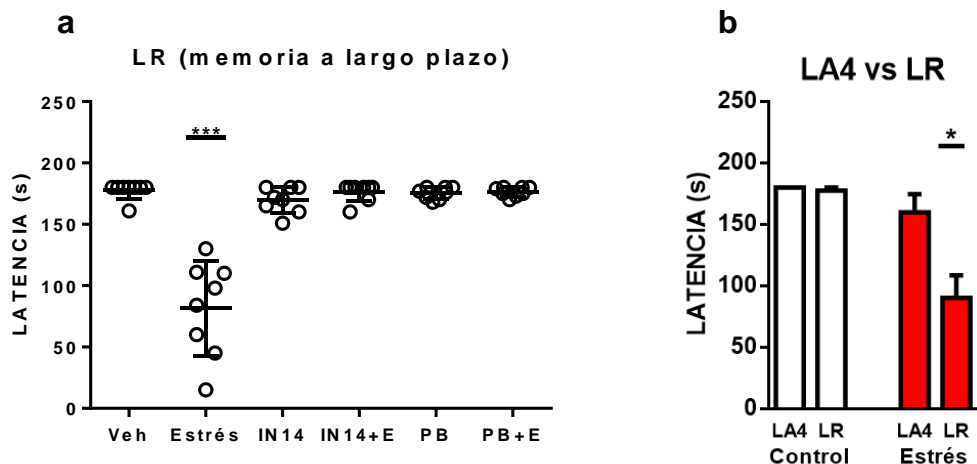


Figura 6. Los inhibidores de las HDACs mejoran la memoria a largo plazo en animales estresados. Latencias de retención y comparativo LA4 durante el entrenamiento. Cada columna representa la media \pm EE de la LR, donde el valor máximo es de 180 s; $n = 8$. a) Se muestra las latencias de retención de los grupos tratados y los controles (estrés/sin estrés; Veh-E vs todos, $***p = 0.0001$). b) Se muestra el comparativo entre LA4 y la LR. t de Student: Estrés LA4 vs. LR, $*p = 0.0105$, $t = 2.954$.

PLCE

En la figura 7 se muestra el tiempo que cada roedor invierte en la búsqueda del pellet azucarado hasta encontrarlo (6 ensayos). Estos resultados revelan que conforme aumenta el número de ensayos le es más fácil encontrar tal recompensa (ubicado siempre en el cuadrante I), por lo que el tiempo disminuye progresivamente ensayo tras ensayo, sugiriendo que el estrés extrínseco no afecta el aprendizaje. Los grupos control, IN14, IN14-E, PB y PB-E recuerdan perfectamente la ubicación del pellet 48 hrs después del entrenamiento. Sin embargo, el grupo estresado no la recuerda (no se consolida la memoria).

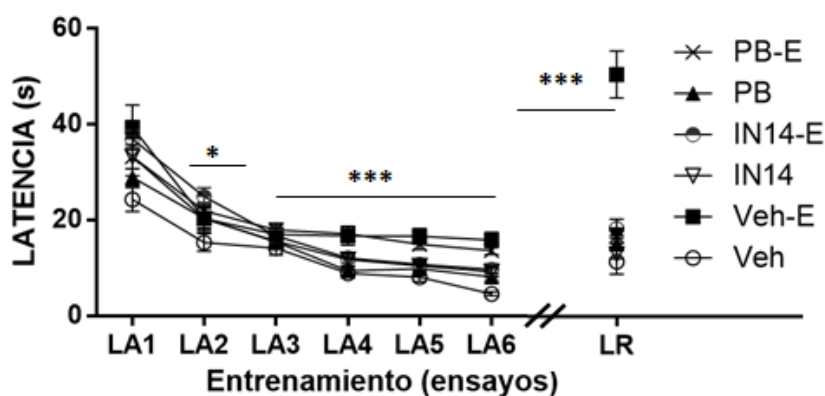


Figura 7. Prueba de localización de alimento enterrado: curvas de aprendizaje de ratones intactos durante la sesión de entrenamiento (LA1, LA2, LA3 y LA4) y latencias de retención (LR). # $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. N = 10 ratones / grupo. PB: fenilbutirato de sodio; IN14: compuesto sintetizado. Los datos representan medias \pm SEM.

El ANOVA de medidas repetidas de dos vías mostró un efecto significativo de los tratamientos ($F_{5, 54} = 13.91$, $p > 0.0001$), así como en la interacción ($F_{30, 324} = 8.978$, $p > 0.0001$) y del ensayo ($F_{6, 324} = 121.0$, $p < 0.0001$). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró que hay diferencias significativamente en las latencias de adquisición (LA1 vs. LA2, * $p < 0.05$, LA1 vs. LA3, LA4, LA5, LA6, *** $p < 0.001$), y la LA6 vs. LR (*** $p < 0.001$) del grupo Veh-E y entre tratamientos (Veh vs Veh-E, *** $p < 0.001$; Veh vs IN14-E, # $p < 0.05$; Veh vs PB-E, \$\$ $p < 0.01$).

Otro de los parámetros importantes a evaluar es el tiempo de exploración que invierten los animales para encontrar el pellet en el cuadrante 1 sin que éste se halle presente (tiempo máximo de exploración de 300 s). En la figura 8 se puede observar que hay diferencias significativas entre el grupo Veh-E con respecto a los grupos: Veh (** $p = 0.0040$), IN14-E y PB-E (** $p = 0.0032$), siendo que la conducta exploratoria en el cuadrante objetivo de los animales estresados es menor en comparación con los grupos tratados y el vehículo no estresado, lo que evidencia que los animales estresados sin tratamiento no recuerdan la ubicación del pellet, ni tienden a explorar más en el cuadrante 1 a diferencia de los otros cuadrantes. Lo anterior sugiere que el estrés 30 minutos antes del aprendizaje suprime la consolidación de la memoria espacial a largo plazo.

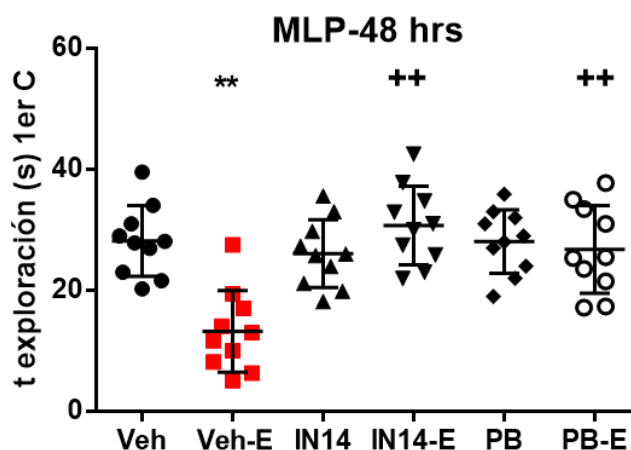


Figura 8. Los inhibidores de las HDACs revierten el efecto del estrés sobre la memoria a largo plazo. Tiempo de exploración del cuadrante 1 (sin alimento enterrado). Cada columna representa la media \pm EE, donde el tiempo máximo de exploración es de 180 s; $n = 10$. ANOVA ($F = \dots P < 0.05$); prueba post hoc de Tuckey: Veh vs. Veh-E: ** $P = 0.0040$; Veh-E vs. IN14-E: ** $P = 0.0025$; Veh-E vs. PB-E: ** $P = 0.0032$.

ANÁLISIS DE CORTICOSTERONA

La figura 9 muestra el efecto de los inhibidores de las HDACs (IN14 y PB) sobre el nivel de corticosterona provocada por estrés extrínseco. El ANOVA de dos factores mostró diferencias significativas para el estrés y el tratamiento ($F_{1, 18} = 8.138$, $p = 0.0106$; $F_{2, 18} = 5.086$, $p = 0.0177$, respectivamente), con una interacción significativa entre los dos factores de $F_{2, 18} = 10.92$, $p = 0.0008$. El análisis post-hoc de Tuckey muestra que los animales estresados inyectados con vehículo tienen niveles altos de corticosterona en plasma (Veh vs. Veh-E, $###p = 0.0008$), mientras que los inhibidores de las HDACs evitan tal efecto (Veh-E vs. PB-E, $***p = 0.0002$; Veh-E vs. IN14-E, $**p = 0.0014$). No se observaron otras diferencias significativas (PB-E vs. IN14-E, ns = 0.5783).

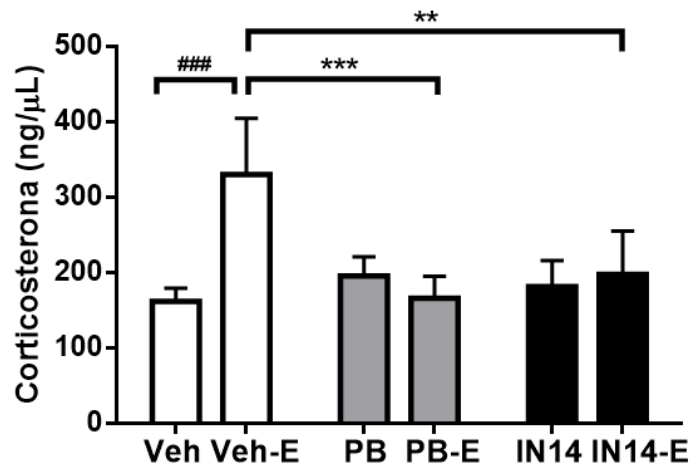


Figura 9. IN14 y PB suprimen el aumento de corticosterona inducido por el estrés extrínseco. Gráfico de barras que ilustra la concentración de corticosterona plasmática inducida por el estrés por nado (15 min). Los animales de todos los grupos tuvieron concentraciones fisiológicas plasmáticas de corticosterona, excepto en animales estresados a los que se les inyectó vehículo (Veh-E). La administración de PB e IN14 en los animales estresados previene este efecto ya que las concentraciones plasmáticas de corticosterona después del entrenamiento no fueron significativamente diferentes de aquellos inyectados con vehículo no estresados. $n = 4$. $**p = 0.0014$, $***p = 0.0008$, $###p = 0.0008$.

ACTIVIDAD DE LA HDAC2 EN HIPOCAMPO DE RATÓN

Los tratamientos experimentales modificaron significativamente la expresión de HDAC2 en el hipocampo con respecto a la línea de base (ANOVA: $F_{(5, 18)} = 117.0$, $p < 0.0001$; Figura 11). Los análisis post-hoc mostraron que la expresión de HDAC2 en esta región fue mayor en los animales sometidos a estrés (Veh vs. Veh-E: $t = 7.610$, $p = 0.0009$; PB vs. PB-E: $t = 7.248$, $p = 0.0004$; IN14 vs. IN14-E: $t = 2.594$, $p = 0.04$).

Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 11) mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico ($F_{(2, 9)} = 7.208$, $p = 0.0135$), en el factor estrés ($F_{(1, 9)} = 129.4$, $p = 0.0001$) y la interacción fármaco-estrés ($F_{(2, 9)} = 26.34$, $p = 0.0002$) sobre la expresión de HDAC2. Los análisis post-hoc confirmaron que los animales estresados e inyectados con vehículo tuvieron menor expresión de HDAC2 (Veh vs. Veh-E, $t = 7.610$, $p = 0.009$), la administración de IN14 y PB previno este efecto (Veh-E vs. PB-E, $t = 5.587$, $p < 0.001$; Veh-E vs. IN14-E, $t = 6.14$, $p = 0.001$).

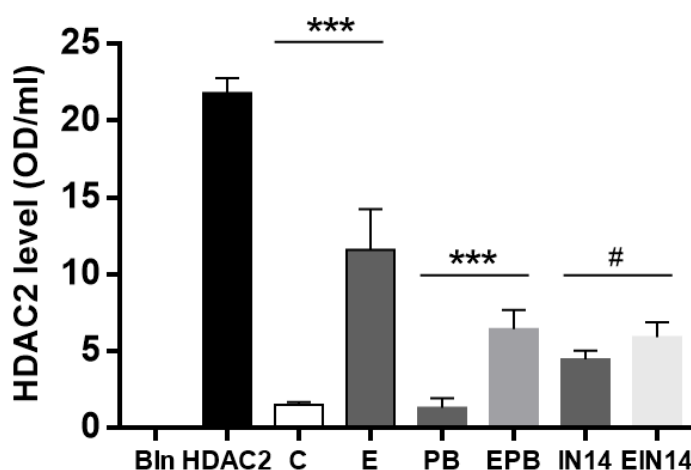


Figura 11. Los inhibidores de las HDACs, IN14 y PB, previenen el incremento en la expresión de la HDAC2 en el hipocampo de ratón provocado por estrés. $n = 4$. # $p = 0.05$, *** $p > 0.001$.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL

LA INHIBICIÓN DE LAS HDACS PREVIENE QUE EL ESTRÉS DETERIORE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE LARGO PLAZO

De forma consistente con lo reportado en la literatura (Kim y cols., 2001; Diamond y cols., 2006; Park y cols., 2008), encontramos que el estrés agudo inducido antes del entrenamiento en una tarea dependiente de hipocampo deteriora la consolidación de la memoria, efecto evidenciado por el incremento en la latencia para encontrar el alimento enterrado, así como una disminución en la latencia de permanencia en el brazo cerrado del LET. En diversos estudios se ha demostrado que el estrés agudo impide que el entrenamiento de una tarea dependiente de hipocampo induzca incrementos en la densidad de espinas dendríticas, la fosforilación de CAMK-II y CREB y el incremento en la expresión de c-Fos, BDNF, NCAM y Arc en el hipocampo de roedores (Kim y cols., 2001, Sandi y cols., 2005; Diamond y cols., 2006; Park y cols., 2008; Vanelzakker y cols., 2011; Zoladz y cols., 2012; Sardari, Rezayof and Khodagholi, 2015). En la presente investigación, encontramos que la administración sistémica de dos inhibidores de las HDACs de clase I (IN14 y PB) evitan que el estrés agudo extrínseco afecte la consolidación de la memoria, lo que indica un papel central de la acetilación de histonas como mecanismo epigenético que media los efectos deletéreos del estrés agudo sobre la memoria.

El hecho de que la inhibición de las HDACs prevenga el efecto deletéreo del estrés agudo sobre la memoria dependiente de hipocampo está en concordancia con estudios recientes en roedores que muestran que la administración sistémica de TSA atenúa los efectos adversos inducidos por la privación de sueño (Duan y cols., 2016) sobre la consolidación de la memoria. En modelos de enfermedades neurodegenerativas se ha encontrado que la inhibición farmacológica de las HDACs o, el silenciamiento de HDAC2, evita la hipoacetilación de las histonas y el decremento en la expresión génica (Fontán-Lozano y cols., 2008; Fischer y cols., 2010; Gräff y cols., 2012; Rumbaugh y cols.,

2015), además de rescatar o aminorar el déficit cognitivo. Los efectos protectores reportados del IN14 y PB sugieren un potencial uso de estos fármacos para prevenir los efectos acumulativos de los eventos estresantes. La administración de inhibidores de las HDACs también previene otras alteraciones del estrés, tales como el incremento en el despliegue de conductas defensivas y los comportamientos del espectro depresivo, tal como lo reportamos en el capítulo 3 (Weaver y cols., 2004; Covington y cols., 2009; Tran y cols., 2014, Martínez-Pacheco y cols., 2019).

LA INHIBICIÓN DE LAS HDACs NO MEJORA LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA EN ANIMALES NO ESTRESADOS, PERO FAVORECE LA CONDUCTA EXPLORATORIA

En el presente estudio la administración de IN14 y PB no mejoró la consolidación de la memoria en animales no estresados. Es probable que este hecho se deba a un efecto de techo, o a que los animales del grupo control tuvieron un excelente aprendizaje en la tarea conductual, situación que es difícil superar con la administración de los inhibidores de las HDACs al ser ratones jóvenes intactos (ver discusión del experimento 1). De forma interesante, se encontró que los animales a los que se les administró IN14 y PB exploraron con mayor persistencia el cuadrante donde se encontraba el alimento enterrado, a pesar de no encontrarlo, lo que sugiere que los inhibidores de las HDACs podrían incrementar la motivación en las pruebas conductuales. En este sentido, múltiples estudios han reportado que la inhibición de las HDACs incrementa la motivación y la búsqueda de reforzadores y reduce los síntomas en modelos de depresión si se administra en el hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala, o el núcleo accumbens (Covington y cols., 2009; McQuown and Wood, 2010; Martínez-Pacheco, 2019).

EL EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO SOBRE LA MEMORIA DEPENDE DEL MOMENTO DE SU INDUCCIÓN

El efecto deletéreo del estrés agudo inducido antes del entrenamiento en las tareas dependientes de hipocampo, contrasta con el efecto de mejora que produce cuando se induce inmediatamente después del entrenamiento (estrés intrínseco) y con los efectos benéficos de la administración intraperitoneal de dosis moderadas de corticosterona (0.125 mg/kg) post-entrenamiento (Cerón y Lamprea, 2016). Múltiples estudios en animales, y también en personas, han indicado que los efectos del estrés agudo sobre la memoria dependen de manera crítica de su relación temporal (McEwen, 2007; Sandi y Pinelo-Nava, 2007; Cadle y Zoladz, 2015; Shields y cols., 2017). Se ha observado que los efectos deletéreos del estrés aparecen cuando éste se induce con suficiente anticipación al entrenamiento, mientras que cuando se induce inmediatamente después del entrenamiento, se da un efecto de mejora (McEwen, 2007; Sandi y Pinelo-Nava, 2007). Algunos modelos se han propuesto para explicar estas diferencias asociadas a la relación temporal entre estrés y aprendizaje (ver figura 7 del capítulo 1). En términos generales, se plantea que la liberación inicial de adrenalina y glutamato inducida por el estrés agudo promueve la excitabilidad de las neuronas en hipocampo y favorece la consolidación de la memoria; por el contrario, cuando la inducción del estrés ocurre con anticipación al entrenamiento, la excitabilidad inicial ya ha pasado y promovido una fase refractaria debido a la desensibilización de receptores de glutamato tipo NMDA y a los efectos genómicos de la corticosterona en neuronas del hipocampo, lo que previene la consolidación de la memoria. Estos modelos, sin embargo, no han incluido posibles mecanismos epigenéticos, tales como cambios dinámicos en la acetilación de histonas en el hipocampo, que también parecen estar mediando estos efectos (Covington et al., 2009). De manera consistente, se ha encontrado que el incremento en los niveles de acetilación de histonas induce un aumento en la expresión de proteínas de complejos co-represores como REST o Sin3A que se asocian a proteínas con actividad desacetilasa como HDAC2 y HDAC3 (Lopez-

Atalaya y cols., 2013).

LA INHIBICIÓN DE LAS HDACs PREVIENE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE HDAC2 INDUCIDOS POR EL ESTRÉS AGUDO

Múltiples reportes indican que el incremento en los niveles de GCs induce la expresión de HDAC2 (Guan y cols., 2009; Duan y cols., 2016; Wang y cols., 2017), proteína que, además, puede asociarse con el receptor de glucocorticoides, reprimiendo la transcripción de genes con secuencias GRE en su promotor, o induciendo la trans-represión de genes sin esta secuencia (Ito, Barnes y Adcock, 2000). En el presente estudio exploramos si los cambios a largo plazo en la acetilación de las histonas inducidos por los tratamientos experimentales con los inhibidores de las HDACs, IN14 y PB, se relacionan con cambios en la expresión de la HDAC2 en el hipocampo. En términos generales, encontramos que el estrés agudo alteró a largo plazo la expresión de HDAC2 en el hipocampo de animales entrenados y no entrenados en las tareas dependientes de hipocampo. En animales sin entrenamiento, el estrés incrementó la expresión de HDAC2 en el hipocampo, mientras que en animales estresados con tratamiento con IN14 y PB indujo el decremento de HDAC2. Estos resultados señalan que, como se esperaba, el estrés agudo aumenta la expresión de HDAC2.

Si bien se ha descrito que el complejo GR/glucocorticoide se une a la secuencia GRE en el promotor de HDAC2 para inducir su transcripción (Guan y cols., 2009; Rei y cols., 2015; Wang y cols., 2017), se desconocen los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de HDAC2. Sin embargo, nuestros resultados señalan que la inducción de la expresión de HDAC2 por estrés agudo está regulada por la acetilación de las histonas y que probablemente, otros mecanismos epigenéticos también lo hacen; de hecho, cabe la posibilidad de que los incrementos en HDAC2 puedan posteriormente reducir la acetilación de las histonas en su promotor, reduciendo su transcripción de manera homeostática.

LA INHIBICIÓN DE LAS HDACs PREVIENE EL INCREMENTO DE LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA POR ESTRÉS AGUDO

Dado que la expresión de HDAC2 está regulada por la activación de los GR, y que la respuesta de estrés también depende de dichos receptores en regiones del cerebro que regulan al eje HHA, que a su vez participa en la consolidación de la memoria, resultó esencial conocer los efectos del estrés agudo sobre los niveles de corticosterona, así como su asociación con la expresión de HDAC2.

El estrés agudo aumentó el incremento en los niveles de corticosterona en plasma tras el aprendizaje del LET, aumento asociado con un peor desempeño en la prueba de memoria (disminución en la latencia de permanencia en el brazo cerrado). De forma notable, la inhibición sistémica de las HDACs evitó ambos efectos. Estos resultados indican que la liberación de corticosterona durante la prueba de memoria provocadas por un estrés agudo son mediadas por alteración del balance de acetilación de las histonas.

MODELO PROPUESTO DIRECTA E INDIRECTAMENTE CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS:

En conjunto, estos resultados sugieren que la inhibición de las HDACs contrarresta la hipoacetilación inducida por el estrés agudo, evitando los cambios en el balance de acetilación de las histonas, así como los cambios en la expresión HDAC2 en el hipocampo de ratones macho CD1. Por su parte, la hipoacetilación de las histonas, inducida por el estrés agudo antes del entrenamiento, competiría con la hiperacetilación inducida por el entrenamiento mismo, interfiriendo con la consolidación de la memoria. Sin embargo, la inhibición de las HDACs prevendría la desacetilación de las histonas y evitaría el desbalance de los niveles de acetilación de las histonas permitiendo la consolidación de la memoria y evitando los incrementos en los niveles de corticosterona ante nuevas demandas ambientales.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

El estrés agudo induce la expresión de HDAC2 en el hipocampo, independientemente de si los animales fueron o no entrenados en las tareas dependientes de hipocampo.

La inducción del estrés agudo antes del entrenamiento deteriora el desempeño en la prueba de memoria a largo plazo. Además, el estrés agudo, inducido antes del entrenamiento, potencia el incremento en las concentraciones de corticosterona plasmática en respuesta a la prueba de memoria.

La alteración del balance de acetilación de las histonas mediante la inhibición de las desacetilasas de clase I, previene que el estrés deteriore la consolidación de la memoria espacial, disminuye los niveles de corticosterona en plasma después del aprendizaje, e induce cambios a largo plazo en la expresión de HDAC2, a pesar de que la inhibición de las desacetilasas por sí sola tiene escasos efectos, y no mejora sustancialmente la consolidación de la memoria.

REFERENCIAS

- Abdel-Malek Z. A. (2001). Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci.* 58, 434–41.
- Abrahams S., Pickering A., Polkey C.E., Morris R.G. (1997). Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation *Neuropsychologia.* 35, pp. 11-24.
- Agis-Balboa R. C., Pavelka Z., Kerimoglu C., Fischer A. (2013). Loss of HDAC5 impairs memory function: implications for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 33, 35-44.
- Aguado L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de Neurología.* 32, 373-381.
- Alarcon J. M., Malleret G., Touzani K., Vronskaya S., Ishii S., Kandel E. R., Barco A. (2004). Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein–Taybi syndrome and its amelioration *Neuron.* 42, 947-959.
- Albasser M. M., Dumont J. R., Amin E., Holmes J. D., Horne M. R., Pearce J. M., Aggleton J. P. (2013). Association rules for rat spatial learning: the importance of the hippocampus for binding item identity with item location *Hippocampus.* 23, 1162-1178.
- Alka Saxena & Piero Carninci. (2011). Long non-coding RNA modifies chromatin Epigenetic silencing by long non-coding RNAs. *Bioessays.* 33, 830–839.
- Almaguer-Melian W., et al. (2012). Novelty exposure overcomes foot shock-induced spatial-memory impairment by processes of synaptic-tagging in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 109, 953–958.
- Ashby F. G., Turner B. O., Horvitz J. C. (2010). Cortical and basal ganglia contributions to habit learning and automaticity. *Trends Cogn Sci.* 5, 208-15.
- Atkinson H. C., Wood S. A., Castrique E. S., Kershaw Y. M., Wiles C. C., Lightman S. L. (2008). Corticosteroids mediate fast feedback of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis via the mineralocorticoid receptor. *Am J Physiol.* 294, E1011–22.

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, 5062-73.

Baltan S., Bachleda A., Morrison R. S., Murphy S. P. (2011). Expression of histone deacetylases in cellular compartments of the mouse brain and the effects of ischemia. *Transl Stroke Res.* 2, 411-23.

Bannerman D. M., Rawlins J. N., McHugh S. B., Deacon R. M., Yee B. K., Bast T., Zhang W. N., Pothuizen H. H., Feldon J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 28, 273–83.

Barnes PJ, Adcock IM. (2009). Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet.* 373(9678):1905–17.

Barsegyan A., et al. (2010). Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 16655–16660.

Benoit D., Rakic P., Frick M. (2015). Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced gene expression. *Behavioural Brain Research.* 281, 1–8.

Bousiges O., Neidl R., Majchrzak M., Muller M. A., Barbelivien A., Pereira de Vasconcelos A., Schneider A., Loeffler J. P., Cassel J. C., Boutillier A. L. (2013). Detection of histone acetylation levels in the dorsal hippocampus reveals early tagging on specific residues of H2B and H4 histones in response to learning. *PLoS One.* 8, e57 816.

Bredy T. W., Barad M. (2008). The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem.* 15,39-45.

Brown T. I., Stern C. E. (2014). Contributions of medial temporal lobe and striatal memory systems to learning and retrieving overlapping spatial memories *Cereb. Cortex.* 24, 1906-1922.

Buchanan W., Lovallo R. (2001). Enhanced memory for emotional material following stress-level cortisol treatment in humans. *Psychoneuro endocrinology.* 26, 307–317.

Buchanan W., Tranel D., Adolphs R. (2006). Impaired memory retrieval correlates with individual differences in cortisol response but not autonomic response. *Learn. Mem.* 13, 382–387.

Bussey T. J., Dias R., Amin E., Muir J. L., Aggleton J. P. (2001). Perirhinal cortex and place-object conditional learning in the rat *Behav. Neurosci.* 115, 776-785.

Buzsáki G., Moser E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci.* 2, 130-8.

Cabeza R. & St Jacques P. (2007). Functional neuroimaging of autobiographical memory. *Trends Cogn. Sci.* 11, 219–227.

Cahill L., Gorski L., Le K. (2003). Enhanced human memory consolidation with postlearning stress: interaction with the degree of arousal at encoding. *Learn. Mem.* 10, 270–274.

Cammarota M., et al. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol.* 76, 36–4610.

Canevari L., Richter-Levin G., Bliss V. (1994). LTP in the dentate gyrus is associated with a persistent NMDA receptor-dependent enhancement of synaptosomal glutamate release. *Brain Res.* 667, 115–710.

Cannon W. B (1929a). Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* IX. 399–431.

Cannon W. B (1929b). The sympathetic division of the autonomic system in relation to homeostasis. *Arch Neurol Psychiatry.* 22, 282-94.

Canovas R., Leon I., Serrano P., Roldan M. D. (2011). Cimadevilla Spatial navigation impairment in patients with refractory temporal lobe epilepsy: evidence from a new virtual reality-based task *Epilepsy Behav.* 22, 364-369.

Choi J. K., Howe L. J. (2009). Histone acetylation: truth of consequences?. *Biochem Cell Biol.* 87, 139-50.

Chris M. Bird & Neil Burgess. (2008). The hippocampus and memory: insights from spatial processing *Nature Reviews Neuroscience* volume 9, pages 182–194.

Close T., Hafting, Fyhn M., Molden S., Moser M. B. (2005). Moser Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex *Nature*. 436, 801-806.

Close T., Pooters, Gantois I., Vermaercke B., D'Hooge R. (2016). Inability to acquire spatial information and deploy spatial search strategies in mice with lesions in dorsomedial striatum *Behav. Brain Res.* 298, 134-141.

Cuadrado-Tejedor M., Ricobaraza A. L., Torrijo R., Franco R., Garcia-Osta A. (2013). Phenylbutyrate is a multifaceted drug that exerts neuroprotective effects and reverses the Alzheimer's disease-like phenotype of a commonly used mouse model. *Curr Pharm Des.* 19, 5076-84.

Dagnas M., et al. (2015). Post-training, intrahippocampal HDAC inhibition differentially impacts neural circuits underlying spatial memory in adult and aged mice. *Hippocampus.* 25, 827-37.

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, 581-91.

Day J. J., Sweatt J. D. (2012). Epigenetic treatments for cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology.* 37, 247-60.

Day J., Sweatt J. (2011). Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron.* 70, 813-29.

De Kloet R., Joëls M., Holsboer F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463–475.

De Quervain DJ, Poirier R, Wollmer MA, et al. (2004). Glucocorticoid-related genetic susceptibility for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 13(1):47–52.

De Quervain J., Roozendaal B., McGaugh L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature.* 394, 787–790.

Devan B. D., White N. M. (1999). Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function *J. Neurosci.* 19, 2789-2798.

Diamond M., et al. (2006). Influence of predator stress on the consolidation versus retrieval of long-term spatial memory and hippocampal spinogenesis. *Hippocampus.* 16, 571–576.

Diamond M., et al. (2007). The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia,

flashbulb and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. *Neural Plast.* 60803.

Didonna A., Opal P. (2015). The promise and perils of HDAC inhibitors in neurodegeneration. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 2, 79–101.

Duvarci S., Pare D. (2014). Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron.* 82, 966-80.

Duvernoy H. M., Cattin F., Risold P.-Y. (2013). *The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections With MRI* (fourth ed.), Springer.

Eichenbaum H., Sauvage M., Fortin N., Komorowski R., Lipton P. (2012). Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe. *Neurosci Biobehav Rev.* 36, 1597-608.

F. Chersi, N. Burgess. (2015). The cognitive architecture of spatial navigation: hippocampal and striatal contributions *Neuron.* 88, pp. 64-77

Fanselow M. S., Dong H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron.* 65, 7–19.

Fischer A., Sananbenesi F., Wang X., Dobbin M., Tsai L. H. (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature.* 447, 178-82.

Fontán-Lozano A., Romero-Granados R., Troncoso J., Múnera A., Delgado-García J. M., Carrión A. M. (2008). Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Mol Cell Neurosci.* 39, 193-201.

Franklin T. B., Mansuy I. M. (2010). The prevalence of epigenetic mechanisms in the regulation of cognitive functions and behaviour. *Curr Opin Neurobiol.* 20, 441-9.

Franklin T. B., Saab B. J., Mansuy I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron.* 75, 747-61.

Goodman R. H., Smolik S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 14, 1553-77.

Govindarajan N., Rao P., Burkhardt S., Sananbenesi F., Schlüter O. M., Bradke F., Lu J., Fischer A. (2013). Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med.* 5, 52-63.

Gräff J., Kim D., Dobbin M. M., Tsai L. H. (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev.* 91, 603-49.

Groeneweg F., et al. (2011). Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J. Endocrinol.* 209, 153–167.

Groeneweg L., Karst H., De Kloet R., Joels M. (2012). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of non genomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol.* 350, 299–309.

Guan J., et al. (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature.* 459:55-60.

Guan Z., Giustetto M., Lomvardas S., Kim J. H., Miniaci M. C., Schwartz J. H., Thanos D., Kandel E. R. (2002) Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell.* 111, 483-93.

Hawk J. D., Florian C., Abel T. (2011). Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. *Learn Mem.* 18, 367-70.

Henry L. Roediger, & Kathleen B. McDermott. (2013). Two types of event memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 20856–20857.

Herman J. P., Cullinan W. E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20, 78–84.

Hermann B. P., Seidenberg M., Schoenfeld J., Davies K. (1997). Neuropsychological characteristics of the syndrome of mesial temporal lobe epilepsy *Arch. Neurol.* 54, 369-376.

Ito K, Ito M, Elliott WM, et al. (2005). Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 352(19):1967–76.

Jacobson L., Sapolsky R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev.* 12, 118–34.

Jarome T. J., Lubin F. D. (2014). Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem.* 115, 116-27.

Jeansok J. Kim & Kenneth S. Yoon (1998). Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 21, 505-09.

Joëls M., Pu Z., Wiegert O., Oitzl M. S., Krugers H. J. (2006). Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci.* 1, 152-8.

Kandel E., Pittenger C. (1999). The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354, 2027–2052.

Karst H., et al. (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 19204–19207.

Karst H., et al. (2010). Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 14449–14454.

Kesner R. P., Hopkins R. O. (2006). Mnemonic functions of the hippocampus: a comparison between animals and humans. *Biol Psychol.* 73, 3-18.

Kesner R. P., Taylor J. O., Hoge J. (2015). And Role of the dentate gyrus in mediating object-spatial configuration recognition *Neurobiol. Learn. Mem.* 118, 42-48.

Kier E. L., Kim J. H., Fulbright R. K., Bronen R. A. (1997). Embryology of the human fetal hippocampus: MR imaging, anatomy, and histology. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 18, 525-532.

Kim J., Diamond M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews. Neuroscience.* 3, 453–462.

Kim J., Lee J., Han S., Packard G. (2001). Amygdala is critical for stress induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.* 21, 5222–5228.

Kim M. S., Akhtar M. W., Adachi M., Mahgoub M., Bassel-Duby R., Kavalali E. T., Olson E. N., Monteggia L. M. (2012). An essential role for histone deacetylase 4 in synaptic plasticity and memory formation. *J Neurosci.* 32, 10879-86.

Korzus E., et al. (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron.* 42, 961–972.

Korzus E., Rosenfeld M. G., Mayford M. (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation *Neuron.* 42, 961-972.

Kuhlmann S., Piel M., Wolf T. (2005). Impaired memory retrieval after psychosocial stress in healthy young men. *J. Neurosci.* 25, 2977–2982.

Larry R. Squire & Adam J. O. Dede. (2015). *Conscious and Unconscious Memory Systems.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 7, a021667.

Lars Schwabe (2017). Memory under stress: from single systems to network changes. *European Journal of Neuroscience.* 45, 478–489.

Lattal K. M., Radulovic J., Lukowiak K. (2006). Extinction: [corrected] does it or doesn't it? The requirement of altered gene activity and new protein synthesis. *Biol Psychiatry.* 60, 344-51.

Leslie J. H., Nedivi E. (2011). Activity-regulated genes as mediators of neural circuit plasticity *ProgNeurobiol.* 94, 223-237.

Levenson M., et al. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *Journal of Biological Chemistry.* 279, 40545–40559.

Li Q., et al. (2003). MAP kinase phosphorylation-dependent activation of Elk-1 leads to activation of the co-activator p300. *EMBO J.* 22, 281–91.

Lisofsky N., Wiener J., de Condappa O., Gallinat J., Lindenberger U., Kuhn S. (2016). Differences in navigation performance and postpartal striatal volume associated with pregnancy in humans. *Neurobiol. Learn. Mem.* 134, 400-407.

Liu P., Bilkey D. K. (1999). The effect of excitotoxic lesions centered on the perirhinal cortex in two versions of the radial arm maze task *Behav. Neurosci.* 113, 672-682.

Liu P., Bilkey D. K. (2001). The effect of excitotoxic lesions centered on the hippocampus or perirhinal cortex in object recognition and spatial memory tasks *Behav. Neurosci.* 115, 94-111.

Machin P., Vann S. D., Muir J. L., Aggleton J. P. (2002). Neurotoxic lesions of the rat perirhinal cortex fail to disrupt the acquisition or performance of tests of allocentric spatial memory *Behav. Neurosci.* 116, 232-240.

Maguire E. A., Frackowiak R. S. J., Frith C. D. (1997). Recalling routes around London: activation of the right hippocampus in taxi drivers *J. Neurosci.* 17, 7103-7110.

Malecová B, Morris K. V. (2010). Transcriptional gene silencing through epigenetic changes mediated by non-coding RNAs. *Curr Opin Mol Ther.* 12, 214-22.

Marr D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 262, 23–81.

Martin R. C., Kretzmer T., Palmer C., Sawrie S., Knowlton R., Faught E., Morawetz R., Kuzniecky R. (2002). Risk to verbal memory following anterior temporal lobectomy in patients with severe left-sided hippocampal sclerosis *Arch. Neurol.* 59, 1895-1901.

McEwen B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev.* 87, 873-904.

McEwen B. S., Nasca C., Gray J. D. (2016). Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology.* 41, 3-23.

McHugh J., et al. (2007). Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science.* 317, 94–910.

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 a critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci.* 31, 764-74.

Miller J. F., Fried I., Suthana N., Jacobs J. (2015). Repeating spatial activations in human entorhinal cortex *Curr. Biol.* 25, 1080-1085.

Monsey M. S., Ota K. T., Akingbade I. F., Hong E. S., Schafe G. E. (2011). Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PLoS One.* 6, e19958.

Morris A. M., Churchwell J. C., Kesner R. P. (2012). Gilbert Selective lesions of the dentate gyrus produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations *Neurobiol. Learn. Mem.* 97, 326-331.

Morris M. J., Mahgoub M., Na E. S., Pranav H., Monteggia L. M. (2013). Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. *Neurosci.* 33, 6401-11.

Morris R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues *Learn. Motiv.* 12, 239-260.

Moscovitch M., Rosenbaum R. S., Gilboa A., Addis D. R., Westmacott R., Grady C., McAndrews M. P., Levine B., Black S., Winocur G., Nadel L. (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat.* 207, 35-66.

O'Donnell A., Yang S., Sharrocks D. (2008). MAP kinase-mediated c-fos regulation relies on a histone acetylation relay switch. *Mol Cell.* 29, 780–5.

O'Keefe J., Dostrovsky J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Priliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171-175.

O'Keefe J., Nadel L. (1978). *The Hippocampus As a Cognitive Map* Oxford University Press, London (UK).

Oitzl MS1, Reichardt HM, Joëls M, de Kloet ER. Point mutation in the mouse glucocorticoid receptor preventing DNA binding impairs spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 23;98(22):12790-5. Epub 2001 Oct 16.

Pacák K., Palkovits M. (2001). Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress- Related Disorders. *Endocr Rev.* 22, 502-54.

Park R., Zoladz R., Conrad D., Fleshner M., Diamond M. (2008). Acute predator stress impairs the consolidation and retrieval of hippocampus dependent memory in male and female rats. *Learning & Memory.* 15, 271–280.

Patterson K., Nestor P. J. & Rogers T. T. (2007). Where do you know what you know? The representation of semantic knowledge in the human brain. *Nature Rev. Neurosci.* 8, 976–987.

Penney J., Tsai L. H. (2014). Histone deacetylases in memory and cognition. *Sci Signal.* 7, 355.

Pentkowski N. S., Blanchard D. C., Lever C., Litvin Y., Blanchard R. J. (2006). Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur J Neurosci.* 23, 2185–96.

Peserico A., Simone C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol.* 2011, 371832.

Pigott S., Milner B. (1993). Memory for different aspects of complex visual scenes after unilateral temporal- or frontal- lobe resection *Neuropsychologia.* 31, 1-15.

Ramos J. M. (2013). Differential contribution of hippocampus, perirhinal cortex and postrhinal cortex to allocentric spatial memory in the radial maze *Behav. Brain Res.* 247, 59-64.

Rei D., et al. (2015). Basolateral amygdala bidirectionally modulates stress-induced hippocampal learning and memory deficits through a p25/Cdk5-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 112, 15845.

Reul M., de Kloet R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 117, 2505–2511.

Roosendaal B. (2003). Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry.* 27, 1213-23.

Roosendaal B., et al. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 423–433.

Roosendaal B., et al. (2010). Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J. Neurosci.* 30, 5037–5046.

Rumbaugh G., et al. (2015). Pharmacological selectivity within class I histone deacetylases predicts effects on synaptic function and memory rescue. *Neuropsychopharmacology.* 40, 2307–2316.

Saha R. N., Pahan K. (2006). HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ.* 13, 539-50.

Sandi C., et al. (2005). Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biological Psychiatry.* 57, 856–864.

Sandi C., Pinelo-Nava M. T. (2007). Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast.* 2007, 78970.

Sapolsky R. M., Krey L. C., McEwen B. S. (1984). Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci.* 81, 6174–7.

Sardari M., Rezaeifard A., Khodagholi F. (2015). Hippocampal signaling pathways are involved in stress-induced impairment of memory formation in rats. *Brain Research.* 1625, 54–63.

Sargolini F., Florian C., Oliverio A., Mele A., Roullet P. (2003). Differential involvement of NMDA and AMPA receptors within the nucleus accumbens in consolidation of information necessary for place navigation and guidance strategy of mice *Learn. Mem.* 10, 285-292.

Scoville W. B. & Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.

Selye H. (1936). Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature.* 138, 32.

Sharon T., Moscovitch M., Gilboa A. (2011). Rapid neocortical acquisition of long-term arbitrary associations independent of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 1146-51.

Shirazi S. N., Friedman A. R., Kaufer D., Sakhal S. A. (2015). Glucocorticoids and the Brain: Neural Mechanisms Regulating the Stress Response. *Adv Exp Med Biol.* 872, 235-52.

Smith M. L., Bigel M., Miller L. A. (2011). Visual paired-associate learning: in search of material-specific effects in adult patients who have undergone temporal lobectomy *Epilepsy Behav.* 20, 326-330.

Smith S. M., Vale W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci.* 8, 383-95.

Spiers H. J., Burgess N., Maguire E. A., Baxendale S. A., Hartley T., Thompson P. J., O'Keefe J. (2001). Unilateral temporal lobectomy patients show lateralized topographical and episodic memory deficits in a virtual town *Brain.* 124, 2476-2489.

Stefanko D. P., Barrett R. M., Ly A. R., Reolon G. K., Wood M. A. (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 9447-9452.

Steinvorth S., Levine B. & Corkin S. (2005). Medial temporal lobe structures are needed to re-experience remote autobiographical memories: evidence from H. M. and W. R. *Neuropsychologia.* 43, 479–496.

Suthana N., Haneef Z., Stern J., Mukamel R., Behnke E., Knowlton B., Fried I. (2012). Memory enhancement and deep-brain stimulation of the entorhinal area *N. Engl. J. Med.* 366, 502-510.

Sweatt D. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 14, 1–710.

Taube J. S. (1998). Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction *Prog. Neurobiol.* 55, 225-256.

Thiel G., et al. (2010). Egr-1-A Ca²⁺-regulated transcription factor. *Cell Calcium.* 47, 397–403.

Timmann D., Drepper J., Frings M., Maschke M., Richter S., Gerwig M., Kolb F. P. (2010). The human cerebellum contributes to motor, emotional and cognitive associative learning. A review. *Cortex.* 7, 845-57.

Tran L., et al. (2013). Importance of epigenetic mechanisms in visceral pain induced by chronic water avoidance stress. *Psychoneuro endocrinology.* 38, 898–906.

Tran L., et al. (2014). Epigenetic modulation of chronic anxiety and pain by histone deacetylation. *Mol Psychiatry.* 20, 1219-31.

Tulving E. (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annu. Rev. Psychol.* 53, 1–25.

Tulving, E. (1972). in *Organisation and Memory* (eds Tulving, E. & Donaldson, W.) 382–403 (Academic, New York).

Ullman M. T. (2004). Contributions of memory circuits to language: the declarative/procedural model. *Cognition.* 1-2, 231-70.

Vanelzakker B., et al. (2011). Influence of pre-training predator stress on the expression of c-fos mRNA in the hippocampus, amygdala, and striatum following long-term spatial memory retrieval. *Front Behav Neurosci.* 24:30.

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., et al. (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation *J Neurosci.* 27, 6128-6140.

Villain H., Florian C., Rouillet P. (2016). HDAC inhibition promotes both initial consolidation and reconsolidation of spatial memory in mice. *Sci Rep.* 6, 27015.

Waddington C. H. (1953). The epigenetics of birds. *Science.* 117, 427—8.

Williams L., Clayton C. (2001). Contribution of brainstem structures in modulating memory storage processes. *American Psychological Association.* 141–163.

Wixted J. T., Squire L. R. (2011). The medial temporal lobe and the attributes of memory. *Trends Cogn Sci.* 5, 210-7.

Woolley D. G., Laeremans A., Gantois I., Mantini D., Vermaercke B., Op de Beeck H. P., Swinnen S. P., Wenderoth N., Arckens L., D’Hooge R. (2013). Homologous involvement of striatum and prefrontal cortex in rodent and human water maze learning *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3131-3136.

Woolley D. G., Mantini D., Coxon J. P., D’Hooge R., Swinnen S. P., Wenderoth N. (2015). Virtual water maze learning in human increases functional connectivity between posterior hippocampus and dorsal caudate *Hum. Brain Mapp.* 36, 1265-1277.

Yeh S. H., Lin C. H., Gean P. W. (2004). Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory *Mol Pharmacol.* 65, 1286-1292.

Yifat Glikmann-Johnston, Kyle D. F., Peter D., Audrey T., Julie C. Stouta. (2019). Spatial memory in Huntington’s disease: A comparative review of human and animal data. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 98, 194-207.

Zeidman P., Mullally S. L., Schwarzkopf D. S., Maguire E. A. (2012). Exploring the parahippocampal cortex response to high and low spatial frequency spaces *Neuroreport.* 23, 503-507.

Zoladz R., et al. (2012). Differential expression of molecular markers of synaptic plasticity in the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala in response to spatial learning, predator exposure, and stress-induced amnesia. *Hippocampus*. 22, 577–589.