



João António Lima de Andrade Conde Brazão

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Mecanismos Epigenéticos na Formação de Memória e Capacidades Cognitivas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, do Dr. João Pimentel e do Professor Doutor João Laranjinha apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem da capa adaptada de:

http://www.wallpaperup.com/615230/brain_anatomy_medical_head_skull_digital_3-d_x-ray_xray_psychedelic.html

<http://www.wbur.org/news/2014/06/12/brain-images>

João António Lima de Andrade Conde Brazão

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Mecanismos Epigenéticos na Formação de Memória e Capacidades Cognitivas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, do Dr. João Pimentel e do Professor Doutor João Laranjinha apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, João António Lima de Andrade Conde Brazão, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 201170338, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Mecanismos Epigenéticos na Formação de Memória e Capacidades Cognitivas” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de setembro de 2017.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'João Conde', is written below the date. The signature is stylized and cursive.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e ao meu irmão, por toda a constante confiança em mim depositada, mesmo em alturas em que a minha própria, apesar de nunca o admitir nem transmitir, se encontrava abalada.

Aos meus tios e primos, por me receberem na sua casa desde o primeiro dia em Coimbra, por toda a companhia e apoio incondicional que me proporcionou uma vida de estudante muito superior à que sonhava e, talvez, merecia.

Às minhas avós, por todas as velinhas acendidas no Funchal, em Torre de Moncorvo e em Fátima.

À minha restante família pela boa disposição e carinho que sempre me transmitem.

Aos meus amigos, por existirem e estarem presentes. Sem eles, este percurso não teria razão de ser.

À Imperial TAFFUC, por tudo o que me ensinou, por tudo o que me fez viver e por todos os que me fez conhecer. Por ser uma casa onde, aconteça o que acontecer, poderei sempre voltar e encontrar uma família de braços abertos para receber-me.

À equipa da Farmácia Adriana, a D. Adélia, a Dr^a. Ângela, a Dr^a Joana, ao Dr. João e ao meu colega estagiário Nelso por fazerem do meu estágio um período importante e feliz na minha vida que certamente guardarei na memória.

Aos meus professores, por os ter sempre como meus aliados, por toda a flexibilidade e compreensão nas mais variadas situações, sempre com o sucesso dos alunos em mente.

Por fim, à cidade dos estudantes, da Universidade, das capas negras e do Mondego, da cabra e das tricanas, das lágrimas nas pestanas, da amizade em todas as situações, das cinzas das nossas ilusões, da saudade. A Coimbra.

"A memória, afinal, é a sensação do passado... E toda a sensação é uma ilusão."
Fernando Pessoa

ÍNDICE

Relatório de Farmácia Comunitária	3
Introdução	4
Análise SWOT.....	5
Pontos Fortes	6
Equipa.....	6
Localização.....	6
Pequena dimensão da farmácia.....	7
Horário alargado	7
Duração do estágio.....	7
Receitas eletrónicas	8
Pontos Fracos.....	8
Localização.....	8
Manipulados	9
Receitas Manuais.....	9
Lacunas no conhecimento em determinadas áreas	10
Oportunidades	10
Desenvolvimento de diversas capacidades.....	10
Serviços prestados a instituições	11
Acompanhamento farmacoterapêutico.....	11
Ameaças.....	11
Panorama socioeconómico do país.....	11
Estabelecimento de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica.....	11
Falta de conhecimentos por parte da população	12
Qualidade de vida do farmacêutico.....	12
Considerações finais.....	13
Bibliografia	14

Mecanismos epigenéticos na formação de memória e capacidades cognitivas	15
Abreviaturas.....	16
Resumo	18
Abstract	18
Epigenética.....	19
Memória.....	21
Memória celular	21
Memória cognitiva e de comportamento.....	22
Sinalização neuronal	23
MAPK	24
BDNF.....	25
Acetilação das histonas.....	26
Outras modificações das histonas.....	29
Códigos das histonas	30
Metilação do DNA	31
MeCP2.....	33
Considerações, limitações e potencialidades	34
Conclusão: código geral	36
Bibliografia	39
Anexo	42

RELATÓRIO DE FARMÁCIA COMUNITÁRIA



INTRODUÇÃO

O atual plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, contempla a realização de um Estágio Curricular. O estágio tem como objetivo a interligação dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso com a prática profissional, neste caso, em Farmácia Comunitária. É proporcionando ao aluno um ambiente propício à consolidação das suas competências técnicas, científicas e humanas, por forma a poder preparar-se para o seu futuro exercício profissional. O Farmacêutico é um agente de saúde pública e o profissional não só do medicamento mas também das pessoas. O foco na proximidade ao utente, na abordagem cuidada e de elevada qualidade às variadas situações, com um posicionamento na promoção e prevenção da saúde pública em cooperação com os restantes profissionais de saúde são valores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e, neste momento, meus também.

O meu estágio em farmácia comunitária foi realizado na Farmácia Adriana, situada na Praça da Republica em Coimbra, sob a orientação do Dr. João Pimentel durante um período compreendido entre janeiro e julho. O presente relatório encontra-se redigido sob a forma de uma análise SWOT em que são abordados, de forma crítica, os pontos fortes (*Strengths*), pontos fracos (*Weaknesses*), oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) relativos ao meu estágio em Farmácia Comunitária.

Tabela 1. *Análise SWOT*

	PONTOS FORTES	PONTOS FRACOS
DIMENSÃO INTERNA	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Equipa ◆ Localização ◆ Pequena dimensão da farmácia ◆ Horário alargado ◆ Duração do estágio ◆ Receitas eletrónicas 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Localização ◆ Manipulados ◆ Receitas manuais ◆ Lacunas no conhecimento em determinadas áreas
DIMENSÃO EXTERNA	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Desenvolvimento de diversas capacidades ◆ Serviços prestados a instituições ◆ Acompanhamento farmacoterapêutico 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Panorama socio-económico do país ◆ Estabelecimentos de venda de MNSRM ◆ Falta de conhecimentos por parte da população ◆ Aumento da propagação de informação ◆ Qualidade de vida do farmacêutico
	OPORTUNIDADES	AMEAÇAS

ANÁLISE SWOT

Pontos Fortes

◆ *Equipa*

A equipa é para mim o ponto fulcral do sucesso de qualquer trabalhador em qualquer área de trabalho coletivo. As pessoas com quem lidamos diariamente e o seu modo de funcionamento conjunto é determinante em todos os momentos. Como estagiário, senti-me rapidamente incluído num grupo de trabalho coeso, bem organizado e com uma relação interpessoal admirável, com uma capacidade de resolução de problemas e divergências notável. A equipa da Farmácia Adriana apresentou uma constante boa disposição e vontade de trabalhar contagiantes, foram um apoio incondicional no meu percurso e uma enorme influência na moldagem da minha condição de futuro farmacêutico. Destaco uma característica comum a todos os membros em relação ao apoio nas minhas funções como estagiário. Demonstravam um enorme cuidado aquando da correção de falhas minhas por forma a nunca descredibilizarem a minha posição perante os utentes ou profissionais presentes na farmácia o que me dava uma margem de correção grande sem prejuízo de um abate na confiança. Acredito que aprendi muito com esta equipa a vários níveis. Desde cedo que deixei de me sentir um estagiário externo à equipa mas sim um elemento integrante da mesma em todos os sentidos, com uma opinião tida em consideração e com um tratamento indiscriminado. Aprendi muito não só ao nível das funções de entrada de encomendas, devoluções, acerto de stocks, conferição de validades e atendimento mas também ao nível de toda a gestão da farmácia, desde compra de materiais, reuniões e negócios com representantes de variados laboratórios, ponderação e organização interna. No final, acredito que a equipa da Farmácia Adriana me proporcionou um estágio bem sucedido ao longo de meses marcados positivamente por uma grande experiência.

◆ *Localização*

A Farmácia Adriana localiza-se na Praça da República de Coimbra. Esta localização é interessante em vários pontos. Trata-se de uma zona agradável, muito movimentada e com um ambiente muito positivo, o que influencia o próprio comportamento e simpatia dos utentes. Existe também uma boa relação de proximidade e cordialidade entre os trabalhadores dos variados estabelecimentos da área o que contribui para o caloroso e lisonjeiro ambiente da Praça da República. Creio que a localização da farmácia teve um enorme impacto no meu bem-estar pessoal diário e, conseqüentemente, na produtividade e qualidade das funções por mim desempenhadas.

Devido à sua posição privilegiada no centro da cidade, assim como a proximidade à Universidade, a Farmácia Adriana conta com um leque de utentes imensamente diversificado, desde estudantes nacionais e internacionais, a idosos que passam

religiosamente pela praça nos seus tradicionais passeios matinais, até turistas alojados nas redondezas ou simplesmente de passagem pela cidade. Esta diversidade de utentes resulta numa diversidade de atendimentos, sem dúvida um ponto forte da minha experiência de estágio.

◆ ***Pequena dimensão da farmácia***

A pequena dimensão da Farmácia Adriana conferiu consideráveis vantagens ao meu período de estágio. Comportando uma equipa pequena, a proximidade entre todos os envolvidos proporcionada pela farmácia resultou na minha rápida ambientação e inserção na equipa. O conhecimento geral de todo o funcionamento da farmácia por todos os membros da equipa facilitou a dissipação rápida de dúvidas que foram surgindo quer em atendimentos quer em funções de *back office*. A atenção e disponibilidade constantes prestadas aos estagiários é também produto desta pequena dimensão. O facto da Farmácia Adriana ter mais de 100 anos também se verifica num considerável número de utentes fidelizados que, aliado ao baixo número de atendimentos diários, resulta em condições propícias para um acompanhamento farmacoterapêutico cuidado e regular ao longo de extensos períodos de tempo.

◆ ***Horário alargado***

O horário alargado da Farmácia Adriana, que encerra às 20:30h durante a semana e às 20h no sábado aumenta não só o número mas também a variabilidade de atendimentos. Destaco principalmente o sábado, que leva muitas vezes a um aumento de atendimentos envolvendo crianças, por exemplo, pela disponibilidade que os pais dispõem ao fim-de-semana para ir com os filhos à farmácia durante o dia, panorama normalmente impossibilitado durante a semana devido aos horários laborais e escolares, respetivamente.

◆ ***Duração do estágio***

Considero que o meu período de estágio, entre janeiro e julho, não sendo uma mais valia na variedade da experiência de estágio devido à sua exclusividade, foi uma mais valia em termos de experiência comunitária. Permitiu um maior entrosamento com a equipa, conhecimento de situações de utentes regulares, número e qualidade de atendimentos e adaptação rotineira em termos de horários e funções. Acredito que o tempo foi suficiente para conseguir adquirir conhecimentos e experiência para entrar no mercado de trabalho com motivação e confiança.

◆ *Receitas eletrónicas*

As chegadas das receitas eletrónicas veio trazer vantagens tanto para os utentes como para os farmacêuticos. A rapidez e segurança na descodificação das receitas e a quantidade de informação nelas contida facilita em muito a ação do farmacêutico. Para o utente, para além de uma maior garantia de qualidade do serviço farmacêutico do qual é o principal beneficiário, as receitas eletrónicas permitem uma gestão da aquisição dos medicamentos pela possibilidade de múltiplas utilizações da mesma receita em espaços temporais distintos, desde que dentro dos limites de validade das prescrições. A possibilidade de aceder a estas receitas através do telemóvel ou do cartão de cidadão também facilita muito a organização dos utentes que por vezes, principalmente idosos, perdem ou confundem as receitas manuais aumentando a probabilidade de erros no momento da dispensa e retirando grande parte do tempo de atendimento por parte do farmacêutico, tempo esse que poderia ser aproveitado no acompanhamento da situação de saúde do utente.

Pontos Fracos

◆ *Localização*

Apesar dos referidos pontos positivos da localização da farmácia, esta apresenta uma enorme desvantagem. A Praça da República é, de facto, muito frequentada por turistas e estudantes tanto do país como internacionais. No entanto, a necessidade de aquisição de medicamentos, nomeadamente medicamentos sujeitos a receita médica, tende a aumentar com o avançar da idade da população, o que faz dos jovens um grupo de baixa expressão percentual neste domínio. O grande público alvo de uma farmácia são os idosos, assim como, em casos de dificuldade / impossibilidade de deslocação por parte dos mesmos, os parentes ou relativos que se encarregam da compra dos seus medicamentos. Acontece que o comércio na zona da Praça insere-se maioritariamente na área da restauração e bebidas. Dada a proximidade à Universidade, uma grande porção das áreas residenciais encontra-se ocupada por estudantes. Devido a estas razões, os restaurantes, bares e cafés são frequentados principalmente por estudantes, mas também por cidadãos de variadas idades com postos de trabalho e residência nas cercanias. Ainda assim, o problema mantém-se uma vez que estes cidadãos não são, em número, significativos no universo de utentes de uma farmácia em Coimbra tendo em conta a densidade populacional da cidade. Mas são significativos em termos de ocupação de lugares de estacionamento na área, o que leva a outro problema da localização da farmácia, a dificuldade do estacionamento por parte dos utentes. Estas características fazem da Praça da República um local, apesar de muito movimentado, pouco frequentado não só por idosos mas também por adultos com mais de 30 anos que, tendo residências e postos de trabalho fora, encontram poucas razões para se deslocarem até esta área. Os correios, situados na mesma rua da farmácia, contribuem para a presença de indivíduos que se inserem neste

conjunto crítico de idades. No entanto, os serviços ali prestados não possuem um carácter rotineiro no quotidiano da maioria das pessoas, cuja principal razão para a sua presença na Praça acaba por ser simplesmente por passagem quando a caminho da baixa da cidade, que possui um maior número e variedade de estabelecimentos de comércio e serviços, incluindo farmácias. Tudo isto aliado à existência de uma outra farmácia a menos de 60 metros de distância faz da Praça da República um local longe de ser ideal, refletindo-se num baixo fluxo de utentes e, conseqüentemente, num diminuído número de atendimentos diários efetuados pela equipa da farmácia, estagiários incluídos.

◆ *Manipulados*

A preparação de medicamentos manipulados, “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial, preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico” segundo as Boas Práticas de Preparação de Medicamentos Manipulados presentes no anexo da Portaria n.º 594/2004(1), tem a resposta a terapêuticas personalizadas em situações em que o mercado não tem a capacidade de assistir nas necessidades específicas de um doente como objetivo. Mas o crescente desenvolvimento industrial tem vindo a retirar relevância a este tipo de formulações, pouco prescritas pelos médicos hoje em dia em comparação com o que se sucedia no passado. Vejo-o como um ponto negativo principalmente da perspectiva do farmacêutico que vê reduzido um dos seus ofícios, clássico por definição. Dada a escassa procura de preparados oficinais por parte dos utentes, muitas vezes, e principalmente em farmácias com um reduzido fluxo de utentes, a compra de matérias primas não se justifica devido às quantidades mínimas impostas na sua venda pelos armazenistas e ao seu prazo de validade relativamente limitado resultando num negócio pouco proveitoso para as farmácias que, como no caso da Farmácia Adriana, mesmo possuindo todas as condições necessárias e exigidas para a sua preparação, acabam por renunciar à manipulação.

◆ *Receitas manuais*

Curiosamente, a diferença na proporção de receitas manuais entre os dois primeiros e os restantes meses do meu estágio foi astronómica, e, da mesma forma, a diferença ao nível dos problemas da farmácia em torno das receitas também o foi. Esta diferença deve-se às já referidas e proeminentes desvantagens das receitas manuais quando comparadas com as eletrónicas. Apesar do número ter diminuído muito, continuaram a aparecer algumas receitas desta qualidade com alguma frequência. A única vantagem que destaco nas receitas manuais é a sua utilidade e plena funcionalidade em eventuais falhas informáticas, motivadas por problemas do software / hardware de computadores ou da corrente elétrica, quer no momento da prescrição no consultório do médico, quer no momento da dispensa na farmácia. No entanto, esta vantagem não se sobrepõe perante todas as desvantagens mencionadas e que resultam num aumento de trabalho e responsabilidades para o farmacêutico, que poderiam ser

canalizados para funções de maior importância e relevância, e num considerável incremento da probabilidade de ocorrência de erros grosseiros, com principal prejuízo para o utente, consequências desnecessárias e evitáveis nos tempos que correm.

◆ *Lacunas no conhecimento em determinadas áreas*

Houve atendimentos em que me senti mais "desamparado" em termos de conhecimentos. Estes atendimentos envolviam algumas áreas que creio que não são suficientemente abordadas no plano de estudos do MICEF, e afirmo-o tendo como base de ponderação aquela que considero como sendo uma alta fasquia na abordagem às restantes vertentes por parte do mesmo plano de estudos. Atendimentos no âmbito da puericultura foram complicados, por exemplo, em relação produtos relacionados com a amamentação. Nesta área em particular, as lacunas acabaram por ser parcialmente colmatadas com uma formação da Medela a que assisti. A área da veterinária também foi complicada ao início. Mas os casos eram relativamente limitados e semelhantes entre si. A grande maioria dos utentes procurava resolver problemas de pulgas e carraças em cães e gatos pelo que depressa aprendi a lidar com a situação. No entanto, a área dos suplementos foi a que se revelou mais desafiante e na qual me senti mais impotente no apoio ao utente. Com uma procura muito superior ao que esperava, os suplementos eram pretendidos por utentes de todas as idades, dos quais destaco os suplementos para auxílio na memória e concentração, muito solicitados por estudantes, principalmente em épocas de exames; os suplementos multivitamínicos procurados por adultos de meia-idade e os suplementos direcionados para articulações e ossos, por parte dos idosos. Estes casos eram muito variados e apareciam diariamente. E mesmo tendo participado em inúmeros atendimentos com suplementos em causa, continuo a sentir-me limitado nesta área.

Oportunidades

◆ *Desenvolvimento de diversas capacidades*

A oportunidade de contacto com um grande número de utentes, com origens diferentes e com situações clínicas e pessoais também distintas e com modos de comunicação variados permitiu-me desenvolver capacidades de adaptação, interpretação e comunicação úteis tanto para a minha vida profissional como para a minha vida pessoal. A própria desenvoltura e entrega a uma rotina de trabalho inserida num meio prático de algo altamente teorizado ao longo de todos os anos de formação no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas deu, inevitavelmente, frutos de diversas qualidades e feitos que levarei certamente comigo na minha vida futura, independentemente da natureza dos ofícios que venha a abraçar.

◆ *Serviços prestados a instituições*

A Farmácia Adriana providencia protocolos com instituições de Coimbra com índoles distintas, o que, para um estagiário, se torna como uma montra de diversos ramos na área, algo incomum tendo em conta o panorama geral, sendo, a meu ver, uma oportunidade de diversificação de tarefas e ampliação de conhecimentos. A Farmácia Adriana é responsável pelo fornecimento de medicamentos a estas instituições, efetuando a deslocação até as mesmas em alguns casos. A organização de toda a medicação fornecida é também realizada dentro do perímetro da farmácia. Tive a oportunidade de realizar as tarefas referidas e participar na ponderação e organização dos protocolos em questão onde faz o necessários e, em alguns casos, prepara também a medicação semanal destes utentes, funções que enriqueceram profundamente a minha experiência de estágio.

◆ *Acompanhamento farmacoterapêutico*

Como referido, a pequena dimensão da farmácia, com um reduzido número de atendimentos diários e um estatuto centenário com qualidade que origina uma considerável quantidade de utentes fidelizados com idade avançada possibilita um atendimento alargado, calmo, atencioso e ponderado por parte dos farmacêuticos. As condições para o acompanhamento farmacoterapêutico realizado na Farmácia Adriana acabam por ser excecionalmente propícias para o efeito, existindo vários utentes a usufruir do serviço com uma regularidade semanal. A assídua presença destes utentes fidelizados na farmácia, com perfis farmacoterapêuticos heterogêneos, representa uma marcada mais valia no estágio, uma grande oportunidade para a expansão e consolidação de conhecimentos e utilização dos mesmos.

Ameaças

◆ *Panorama socioeconómico do país*

A situação financeira dos Portugueses afeta em larga escala o seu poder de compra. Numa farmácia, esta situação verifica-se não só na fraca aquisição de produtos extra-saúde, como de estética por exemplo, mas também em medicamentos. Há utentes que optam por não levar todos os medicamentos prescritos pelo médico por falta de dinheiro, sujeitando-se ao não tratamento de sintomas nocivos no seu bem estar diário, o que representa uma ameaça não só para a saúde dos utentes mas também para a faturação e sobrevivência das farmácias.

◆ *Estabelecimentos de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica*

A venda de medicamentos não sujeitos a receita médica fora das farmácias resulta em variadas ameaças. A liberalização da venda destes medicamentos confere-lhes um estatuto de

bem de consumo na mente do utente, que os aborda de forma leviana. A falta de qualificação e conhecimento por parte dos profissionais que dispensam estes medicamentos representa um perigo de saúde pública, facilitando a ocorrência de utilizações indevidas com possibilidade de consequências graves que poderiam ser evitadas com uma supervisão e aconselhamento cuidado, fundamentado e seguro por parte de um farmacêutico.

Por outro lado, devido à dimensão e poder de compra destes estabelecimentos, os preços por si praticados representam uma pronunciada ameaça na faturação das farmácias por serem significativamente menores.

◆ *Falta de conhecimentos por parte da população*

O nível de atitude, comportamento e simpatia dos utentes que passaram pela Farmácia Adriana durante o meu estágio foi muito superior às minhas expectativas. O ponto que passo a descrever é fruto de marcadas exceções na minha experiência de estágio mas que acredito ser um reflexo de uma realidade maior ao longo de todo o país. Os conhecimentos em falta a que me refiro situam-se em vários conceitos, como por exemplo, medicamentos genéricos. Outra questão que atormenta muitos dos utentes é a interpretação da informação presente nas receitas, nomeadamente, "este medicamento custa-lhe no máximo X € a não ser que opte por um medicamento mais caro"(2) recentemente alterada para "no mínimo" devido, suponho, à confusão compreensivelmente causada pela frase original. Esta informação, que possui uma forte ligação aos medicamentos genéricos, principais implicados na maioria dos casos, e a incompreensão do seu conjunto por parte dos utentes causam variados confrontos com os farmacêuticos. Muitas vezes os utentes não conseguem conceber que o preço do medicamento cedido não vá de encontro ao preço descrito na receita mesmo quando exigem exclusivamente medicamentos de marca. Este é apenas um exemplo de uma situação entre inúmeras com os mesmos intervenientes, tanto os indivíduos como os objetos de dúvida e contestação. Isto causa diversos problemas, principalmente ao nível da relação entre os utentes e os farmacêuticos, problemas esses nocivos para ambas as partes. Infelizmente, quando o assunto envolve dinheiro, o farmacêutico deixa de ser visto como o profissional de saúde que era no início do atendimento e passa a ser visto como o negociante interessado em angariar a maior maquia possível, o que se traduz numa quebra de confiança no farmacêutico, afetando a sua privilegiada posição de informador e educador na área perante o utente.

◆ *Qualidade de vida do farmacêutico*

Ressalvo que a Farmácia Adriana não se configura no que passo a descrever, não deixando por isso de ser algo que vejo como sendo descritivo do panorama nacional.

Considero a atual condição dos farmacêuticos comunitários, provocada pela atual condcondição das farmácias comunitárias, uma forte ameaça à profissão. Com um elevado número de insolvências de farmácias nos últimos anos em Portugal, torna-se clara a

dificuldade pelas quais estas passam nos dias que correm. A necessidade de um aumento de faturação por parte das farmácias por forma a subsistirem resulta em diversas dificuldades e inconvenientes na vida dos farmacêuticos. A necessidade do alargamento de horários de funcionamento faz do farmacêutico comunitário uma profissão com horários com pouca estabilidade e em constante alteração, fora do horário laboral comum a grande parte dos ofícios e com inclusão de fins de semana, o que afeta enormemente a sua vida pessoal e familiar. A necessidade de um aumento da faturação acaba muitas vezes por tornar-se numa obsessão para o proprietário de uma farmácia, o que se traduz numa enorme pressão imposta na ação do farmacêutico e na própria relação entre os elementos da equipa criando um ambiente nocivo para o bem-estar de todos os envolvidos no funcionamento da farmácia. E, uma vez que o problema tem uma motivação monetária, a remuneração do farmacêutico acaba por sofrer inevitavelmente. A falta de estímulos em qualquer ação por parte de um qualquer profissional é sempre uma ameaça para seu bem-estar mental e, conseqüentemente, para a qualidade do seu trabalho.

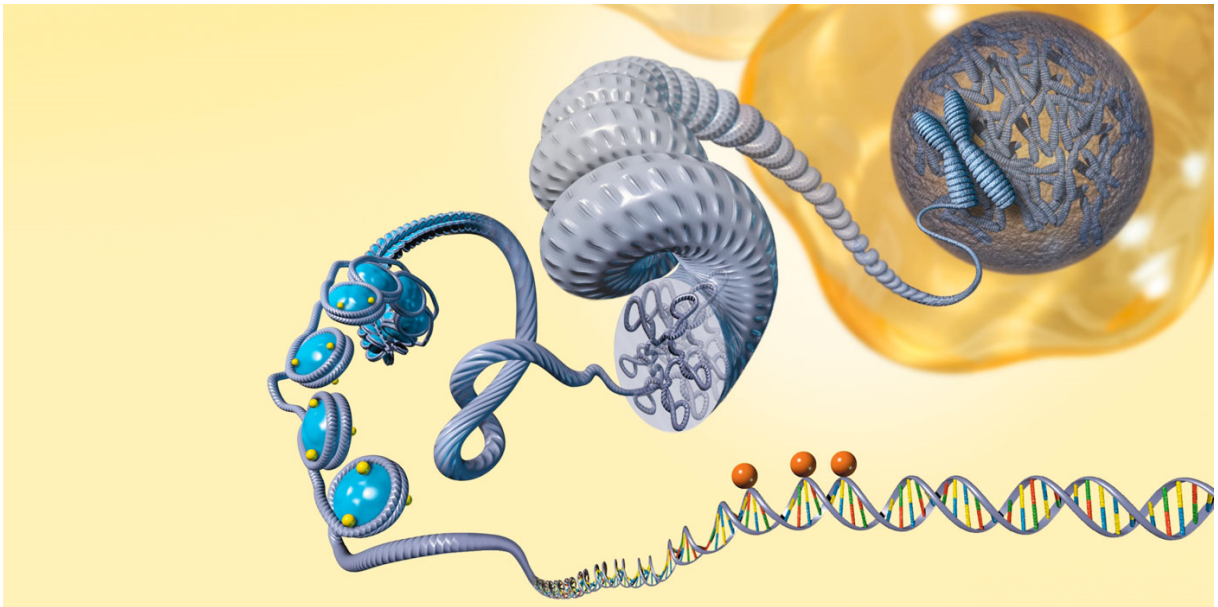
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acredito que toda a informação descrita ao longo da minha análise reflete bem aqueles que foram cerca de 6 meses da minha vida de estudante da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Revelou ser uma experiência rica em todos os sentidos, e devo-o a toda a equipa da Farmácia Adriana. Não tenho, no entanto, dúvidas de que toda a formação por mim recebida antes do começo do estágio tenha representado um papel crítico na minha adaptação e desempenho enquanto farmacêutico estagiário na Farmácia Adriana, não só ao nível científico mas também, e creio que principalmente, ao nível de mentalidade e comportamento. Resta-me esperar que tenha conseguido representar a Universidade de Coimbra, a Faculdade de Farmácia, e o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas em particular, a um nível pelo menos equivalente ao que estes representaram, representam e acredito que continuarão a representar para mim.

BIBLIOGRAFIA

1. Ministério da Saúde . Portaria n.o 594/2004 de 2 de Junho. (2004);3441–5.
2. Normas relativas à Prescrição de Medicamentos e Produtos de Saúde. (2016)
[Http://iasaude.sras.gov-madeira.pt/Documentos/WEB/Anexos/Normas_Prescricao_IASAUDE_V_2.pdf](http://iasaude.sras.gov-madeira.pt/Documentos/WEB/Anexos/Normas_Prescricao_IASAUDE_V_2.pdf).

MECANISMOS EPIGENÉTICOS NA FORMAÇÃO DE MEMÓRIA E CAPACIDADES COGNITIVAS



ABREVIATURAS

BDNF - Fator neutrófico derivado do cérebro

cAMP - Monofosfato cíclico de adenosina

CBP - Proteína de ligação ao elemento de ligação a monofosfato cíclico de adenosina

ChIP-Seq - Sequenciação por imunoprecipitação da cromatina

CpG - Nucleótidos de citosina seguidos de nucleótidos de guanina

CREB - Elemento de ligação a monofosfato cíclico de adenosina

DOT1P - Proteína disruptora do silenciamento telomérico 1

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNMT - Metiltransferase de DNA

ERK - Cinase regulada por sinal extracelular

ETS1 - O fator de transcrição eritroblastose 1

HAT - Acetiltransferase das histonas

HDAC - Desacetilase das histonas

HDACis - Inibidores das desacetilases das histonas

HDM - Desmetilase das histonas

HFS - Estimulação de alta frequência

HTM - Metiltransferase das histonas

JNK - Cinase N-terminal c-Jun

KID - Domínio de Ser 133 induzível por cinases

LTD - Depressão de longo prazo

LTF - Facilitação de longo prazo

LTP - Potenciação de longo prazo

MAPK - Proteína cinase ativada por mitogénios

MBD - Proteínas com domínio de ligação a metil-CpG

MeCP2 - Proteína 2 de ligação a metil-CpG

MSK-1 - Proteína cinase 1 activada por stress e mitogénios

NaB - Butirato de sódio

NAD - dinucleótido de nicotinamida e adenina

NMDA - Recetor ácido N-metil-D-aspartato
p75NTR - Recetor de neurotrofina p75
piRNA - Ácido ribonucleico associado a Piwi
PP1 - Proteína fosfatase 1
PRMT - Metiltransferase da proteínas argininas
PTM - Modificações pós-tradução
RNA - Ácido ribonucleico
RTS - Síndrome de Rubinstein-Taybi
SAHA - Ácido hidroxâmico suberoilánilida
SAM - Cofactor enzimático S-adenosilmetionina
Ser - Serina
SIRT1 - Sirtuína-1 dependente de NAD
SNC / CNS - Sistema nervoso central
TF - Factor de transcrição
TSA - Tricostatina A

RESUMO

A habilidade do organismo humano em adaptar o seu comportamento em resposta a estímulos ambientais ao longo do tempo, fundamenta-se na plasticidade estrutural e funcional do SNC. É atualmente conhecido que os processos em torno da memória celular (diferenciação), e da memória neurológica têm similaridades, não só ao nível da sua génese como também da sua regulação, orquestrada por mecanismos epigenéticos. Marcas epigenéticas como a metilação do DNA e modificações pós-tradução das histonas têm vindo a comprovar-se cada vez mais como imprescindíveis reguladores dos processos de memória. As suas funções de regulação dinâmica da transcrição de genes em resposta à ativação neuronal mostram-se relevantes e influentes no processo de formação de memória. A natureza persistente, mesmo após divisão celular, de mecanismos como a metilação do DNA sugere também a existência de um papel da epigenética na manutenção da memória previamente formada. O conteúdo da presente monografia tem como foco a ligação entre determinados processos envolvidos na formação e manutenção de memória e capacidades cognitivas, compreendendo vias de sinalização comuns a ambos os tipos de memória referidos, e os mecanismos epigenéticos implicados na regulação desses mesmos processos e consequentes respostas, dependentes de uma articulação e encadeamento com um elevado nível de precisão temporal e especificidade.

Palavras-chave: Acetilação de histonas, BDNF, epigenética, expressão génica, MAPK, MeCP2, memória, metilação de DNA, neurónios, plasticidade sináptica, transcrição.

ABSTRACT

The ability of the human organism to adapt its behaviour in response to environmental stimuli through time is based on the structural and functional plasticity of the CNS. It is known that the processes regarding cellular memory (differentiation) and neurological memory have similarities, not only on the level of their genesis but of their regulation as well, orchestrated by epigenetic mechanisms. Epigenetic tags like DNA methylation and histone post-translational modifications have been increasingly seen as crucial regulators of memory processes. Their functions of dynamic regulation of gene transcription in answer to the neuronal activation have been shown to be relevant and influential in memory formation. The persistent nature of mechanisms like DNA methylation, even after cell division, also suggests the existence of a role to epigenetics on the maintenance of previously formed memory. The content of the present monography spotlights the connection of particular processes involved in the formation and maintenance of memory and cognition, including signaling pathways common to both types of memory (cellular and neuronal) and the epigenetic mechanisms implicated on the regulation of these same processes and subsequent outcomes, dependent of an articulation and sequencing comprising a high level of temporal precision and specificity.

Keywords: BDNF, DNA methylation, gene expression, histone acetylation, MAPK, MeCP2, memory, neurons, synaptic plasticity, transcription.

EPIGENÉTICA

O estudo da epigenética está intimamente ligado ao estudo da evolução e do desenvolvimento. O seu significado sofreu também uma evolução paralela com o aumento evolutivo do conhecimento dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão génica nos eucariotas. A palavra epigenética deriva do prefixo grego "epi" que significa "após" ou "sobre" a genética. O termo surge nos anos 40 por Conrad Waddington com um significado mais abrangente, descrito como o estudo dos processos pelos quais os genótipos dão origem a fenótipos.(1) A definição molecular moderna de epigenética consiste no conjunto de alterações na estrutura base da cromatina que, coletivamente, originam e propagam diferentes padrões de expressão de genes, transcrição, e silenciamento em relação ao mesmo genoma que não são explicados por mudanças na sequência de DNA.(2) (3)

A cromatina consiste numa estrutura altamente condensada constituída por DNA e por proteínas. O epigenoma constitui o conjunto da estrutura da cromatina com os padrões de metilação do DNA, por outras palavras, é o resultado da interação entre o genoma e o ambiente.(4)(5) A epigenética pode então, por esse prisma, ser definida como a manutenção estável da expressão génica que envolve a marcação física do DNA ou das proteínas a si associadas, a regulação da estrutura da cromatina.

A unidade base da cromatina é o nucleossoma, que é constituído por um octómero de histonas envolvido por cerca de 147bp de DNA genómico. O octómero (Fig. 1) contém pares de histonas H2A, H2B, H3 e H4.(6) As extremidades/protuberâncias N-terminais destas histonas, conhecidas pela sua interação com o DNA nucleossomal, são a localização de numerosas modificações pós-tradução, PTMs (acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, por exemplo) levadas a cabo por variadas enzimas modificadoras de histonas (acetiltransferases, desacetilases, metiltransferases, desmetilases, cinases, etc.).(7)

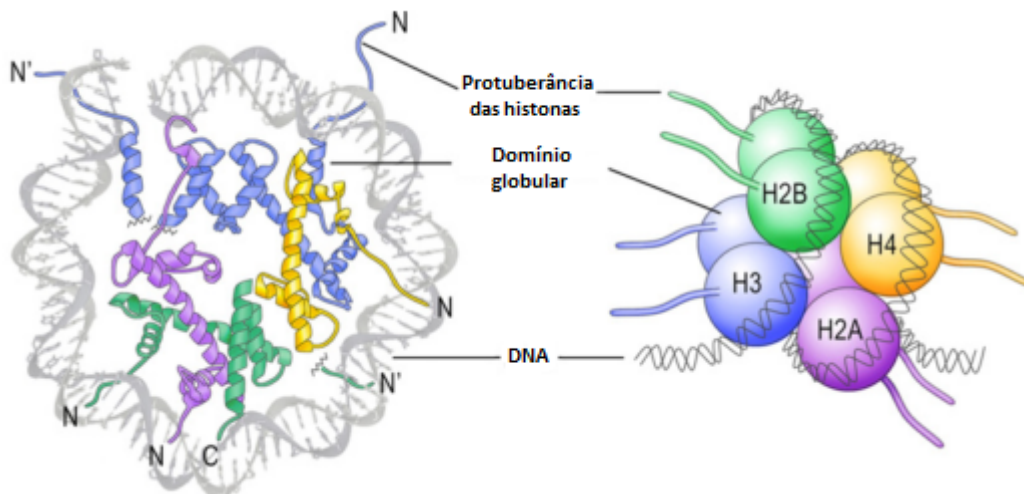


Fig. 1 - Nucleossoma e octómero: Imagem adaptada(1)

Uma vez que o genoma tem muito mais facilidade em ganhar ou perder um grupo metilo do que em alterar a sua sequência de DNA, a epigenética representa mecanismos rápidos com que o organismo consegue responder ao ambiente sem ter de recorrer a mudanças estruturais severas (8), o que nos leva a uma inseparável associação ao conceito, polémica na altura da sua sugestão, a questão da hereditariedade.

É conhecido que alelos silenciados podem ser passados através de vários ciclos de replicação de DNA, o que vai de acordo com a noção de que as marcas epigenéticas podem manter-se pelas divisões celulares mitóticas. No entanto, por muito tempo assumiu-se que durante a gametogenese ou no início da embriogenese essas marcas seriam apagadas de forma a restabelecer a totipotência do embrião em desenvolvimento. Hoje em dia existe um conjunto em crescimento de evidências que sugerem que as marcas epigenéticas em alelos de determinados mamíferos não são completamente apagados de uma geração para a seguinte, resultando em complexos padrões de hereditariedade que indicam que o fenótipo não só pode variar na ausência de fatores genéticos e ambientais como também pode ser herdado por gerações seguintes.(9)

Existem hoje em dia alguns mecanismos epigenéticos relativamente bem descritos em termos conceptuais em que a estrutura da cromatina é regulada resultando num controlo da expressão génica: As já referidas modificações nas histonas, metilação do DNA, RNA não codificante e remodelação da cromatina. De entre esses mecanismos, esta revisão tem como principais focos a acetilação das histonas e a metilação do DNA devido ao facto de se tratarem de mecanismos com estudos mais aprofundados no âmbito neuronal e com conhecida ligação ao desenvolvimento de memória e de capacidades cognitivas.(10)

A base celular e molecular da memória e cognição é algo que tem vindo a fascinar neurocientistas ao longo de décadas. A pura complexidade ideológica de como interpretamos, lembramos e esquecemos experiências vividas torna a sua compreensão uma tarefa aparentemente impossível de ser alcançada. No entanto, dado que a memória do ser humano tem uma duração superior à semi-vida da maioria das moléculas biológicas, é expectável que os responsáveis pela assistência aos processos de formação e manutenção de memória se situem em material biológico duradouro. Seguindo uma perspetiva de epigenética como sendo a adaptação estrutural de regiões cromossomais que possibilita o registo, sinalização ou perpetuação de estados alterados de atividade, podemos inferir que as modificações epigenéticas reagem à aprendizagem e cognição, que compreendem uma atividade neuronal estimulada pela chegada de informação nova, e assistem na integração dessa mesma informação através de programas de expressão em genes específicos – conhecidos pré-requisitos para a formação de memórias de longa duração.

Com estudos desenvolvidos ao nível celular e molecular, com recurso a vários paradigmas da aprendizagem e de memória em diferentes modelos de organismo, começa a desenhar-se uma base de conhecimentos das mudanças moleculares que permitem a criação e armazenamento de memórias por parte dos neurónios onde a epigenética desempenha um evidente papel de enorme relevância.

MEMÓRIA

Memória celular

Os sistemas biológicos possuem a fascinante capacidade de lembrar estímulos do seu ambiente. A capacidade de formação de memória é um fenômeno evolucionário antigo, presente em protozoários. A primeira revolução moderna na abordagem dos neuro-cientistas a este fenômeno surgiu quando Eric Kandel (prêmio Nobel da medicina em 2000) propôs nos anos 60, com base nos estudos que desenvolveu com o molusco *Aplysia californica* como modelo, que as moléculas e mecanismos utilizados para formar memórias simples em organismos simples também seriam utilizados na formação de memórias complexas em organismos também eles mais complexos, como é o caso do ser humano. A pesquisa que tem sido levada a cabo ao longo das últimas décadas corrobora com a referida hipótese, validando o conceito de memória como um antigo fenômeno conservado na evolução das espécies.(11)

Seguindo a mesma linha de estudos, foi reconhecido nos anos 90 um paralelismo entre o desenvolvimento celular e a formação de memórias cognitivas e de comportamento. Ambos os conceitos dependem claramente de sinais ambientais que com a capacidade de desencadear alterações celulares duradouras, vitalícias em alguns casos.(12) Ou seja, existe uma clara analogia entre uma memória de desenvolvimento e diferenciação celular, em que as propriedades e os fenótipos das células se definem durante o desenvolvimento inicial, permanecem armazenadas e manifestam-se durante toda a vida, e uma memória cognitiva e de comportamento em que a informação é adquirida através de uma experiência vivida e fica disponível para uma futura recordação de longo prazo. A conclusão chegada durante estes anos de investigação desenvolvida aponta para a existência de cascatas de sinalização comuns aos dois tipos de memória, indicando que estes para além de evidenciarem analogia, compreendem também uma situação de homologia ao nível molecular.(13)

São conhecidos alguns exemplos em mamíferos que vão de encontro a esta generalização. Um exemplo é o papel de fatores de crescimento envolvidos na diferenciação neuronal, como BDNF e relina, na formação de memórias de longo prazo e plasticidade no sistema nervoso central do adulto. Outro exemplo são as cascatas de sinalização prototípicas. As MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitogénios) são centrais em vias de sinalização úteis na memória e na plasticidade sináptica.(12) Estes exemplos serão discutidos na continuidade da presente monografia. Por último, como exemplo da hipótese em causa, estão os protagonistas desta revisão – os mecanismos epigenéticos.

Os diferentes tipos de células nos organismos multicelulares são idênticas ao nível do genótipo mas no entanto são fenotipicamente diferentes. Esta disparidade de fenótipo deve-se a diferenças entre os padrões de expressão génica nos tipos celulares existentes. Acredita-se hoje em dia que a manutenção estável destas dissemelhanças encontra explicação no controlo epigenético da expressão génica.(9)

A marcação epigenética do genoma ocorre durante os processos de determinação pelos quais as células totipotentes originam tecido diferenciado, e resulta na restrição da expressão de

genes em benefício de outros genes promovidos e vitais para a função e conservação de um determinado tipo de tecido, alcançando-se desta forma uma variação fenotípica sem que haja diferenças genéticas.

Os mecanismos epigenéticos representam assim uma válida hipótese de memória celular, concordante com o facto de diferentes tipos de tecido diferenciado se "lembrarem" do seu fenótipo.(11)

No contexto da diferenciação celular, o conjunto de modificações provocadas por mecanismos epigenéticos na cromatina são estáticas. Quando uma célula sofre diferenciação, o genoma é marcado e estas marcas epigenéticas são preservadas. Uma vez formada a memória celular epigenética, esta não sofre mais alterações (tipo de tecido), idealmente.(14) Por outro lado, o sistema nervoso é dinâmico e está em constante processamento e armazenamento de informação. Nesse caso, os processos epigenéticos utilizados pelo sistema nervoso terão também de possuir dinamismo.

Memória cognitiva e de comportamento

A memória é a base da mente humana. Está envolvida em inúmeros processos pelos quais um organismo recolhe informação apresentada sob a forma de estímulos ambientais e a converte em conhecimento adquirido e armazenado, possível de ser lembrado a qualquer momento de modo a executar decisões, formar uma narração descritiva ou gerar uma interpretação compreensível do mundo. Existem diferentes tipos de memória reconhecidos. Informação proveniente do meio envolvente é apresentada aos sentidos do ser humano. O registo resultante é definido como memória sensorial. Quando essa informação se torna perceptível à consciência mental, define-se como memória de curto prazo que tem uma influência imediata na canalização de foco e atenção por parte de um indivíduo, gerando um comportamento. (4) Muita dessa informação é temporária. Porém, parte dessa informação poderá ser consolidada dando origem a uma memória de longo prazo, com possibilidade de ser recuperada e lembrada funcionando como fundamento para tomadas de decisão, adição de perspectiva e influência geral no comportamento.(15) Assim sendo, não será descabido afirmar que a memória é experienciada sob a forma de consciência. Um dos grandes objetivos de elucidação na presente área de estudo compreende os processos moleculares responsáveis pela conversão de memórias de curto prazo em memórias de longo prazo consolidadas.

O papel da transcrição em formas de plasticidade sináptica de longa duração e memória tem sido ativamente investigada desde os ensaios iniciais que mostraram que a transcrição se tratava de um requisito para a formação de memória de longa duração em *Carassius auratus* (Peixe dourado) nos anos 60, estudos conduzidos por Agranoff.(16) A plasticidade sináptica é definida como o conjunto de variações da força sináptica dependentes de atividade e é considerada como o principal propulsor da formação de memórias de longo prazo. Os estudos desenvolvidos com a *Aplysia californica*, mais concretamente na sinapse sensomotora do molusco, mostram duas formas de plasticidade – Facilitação de longo prazo (LTF)

(denominada de potenciação de longo prazo (LTP) nos mamíferos), que corresponde à melhoria duradoura da transmissão sináptica e a depressão de longo prazo (LTD), redução duradoura da transmissão sináptica.(14)

A descoberta de que as modificações epigenéticas no hipocampo cerebral são temporárias(17) veio desafiar a hipótese inicial de que estas mesmas modificações teriam funções relevantes no âmbito das memórias de longo prazo. Contudo, a teoria dos sistemas de consolidação e manutenção de memória sugerem que estas modificações epigenéticas são tão temporárias quanto o envolvimento do hipocampo na formação de memórias. Segundo esta teoria, a consolidação de memória é dependente do hipocampo desde o primeiro contacto consciente com a nova informação até aproximadamente 7 dias após esse contacto. No caso de memórias mais antigas, estas são descarregadas para o córtex onde se estabelecem por períodos de tempo prolongados. Por conseguinte, estudos comprovam um aumento de densidade das espinhas dendríticas no hipocampo associado a memórias recentes e um aumento de densidade das espinhas dendríticas no córtex associado a memórias antigas. Verifica-se a mesma disparidade em relação à metilação de DNA nas duas regiões cerebrais. A utilização de inibidores do processo de metilação de DNA no córtex resulta num bloqueio de recordação de memórias, sugerindo que este mecanismo epigenético apoia a manutenção de memória com o passar do tempo.(15)(18)

A cognição e formação de novas memórias requerem uma remodelação estrutural e funcional das sinapses através de mecanismos de regulação celular e molecular estritos. Em resposta a um específico padrão neuronal de atividade (como LTP ou LTD). Ao nível molecular, a ativação neuronal origina modificação, translocação e produção de novas proteínas de moléculas relacionadas com a memória por forma de cascatas de sinalização intracelulares, transcrição de genes e síntese proteica, exercendo influência na comunicação e sinalização nas redes neuronais.(19)(1)

SINALIZAÇÃO NEURONAL

MAPK

A cascata de sinalização da proteína cinase ativada por mitogénios (MAPK) foi originalmente descoberta como sendo crítica na regulação da divisão e diferenciação celular. Não obstante, a sua proeminente expressão no sistema nervoso desenvolvido, e em particular no hipocampo (com destaque para a área CA1), levantou a questão da sua posição em relação às células neuronais com diferenciação totalmente consumada e sem capacidade de divisão. Dessa questão surgiu então a especulação tornada hipótese, que eventualmente viria a ser confirmada, de que a via de sinalização MAPK/ERK teria uma intervenção vastamente apreciável na plasticidade sináptica e formação de memória.(20) (21)A via MAPK/ERK tem um papel de regulação da expressão génica em todas as células. No sistema nervoso, existe como mediador e integrador de sinais que permitem aos neurónios corresponder com

mudanças de longa duração da força sináptica, concordantes com o cariz da informação recebida (indicação da já mencionada homologia molecular entre diferentes tipos de memória).

Esta é especificada como cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e é definida como o protótipo de uma família MAPK de cascatas de sinalização (ERKs, JNKs e p38) em que cada uma é constituída por três cinases distintas ativadas em sequência. Apesar das semelhanças presentes entre as referidas cascatas, a sua interligação/intercomunicação é aparentemente limitada.(21) A ERK apresenta um envolvimento estrito na memória espacial, nos testes de medo condicionado contextual e é ativada no hipocampo com a cognição associativa. Estudos recentes também indicam uma correlação entre o mal-funcionamento ou desregulação da via MAPK/ERK e uma patologia cognitiva humana, neurofibromatose associada a limitações mentais.(12)

Estímulos sensoriais originam cascatas de sinalização bem definidas, com início na ativação do recetor ácido N-metil-D-aspartato (NMDA). A via de sinalização MAPK/ERK transmite a ativação do sinal até ao núcleo. No núcleo, a fosforilação, dependente da chegada do sinal, da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), intrinsecamente ligada à acetilação de histonas, ativa a transcrição de genes essenciais à memória. Este processo produz novas proteínas sinápticas e proteínas funcionais associadas que permitem uma remodelação sináptica de longa duração influente na formação de memória. Existe evidência de que o estado conformacional da cromatina antes e durante o estímulo é fulcral na expressão génica despoletada.(19) (22)

Desta forma, o controlo das PTMs das histonas nas alterações de plasticidade sináptica e de comportamento estimulado por uma experiência vivida também passa pela ação da via MAPK/ERK. Um exemplo dessa dependência é a acetilação da histona H3 no hipocampo. A ativação dos recetores NMDA e de outros recetores associados aos mesmos fenómenos aumenta a acetilação da histona H3, efeito esse contrariado pela inibição da sinalização MAPK/ERK. A acetilação não é a única modificação nas histonas associada a esta via, a fosforilação está também dependente dessa sinalização surgindo ligada ao medo condicionado induzido em estudos laboratoriais. Ou seja, o aumento de plasticidade sináptica, com recurso a ERK, amplia o número de acetilações e fosforilações das histonas no hipocampo.(18) (14)

Em síntese, existe um considerável conjunto de evidências que indicam que a cromatina e os processos epigenéticos que esta engloba sofrem uma regulação dependente da via MAPK/ERK e que estas alterações são cruciais na potenciação de longa duração no hipocampo e, conseqüentemente, na formação de memória.

É possível então constatar que a via de sinalização MAPK/ERK para além de representar o elemento determinante no vínculo existente entre a memória celular e a memória neuronal, também revela ser um elo de ligação mecânico direto entre as alterações epigenéticas e a memória.

BDNF

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um membro de uma família de fatores neurotróficos com um forte envolvimento na regulação e diferenciação neuronal. É também amplamente reconhecida a implicação do BDNF na regulação e função de diferentes circuitos neuronais ao longo da vida.

A conexão entre o BDNF e a plasticidade sináptica surgiu, em semelhança ao caso da ERK, por observação de uma elevada expressão deste fator neuronal no hipocampo, com recurso a estimulação de alta frequência (HFS), utilizada na indução de LTP. Está associado à formação de diferentes tipos de memória e ao seu armazenamento no hipocampo, amígdala e córtex. (23) São reconhecidas em algumas destas regiões cerebrais funções de regulação sináptica por parte do BDNF, com consequências funcionais e estruturais de duração variável, em sinapses excitatórias e inibitórias. O BDNF pode modular a atividade cerebral bidirecionalmente na medida em que a sua expressão pode ser exacerbada ou atenuada consoante a experiência que a regula da mesma forma que os traços de comportamento podem ocorrer tanto a baixas como a altas intensidades.(24) (25) Assim sendo, muitos aspetos da biologia celular do BDNF são regulados pela atividade neuronal. A sua função na regulação de processos celulares implicados na cognição e outros comportamentos de elevada complexidade é fruto das interações sinérgicas entre a plasticidade sináptica e a atividade neuronal por si mediadas. Devido à sua intimidade com a potenciação de longo termo no hipocampo, a deficiência da sinalização do BDNF poderá contribuir na patogénese de doenças ou distúrbios como por exemplo, a doença de Alzheimer.(26)

A demanda de informação acerca da possível relação entre o BDNF e as alterações epigenéticas da cromatina provocadas por processos de acetilação, metilação e fosforilação surgiram uma vez confirmado o envolvimento de fatores de transcrição clássicos como o CREB na expressão de BDNF. As funções do BDNF no SNC dependem da sua interação com dois recetores transmembranares localizados nas dendrites, soma e axónios de neurónios. Um é o recetor tropomiosina cinase B (TrkB) responsável pela grande maioria da atividade conhecida do BDNF. O outro é o recetor de neurotrofina p75 (p75NTR), associado ao precursor proBDNF. Estudos recentes apontam para a capacidade do recetor do BDNF, TrkB, comportar-se como marcador sináptico regulado por atividade com a capacidade de relocalizar proteínas associadas à plasticidade, entre elas o BDNF, até sinapses recentemente ativadas. Esta marcação sináptica representa um potencial mecanismo de condução de genes epigeneticamente regulados até aos locais sinápticos pertinentes.(18)(27) A ligação BDNF/TrkB desencadeia vias de sinalização, entre as quais a MAPK/ERK. Por via da ativação da cascata MAPK/ERK, ocorre um aumento de fosforilação no local de regulação transcricional do CREB, provocado pela exposição de BDNF no hipocampo, que intensifica a expressão de vários genes como c-fos, por exemplo.(23) Foi também experimentalmente mostrado que o medo contextual induzido origina uma expressão seletiva do BDNF (exon IV), bloqueada por inibição direta da metilação do DNA no hipocampo dorsal, dependente da intervenção do recetor NMDA e da via MAPK/ERK no processo.(23)

Existem vários indícios de que o promotor do BDNF está sujeito a uma remodelação dinâmica da cromatina, a uma regulação epigenética. A ativação do recetor TrkB pelo BDNF causa, entre outras consequências como as já mencionadas, uma despolarização no neurónio e aumenta a fosforilação do recetor NMDA. Concomitantemente, a ativação do BDNF leva à dissociação da desacetilase das histonas 2 (HDAC2) da cromatina.(19) Os dois efeitos resultam num incremento na acetilação das histonas nas regiões do promotor do gene *bdnf* e outros genes envolvidos na plasticidade que causa um aumento na expressão génica formando um ciclo de feedback positivo, maximizando as alterações no circuito neuronal durante a formação de memória.

ACETILAÇÃO DAS HISTONAS

A especificidade de gene dentro do genoma assim como a especificidade de região no seio da cromatina são características das modificações das histonas que lhes conferem uma posição de destaque na influência seletiva da expressão génica. Estas alterações intensamente específicas provocam alterações diretas na condição da cromatina e na transcrição através de alguns mecanismos reconhecidos. Um exemplo é o relaxamento por diminuição da afinidade eletrostática entre as extremidades das histonas e o DNA, provocado pela acetilação das histonas, que promove uma estrutura da cromatina mais permissiva à transcrição de genes por facilitação do acesso dos fatores de transcrição ou da RNA polimerase a determinados locais do DNA. Também se pensa que a acetilação específica nas extremidades das histonas permite a ligação de fatores de transcrição com um domínio bromo a estas histonas incentivando a remodelação da cromatina (Fig. 2).(12)

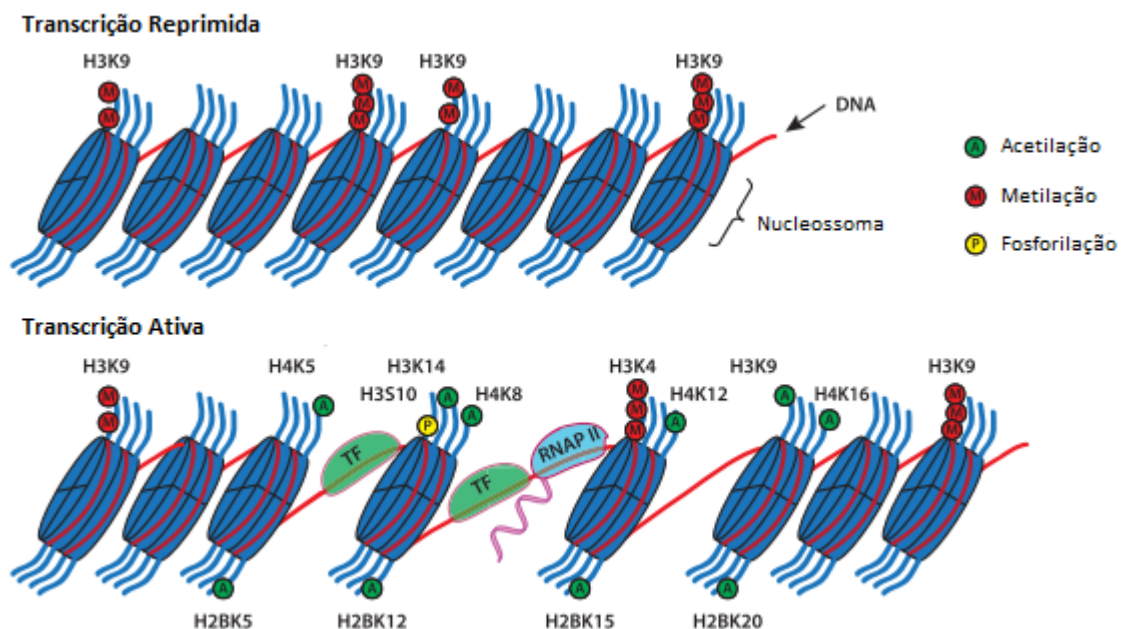


Fig. 2 - Modificações das histonas: Imagem adaptada.(18)

A acetilação é a PTM das histonas mais bem caracterizada até o dia de hoje. Ocorre nos resíduos de lisina do grupo amina das protuberâncias das histonas, neutralizando a sua carga positiva com êxito. Como referido anteriormente, as extremidades N-terminais das histonas contêm múltiplas zonas onde ocorrem potenciais modificações como acetilações. Estas marcas epigenéticas são, de forma bidirecional e reversível, catalisadas ou removidas por tipos de enzimas específicos. A catalisação, transferência de grupos acetil da acetil-coenzima A até aos grupos ϵ -NH⁺ dos resíduos de lisina das proteínas em foco, é levada a cabo pelas acetiltransferases das histonas (HAT). Por sua vez, as responsáveis pela remoção dos grupos acetil são as desacetilases das histonas (HDAC). Estes dois tipos de enzimas funcionam em conjunto, criando-se um balanço entre as duas por forma a modular a expressão génica.(12)

As HATs estão divididas nas subfamílias P300/CBP, MYST e GNAT. Nos mamíferos, as HDACs estão divididas em quatro classes: Classe I, II e IV (dependentes de zinco), e classe III, HDACs conhecidas por sirtuínas (dependente de NAD).(28) As HATs têm uma função, para além da já descrita, que consiste na marcação da cromatina para recrutamento de enzimas com incumbências na sua modificação e remodelação para subsequente regulação e facilitação dos processos transcripcionais. A HAT mais estudada a fundo na esfera da memória e cognição trata-se da proteína de ligação ao CREB (CBP). A CBP, pertencente à subfamília P300/CBP, é um conhecido coactivador recrutado pelo CREB através da interação entre o domínio de Ser 133 induzível por cinases (KID) e o domínio KIX da CBP. A ligação entre a CBP e a memória foi descoberta a partir do Síndrome de Rubinstein-Taybi (RTS) que é caracterizada por retardamento mental e distúrbios de desenvolvimento causadas por mutações na CBP.(16)

De entre as classes de HDACs, as classes dependentes de zinco (I, II e IV) foram mais aprofundadamente estudadas em conexão com a memória e cognição apesar de recentemente terem sido efetuados estudos com foco nas sirtuínas. Foram descobertas propriedades neuroprotetoras e benéficas na formação de memória em sirtuínas, indicando que a inibição das HDACs com o intuito de melhorar a resposta cognitiva e de incremento de memória não se aplica de um modo universal a todos os tipos de HDACs, havendo determinadas classes ou tipos em que a sua ativação se ajusta melhor aos objetivos referidos, como é o caso da desacetilase sirtuína-1 dependente de NAD (SIRT1).(28) (29)

Dentro das classes dependentes de zinco, as classe I e IV têm uma expressão maior nas regiões cerebrais envolvidas na memória do que a classes IIa e IIb (classe com a menor expressão). Também, e como exemplos, na classe I, a HDAC2 e a HDAC3 têm uma expressão maior do que a HDAC1 e a HDAC8 enquanto que na classe IIa, HDAC4 é a que tem maior expressão. As descobertas efetuadas nestes estudos mostram que a localização, função e atividade das diferentes HDACs pode ser diferente mesmo dentro do mesmo tipo de desacetilase (Anexo 1), justificando uma necessidade de especificação na abordagem à inibição destas enzimas.(28)(30)

A primeira evidência da associação da acetilação das histonas com a memória e cognição despontou do estudo da acetilação das histonas H3 e H4 após indução de medo

contextualizado condicional e inibição latente (separadamente) em ratos, paradigmas associados à cognição. No primeiro caso foi verificado que a lisina 14 da histona 3 (H3K14) havia sofrido um aumento considerável na área C1 do hipocampo enquanto que a acetilação da H4 permanecia inalterada. No segundo caso, foi verificado o contrário, havendo alteração da acetilação da H4. O estudo retratado para além de corroborar a existência correlacional e proporcional entre a acetilação das histonas e a consolidação de memórias, evidencia também a sólida possibilidade de que diferentes paradigmas de aprendizagem, diferentes formas de receber informação externa, suscitam respostas epigenéticas distintas. Desde a referida experiência, foram realizadas outras, pondo em prática diferentes paradigmas de aprendizagem adicionais e outras espécies de animais, experiências essas com resultados concordantes com a descrita.(28) Estudos de carácter semelhante verificaram que a coocorrência de acetilação nas histonas H3K9, H3K14, H4K5, H4K8 e H4K12 no hipocampo após medo condicionado induzido em ratos jovens está associada a mudanças nas transcrição de centenas de genes.(12)

Outro ponto de ligação entre as modificações das histonas e a memória é o BDNF que é regulado negativamente pela HDAC2 mas aumenta com a atividade neuronal através da proteína 2 de ligação a metil-CpG (MeCP2), proteína ligada também à metilação do DNA. A atividade neuronal poderá então acionar o já referido ciclo de feedback positivo que leva a uma expressão génica mediada pela acetilação das histonas tendo como principais intervenientes a HDAC2, o BDNF e, inderetamente, a MeCP2.(31)

Desde as suas descobertas, foram desenvolvidos estudos que concluíram que a inibição das HAT tem um efeito negativo na formação de memória enquanto que a inibição das HDAC a promove. Esta informação é válida para memórias mais consolidadas mas não para a memória de curta duração, o que é concordante com o suposto envolvimento da acetilação das histonas na expressão génica implicada na formação de memória de longo prazo.(28)

Mutações na HAT CBP em ratos resultam numa diminuição na acetilação das histonas, condicionando a formação de memória. Dada a sinergia entre a inibição induzida das HDACs e o processo natural de incrementação da acetilação das histonas causadas por experiências cognitivas, houve uma necessidade de aprofundar o estudo dos inibidores das HDACs (HDACis). Foi proposto que a utilização de HDACis poderia melhorar a plasticidade sináptica e memória em ratos com respostas normais de CBP mas, induzindo um estado de hiperacetilação das histonas, poderia também causar um efeito de compensação em casos de défice de CBP. Testes com as HDACis SAHA e TSA revelaram a veracidade da proposta, tendo demonstrado melhorias ao nível da memória de reconhecimento e associada ao medo condicionado induzido.(32)(16) No entanto, também foi verificado que a interação CREB/CBP, devido à sua função na engrenagem transcricional, é essencial para o efeito na LTP por parte dos HDACis, pelo que a simples hiperacetilação das histonas poderá não ser suficiente para o referido efeito.

Foram realizados testes relacionados com a atividade das HDACs em ratos que chegaram a uma conclusão pouco surpreendente mas ainda assim interessante. Uma vez que a memória é

um efeito de sinais provenientes do ambiente circundante do indivíduo, foi verificado que a atividade das HDACs é também alterada por mudanças no ambiente.(30) Em modelos de neuro-degeneração sob a forma de ratos, por alteração do meio em que se encontravam, desde a utilização de rodas para correr, nutrição seletiva e interação social, verificou-se um aumento da densidade sináptica e melhorias na memória espacial e de associação, sinais semelhantes aos obtidos por HDACis, como é o caso de NaB, que causa um efeito de intensificação da acetilação das histonas H3 e H4 em zonas hipocámpais e corticais do cérebro. No entanto, na sua essência, essas alterações ambientais assim como os seus possíveis efeitos ainda não são especificamente conhecidos apesar de já haver estudos relativos à limitação do aporte calórico apesar de não ter sido comprovada uma implicação direta com a memória cognitiva. F;KG

Presentemente, o estudo das HDACis tem avançado na direção da especificidade, permeabilidade celular e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica na perspectiva de uma utilização farmacológica.

Outras modificações das histonas

Tal como na acetilação, a metilação das histonas ocorre nos grupos ϵ -NH⁺ dos resíduos de lisina e é mediada por metiltransferases das histonas (HMTs). Ao contrário do que acontece na acetilação, os resíduos de lisina metilados preservam a sua carga positiva e têm a capacidade de aceitar até três grupos metilo. A remoção dos grupos metilo é efetuada pelas desmetilases das histonas (HDMs). A metilação não ocorre exclusivamente nas lisinas, pode afetar também resíduos de arginina através de mono ou dimetilações, reações mediadas pelas metiltransferases das proteínas argininas (PRMTs).(14) (33)

De notar que apesar das extremidades N-terminais das histonas do nucleossoma serem as mais frequentemente associadas à epigenética da memória, têm vindo a surgir evidências de que outros domínios das histonas também poderão albergar estes mecanismos de modulação genómica, de como é exemplo a metilação por parte da proteína disruptora do silenciamento telomérico 1 (DOT1P) na lisina 79 da H3, resíduo que se situa no domínio globular das histonas.(14)

A fosforilação das histonas dá-se nos resíduos de serina ou treonina das extremidades das histonas. Várias cinases nucleares poderão ser responsáveis pelas fosforilações, como a MSK-1.(34) (28) Por sua vez, a desfosforilação é levada a cabo por fosfatases proteicas como a proteína fosfatase 1 (PP1) cuja inibição está associada a uma melhoria da memória de longa duração. A fosforilação tem vindo a aparecer associada à acetilação de histonas. A acetilação pode ser desencadeada por várias formas de atividade neuronal. Foi demonstrado que a despolarização neuronal mediada por cloreto de potássio leva a uma hiperacetilação da histona H2B no hipocampo de roedores e ao estímulo das vias dopaminérgica, colinérgica e glutamatérgica por agonistas específicos ao nível do recetor, aumentando a acetilação da histona H3K14 e fosforilação da histona H3S10. Em todos os casos, as modificações na

acetilação das histonas foram acompanhadas por ativação por meio de fosforilação da ERK. Como visto anteriormente, a ativação da via MAPK/ERK provoca hiperacetilação das histonas ao passo que a sua inibição impede a acetilação. Estas descobertas confirmam o já referido envolvimento da MAPK/ERK em todo este processo adicionando a provável interligação desta via com a fosforilação da H3S10, muitas vezes associada à acetilação de H3K14.(28)

A ubiquitinação das histonas não sofreu o mesmo aprofundamento de estudo dos casos anteriores. A ubiquitina é uma proteína de 76 aminoácidos cujo nome provém da sua distribuição ubíqua em todas os tipos de células onde normalmente surge associada a proteínas sinalizando-as para degradação por parte do proteossoma. A ubiquitinação também ocorre nos grupos ϵ -NH⁺ dos resíduos de lisina das histonas e foi observada nas histonas H1, H2A, H2B e H3, na grande maioria dos casos sob a forma de mono-ubiquitinação apesar de existir evidência de poli-ubiquitinações.(14) (35)

Código das histonas

Uma vez que as histonas possuem vários locais de modificação, a existência de um código de histonas, um padrão de modificações interligadas funcionando em conjunto de forma a ditar o destino, por meio de transcrição ou ausência da mesma, de um gene específico, constitui uma hipótese de imperativa consideração. A hipótese, confirmada experimentalmente, sugere que certas combinações de modificações levam à ativação da transcrição enquanto que outras determinadas combinações causam a sua repressão. Foi demonstrada, com recurso a sequenciação por imunoprecipitação da cromatina (ChIP-Seq), uma tendência para a coocorrência de uma combinação específica de 17 modificações associada a um aumento da expressão génica. Este conjunto de modificações foi observado numa imensidão de promotores de genes, apontando para que se trate de um mecanismo geral pelo qual as histonas poderão alterar a transcrição de genes.(36)

Tudo indica, no entanto, que combinações exatas de modificações ao longo do nucleossoma raramente se repetem entre genes o que depende uma regulação epigenética de enorme complexidade e especificidade para cada gene.(12) (35) Por este prisma, o código das histonas, ao contrário do que se pensava inicialmente, não compreende uma combinação de modificações capaz de originar uma única resposta universal mas sim um complexo grupo de modificações que, consoante as suas combinações, pode gerar profusas respostas específicas em diversos genes. As possibilidades para o modo operacional das diferentes modificações constituintes do código das histonas são vastas. Uma modificação particular poderá recrutar uma enzima modificadora de histonas que cause um efeito indutor ou repressor nas marcações próximas. Um exemplo desta prática é a fosforilação na serina 10 em H3 que reprime a metilação na lisina 9 estimulando a acetilação na lisina 14 (Fig. 3). Este tipo de interação não ocorre exclusivamente dentro da mesma extremidade da histona, pode também ocorrer entre extremidades diferentes.(12)

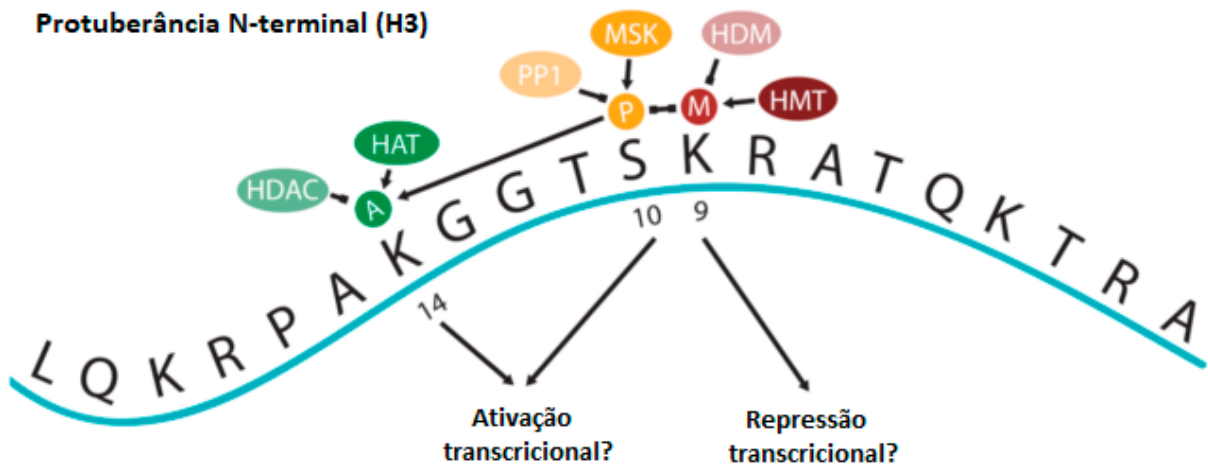


Fig. 3 - Interações entre mudanças nas histonas em H3: Imagem adaptada.(12)

Adicionalmente, algumas destas marcas epigenéticas específicas poderão ser repressoras ou indutoras da transcrição, dependendo da índole das restantes marcas adjacentes, o que explicaria a dualidade de funções e consequências que algumas modificações das histonas apresentam. Para além disso, demonstra também que modificações associadas à mesma repercussão não estão necessariamente presentes em conjunto nas mesmas situações.

Nesta veia de possibilidades, a própria cinética das reações em questão não deve ser negligenciada. Visto que a acetilação e a fosforilação das histonas podem ser revertidas mais facilmente que a metilação das mesmas, que persiste por mais tempo, estes mecanismos podem exercer um controlo conjunto da expressão génica repartido ao longo do tempo, mesmo sem que haja uma interação direta entre si.

METILAÇÃO DO DNA

A metilação de DNA, a adição de um grupo metilo à posição 5' no anel piramidal da citosina, pode ocorrer em vários locais de um gene mas, geralmente, esta modificação encontra-se limitada aos nucleótidos de citosina seguidos de nucleótidos de guanina, conhecidos como zonas CpG. Estas zonas são pouco frequentes ao longo do genoma (em termos percentuais) mas são ocasionalmente encontradas agrupadamente, formando as chamadas ilhas CpG. As ilhas CpG tendem a aparecer na região do promotor dos genes ativados, sugerindo um envolvimento no controlo da transcrição. De notar ainda que cerca de 70% dos dinucleótidos CpG existentes estão metilados e, normalmente, os que não se encontram metilados são os constituintes das ilhas CpG.(12)(37) A metilação do DNA é catalisada pelas metiltransferases de DNA (DNMTs), que se encontram divididas em dois grupos. O primeiro consiste nas DNMTs "de novo", implicadas na metilação de citosinas livres ou não metiladas em qualquer

uma das cadeias de DNA. O segundo compreende as DNMTs de manutenção, envolvidas na metilação de citosinas hemi-metiladas.(31) (38)

Três DNMTs (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) medeiam a transferência do grupo metilo do cofactor enzimático S-adenosilmetionina (SAM) até à posição 5 da citosina. As três têm a capacidade de efetuar metilações "de novo" mas a DNMT1, distinta ao nível estrutural, é predominantemente responsável pela metilação de manutenção.(39)(40) As DNMTs asseguram a perpetuação da metilação do DNA perante constantes desmetilações passivas, permitindo uma modificação química persistente ao longo da vida de uma célula. A sua atividade permite que uma metilação em ambas as cadeias de DNA persista mesmo na eventualidade de haver danos ou metabolização da citosina, ou seja, a marca epigenética não fica necessariamente comprometida, havendo a possibilidade de esta ser restabelecida, o que não significa que não possam sofrer desmetilação. Pensa-se que seja esta a razão pela qual células em divisão passam as marcas de metilação às células descendentes.(38)

Originalmente, a metilação do DNA era vista como uma marca epigenética estável. Hoje sabe-se que este mecanismo sofre uma dinâmica regulação nos neurónios em resposta à atividade neuronal, com metilações a ocorrer mesmo fora das ilhas CpG em associação a genes específicos apesar do efeito dessa expressão génica ser ainda desconhecido.

Os mecanismos em torno da metilação do DNA podem dar origem a três tipos de resultados gerais conhecidos: Metilação das duas cadeias de DNA, hemi-metilação e ausência de metilação. Estes diferentes cenários aliados à possibilidade de existência de centenas de zonas CpG nas regiões intragénicas, em particular no promotor, conferem um enorme e complexo potencial de combinações no horizonte da metilação do DNA. O contexto em que este processo se desenrola também revela ser importante, como a sua localização relativamente ao local de ligação de um fator de transcrição, aumentando drasticamente as possibilidades de repercussão deste mecanismo epigenético na transcrição de genes.(12)

As mudanças na metilação de DNA no hipocampo em resposta à atividade sináptica e cognição têm uma duração relativamente curta, de dias ou por vezes horas. Ainda assim, a memória de medo contextual em ratos pode chegar a durar muitos meses. Como previamente referido, pensa-se que a memória de longa duração localiza-se no córtex pré-frontal, o que foi recentemente demonstrado através da inibição de DNMTs nesta região cerebral, 1 mês após medo condicionado, resultando na incapacidade de relembrar memórias com uma duração considerável. Esta informação aponta para um comportamento das DNMTs como marcadores de memória de longo prazo em certas regiões do cérebro. Testemunhando a favor desta linha de pensamento, o ato de lamber e limpar os filhotes nas primeiras semanas de vida por parte dos ratos progenitores tem, comprovadamente, uma influência na metilação do DNA no cérebro desses filhotes na idade adulta.(7)

Curiosamente, foi observado que a inibição de DNMT no córtex pré-frontal impede a recordação de memórias existentes mas não a formação de novas memórias, o que propõe funções específicas ao nível de diferentes circuitos de processos envolvidos na formação e

manutenção de memória por parte da metilação do DNA. Uma característica deste mecanismo epigenético que tem vindo a ganhar cada vez mais relevância é a sua especificidade em genes particulares havendo registos de alguns genes com metilação aumentada e outros com a metilação diminuída após atividades cognitivas. A observação da bidirecional especificidade de genes da metilação do DNA leva a crer que o todo o processo por si responsável tem uma especificidade e precisão de alto nível.(39)

As marcas provocadas pela metilação do DNA levam a alterações na cromatina que são maioritariamente associadas a uma diminuição da transcrição. No entanto, existem exemplos de casos em que a metilação do DNA não exibe uma ação repressora da transcrição. Foi observada uma associação de isoformas das DNMTs na ativação transcricional relacionada com a formação de memória, com mecanismos de mediação ainda desconhecidos.(18)

Estas observações colocam em dúvida a dominância da metilação sobre a desmetilação do DNA, por inibição das DNMTs, na disfunção da memória, por defesa da necessidade imperativa de um balanço entre ativadores e inibidores da memória, desde proteases e fosfatases até fatores de transcrição e repressores nos promotores dos genes.(18) Apesar da natureza da conexão entre modificações comportamentais e a metilação do DNA ser ainda pouco conhecida, o grosso das evidências apoia a existência de um papel crítico da metilação do DNA na coordenação de padrões apropriados tanto à ativação como ao silenciamento de genes. Tendo estes dados em consideração, subsiste a possibilidade de que as DNMTs estejam envolvidas tanto na metilação como na desmetilação do DNA sendo a sua inibição responsável pela interrupção de ambos os processos.

No DNA, a metilação pode interferir diretamente com a competência de ligação a elementos de regulação por parte de fatores de transcrição. Por exemplo, o fator de transcrição eritroblastose 1 (ETS1) liga-se eficientemente ao DNA não metilado mas não ao DNA metilado. No entanto, são conhecidas outras proteínas que se ligam a CpGs metiladas, tais como a Kaiso, algumas das proteínas com domínio de ligação a metil-CpG (MBDs) e a proteína 2 de ligação a metil-CpG (MECP2), das quais se destaca a última.(37)

MeCP2

As proteínas MBD podem mediar a repressão transcricional por recrutamento de enzimas envolvidas na remodelação da cromatina como é o caso da MeCP2, diretamente associada com as HDACs.(2) A MeCP2 pode também atuar na ativação da transcrição, quando ligada à CREB, por exemplo.

MBD's como a MeCP2 têm afinidades diferentes para DNA hemi-metilado e completamente metilado o que pode ser uma característica chave na regulação da transcrição. No SNC, a hidroximetilação de citosinas que marca os grupos metilo para remoção pode afetar a ligação das MBD's ao DNA. Ainda não é conhecida a natureza desta reação, se compreende um outro mecanismo epigenético ou se se trata de um estado intermédio de uma marca de metilação já

existente, apesar de estar claramente envolvido no domínio da memória, como avançado por alguns estudos já efetuados.(12) Animais com um déficit de MeCP2 revelam menos aptidão na cognição espacial e medo condicionado, apresentando também défices de LTP, enquanto que a sua superexpressão resulta em níveis superiores de LTP e medo condicionado. Estas descobertas indicam a provável necessidade do funcionamento constante da MeCP2 para o normal desenvolvimento de memória, cognição e plasticidade sináptica no SNC por vias de regulação da transcrição génica dependente de atividade. Devido à sua conexão com o BDNF, a MeCP2 tem um papel na mediação do silenciamento do gene *bdnf*, cuja expressão está dependente da atividade do BDNF.

Parte do mecanismo de funcionamento da MeCP2 poderá residir na marcação da metilação das histonas em regiões de regulação levada a cabo pela metilação de DNA. É conhecido o envolvimento entre a atividade da MeCP2 e as HDACs mas visto que a inibição das HDACs tem uma ação de repressão parcial, é pouco provável que este papel seja o reflexo de todo o potencial repressor da MeCP2.(41) O reconhecimento de zonas CpG metiladas é muitas vezes mediado por estas proteínas, que, com a sua capacidade de recrutamento de HDACs, as podem direcionar até essas zonas CpG levando a modificações na cromatina. Este reconhecimento por parte das proteínas MBD passa pela deteção de um par de resíduos de arginina implicados na quelação dos anéis de guanina complementares.(38)

A MeCP2 poderá assim ser um elo de conexão entre a repressão transcricional mediada por modificações nas histonas e modificações no DNA. Dados de estudos em *Neurospora crassa* e *Arabidopsis thaliana* indicam também que a metilação de H3 na lisina 9 ocasiona a metilação do DNA.(41) Caso o mesmo se verifique nos mamíferos, é possível que o MeCP2 seja determinante num ciclo de repressão autossuficiente crucial para a manutenção e hereditariedade do estado reprimido. Neste panorama, o MeCP2 poderia ser responsável pela distinção entre o estado reprimido permanente de determinados promotores de genes e o temporariamente regulado estado de repressão de outros.

CONSIDERAÇÕES, LIMITAÇÕES E POTENCIALIDADES

Existem alguns parâmetros a ter em consideração em relação a esta monografia. Foi demonstrada a existência de mecanismos epigenéticos ou mecanismos potencialmente epigenéticos adicionais, envolvendo piRNA(42) por exemplo, que não estão contemplados nesta monografia principalmente devido ao ainda limitado ou inexistente conhecimento da conexão com os restantes mecanismos descritos.

Apesar de se assumir cada vez mais que os processos epigenéticos se traduzem num conjunto intrincado de mecanismos combinados que exercem funções em aspectos específicos da memória, a informação comprovada experimentalmente cinge-se na sua vasta maioria à ação individualizada destes processos epigenéticos (o que não invalida a sua utilidade na compreensão do panorama global).

A provável hipótese de que estes mecanismos actuam em conjunto carece ainda de uma demonstração experimental que comprove que os estímulos cognitivos, sinais e experiências de evocação de memória geram um determinado e específico conjunto de marcas epigenéticas em neurónios. Adicionalmente, a demonstração experimental de que o bloqueio ou interrupção deste conjunto específico de marcas epigenéticas leva a modificações que resultam na diminuição da formação ou armazenamento de memória torna-se igualmente relevante. A compreensão do modo de funcionamento conjunto dos mecanismos epigenéticos e as suas consequências transcricionais a um nível celular altamente específico é crucial para que se possa inferir positivamente acerca de processos com a complexidade da memória e cognição. A especificidade local destes mecanismos deveria assim ser, idealmente, versada nestas verificações experimentais, desde o nível de especificidade de gene, ou da ilha CpG, até determinadas protoberâncias N-terminais das histonas.

Para além de uma resolução celular aumentada, um grau de resolução molecular superior poderá assistir na compreensão da interação das cascatas de sinalização com os mecanismos epigenéticos e como estas modificações poderão ser integradas na regulação da plasticidade sináptica e função neuronal. Para além disso, muitos dos estudos realizados focaram-se em genes com conhecido envolvimento na memória. Estudos ao longo do genoma poderão vir a ser importantes na deteção de genes adicionais regulados epigeneticamente com importância na formação e manutenção de memória.(18) Felizmente, o desenvolvimento recente de tecnologias de sequenciamento ao longo de todo o genoma veio permitir a formulação do denominado metiloma com base num panorama geral de metilação de DNA.(39)

Em relação aos próprios métodos experimentais, o sequenciamento de DNA por bissulfito, método muito utilizado na determinação de DNA metilado, é um método que não possui a capacidade de diferenciação ao nível do tipo específico de células. No entanto, quando associada à sub clonagem de DNA, que tem origem em alelos de uma única célula permitindo o isolamento de DNA de células únicas do SNC, é possível fazer a verificação de DNA metilado ao nível de um único nucleótido, numa única célula cerebral.(12) O grande problema presente na área é o facto de muita da informação utilizada em estudos recentes ser baseada em demonstrações efectuadas com recurso a métodos e abordagens muito pouco específicas e/ou limitadas o que justifica a repetição e comprovação de estudos experimentais "antigos" mas com recurso a tecnologias mais específicas desenvolvidas e disponíveis nos dias de hoje.

Foram também verificadas várias relações entre os intervenientes na formação de memória e algumas patologias como é o caso da Síndrome de Rett, doença neurológica semelhante ao autismo e causada por mutações no gene MeCP2(3)(33)(43); Doença de Alzheimer, que tal como referido, se encontra ligada a uma deficiente sinalização do BDNF e inibição de HDAC2(7)(44); Doença de Huntington, distúrbio neurológico associado a actividade condicionada da CBP(45), alteração do BDNF(46)(25) e diminuída acetilação das histonas(32), tal como no caso da Síndrome de Rubinstein-Taybi, doença rara caracterizada por inúmeras anomalias físicas e propensão para o desenvolvimento de tumores cancerígenos.

Verificadas estas associações, existe um enorme potencial de uma ação terapêutica direcionada aos mecanismos epigenéticos envolventes que poderá vir a revelar-se revolucionária. No entanto, devido às limitações referidas, ainda existem barreiras científicas e experimentais a ultrapassar de modo a fazer do potencial uma realidade.

CONCLUSÃO: CÓDIGO GERAL

Recapitulando, de modo a originar um leque de diferentes tipos de células com recurso a material genético idêntico, as células têm de possuir a capacidade de expressar ou reprimir determinados genes por forma a conceber hepatócitos ou neurónios, por exemplo. Os programas de transcrição que ocorrem na diferenciação têm um enorme impacto no futuro das células, garantindo que as características de cada tipo de células se perpetuem após inúmeras divisões ou que, na ausência de divisão celular como no caso dos neurónios, as células tenham uma vida prolongada. A regulação de todo este processo que dita o funcionamento e a sobrevivência do organismo humano envolve mecanismos epigenéticos.

A base explicativa da criação e perpetuação desta memória celular adequa-se também à criação e manutenção da memória neuronal, com apoio na plasticidade sináptica e sinais externos ao organismo provenientes de atividade. Os processos requeridos para a consolidação de memória, como a LTP, iniciam programas complexos de transcrição de genes. Estes processos transcripcionais do SNC análogos aos envolvidos na memória celular estão também dependentes de regulação epigenética. A hipótese que defende que os processos envolvidos na criação de memória do SNC são um reflexo dos processos envolvidos na memória celular, assim como os mecanismos epigenéticos que as regulam, tem vindo a acumular cada vez mais evidências, tais como a dependência comum de cascatas de sinalização (como a MAPK/ERK), fatores de crescimento (como BDNF) e da ativação de fatores de transcrição críticos com ligações a promotores de genes específicos. Da mesma forma, mudanças na expressão génica causadas por atividade iniciam alterações nos processos de cognição e formação de memória.

Visto que a epigenética desempenha funções tão importantes e presentes em tantas localizações e vertentes da formação e manutenção de memória, a sua relação com intervenientes e processos previamente associados à memória é muito provável, como é o caso do fator de transcrição CREB, que possui reconhecida atividade na regulação da memória celular e cognitiva. O CREB fosforilado liga-se a locais, no promotor de genes, responsivos a cAMP e interage com a uma HAT, a CBP. Estas descobertas da analogia e homologia entre os processos de diferenciação celular e formação de memória, do envolvimento e efeito dos mecanismos epigenéticos em ambos os processos, a necessidade imperativa de plasticidade sináptica e a existência propostas consistentes para sua regulação e funcionamento iluminam, de certa forma, uma questão antiga, a razão pela qual os neurónios não possuem capacidade de divisão.

Os próprios mecanismos epigenéticos, para além da sua próxima relação com o ambiente e fisiologia do organismo, também possuem uma forte ligação e dependência entre si. Como visto, as modificações das histonas interagem umas com as outras por restrição ao acesso ou recrutamento de enzimas modificadores de histonas. E dada a função de proteínas como a MeCP2 na metilação do DNA e no recrutamento de HDACs, parece evidente que estas modificações têm algum grau de dependência entre si. Outra relação verificada entre as alterações das histonas e o DNA advém da possível reversão do défice de memória e plasticidade sináptica no hipocampo induzido por inibidores de DNMT a partir de um tratamento prévio com HDACis. Estas informações vão contra a existência de um código de histonas e um código de metilação do DNA individualizados e independentes um do outro. As modificações das histonas e a metilação do DNA não apresentam uma total independência entre si.

É também provável que os mecanismos epigenéticos atuem contribuindo para padrões de expressão génica temporalmente distintos, envolvidos na criação e persistência de memórias, também elas distintas, ao nível da sua duração. A Especificidade temporal da expressão génica e síntese proteica em determinadas regiões do cérebro é fundamental para a formação e persistência de memórias. Mudanças na expressão de proteínas com efeito na consolidação de memórias são fruto de eventos transcricionais com responsabilidades na formação dessas memórias. O processo de transferência de informação do hipocampo para o córtex está inteiramente dependente dos momentos em que ocorrem as mudanças na expressão génica ao nível do hipocampo. Um atraso na linha de processos de formação de memória no hipocampo pode assim originar uma deficiente ou inexistente consolidação de memória no córtex.

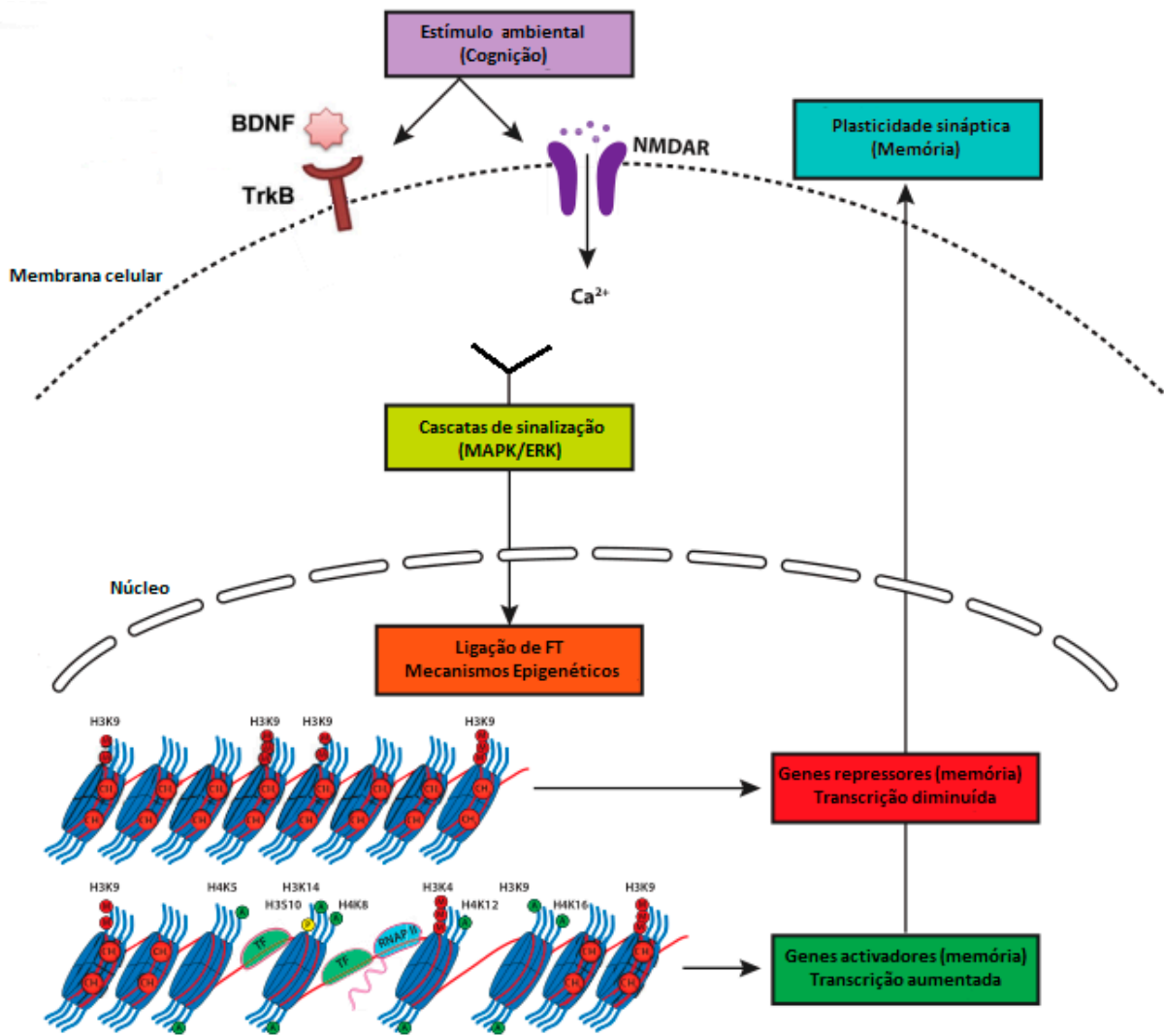


Fig. 4 - Panorama geral da rede de processos e mecanismos individuais cujo conjunto coordenado e altamente específico das suas ações resulta em modificações num mesmo princípio como o da plasticidade sináptica: Imagem adaptada.(18)(19)

Considerando toda a informação descrita, através de uma determinada perspectiva, a epigenética poderá ser vista como o último passo de uma longa, complexa e altamente específica cascata de eventos, direta ou indiretamente ligados e com variados graus de dependência entre si, que levam à transcrição de genes envolvidos na memória e cognição. Mas, curiosamente, este último passo poderá ter uma influência determinante em muitos dos restantes passos da longa cascata de eventos que resulta na transcrição dos genes relevantes ao tema desta monografia.

BIBLIOGRAFIA

1. MANSUY, Gr J, IM. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res.* (2008); 192:70–87.
2. FELSENFELD, G. A Brief History of Epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2014); 1–10.
3. KIM, D, DOBBIN, MM, TSAI L. Epigenetic Regulation of Gene Expression in Physiological and Pathological Brain Processes. *Physiol Rev.* (2011); 603–49.
4. PUCKETT, RE, LUBIN, FD. Epigenetic mechanisms in experience-driven memory formation and behavior. *Epigenomics.* (2011); 3(5):649–64.
5. WOLDEMICHAEL, BT, BOHACEK, J, GAPP, K, MANSUY, IM. Epigenetics of Memory and Plasticity. 1st ed. Vol. 122, *Prog Mol Biol Transl Sci.* (2014); 305-340.
6. HOFFMANN, A, SPENGLER, D. DNA Memories of early social life. *Neuroscience IBRO;* (2012); 264:64-75.
7. KRAMER, JM. Epigenetic regulation of memory : implications in human cognitive disorders. *Biomol Concepts.* (2013); 4(1):1–12.
8. LESLIE, B, July P. Epigenetics : Genome , Meet Your Environment. *The Scientist.* (2004).
9. RAKYAN, VK, PREIS J, MORGAN HD, WHITELAW E. The marks , mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. *Biochem J.* (2006); 102001:1–10.
10. VOGEL-CIERNIA, A. MAW. Neuron-specific chromatin remodeling: a missing link in epigenetic mechanisms underlying synaptic plasticity, memory, and intellectual disability disorders. *Neuropharmacology.* (2014); (949):18–27.
11. LEVENSON, JM, SWEATT, JD. Epigenetic mechanisms : a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. *Cell Mol Life Sci.* (2006); 63:1009–16.
12. DAY, JJ, SWEATT, JD. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron.* (2012); 70(5):813–29.
13. ADAMS, JP, SWEATT JD. Molecular Psychology: Roles for the ERK MAP Kinase Cascade in Memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (2002); 42:135-63..
14. LEVENSON, JM, SWEATT, JD. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci.* (2005); 6 (February): 108–18.
15. FRANKLAND, PW, BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci.* (2005); 119-30.

16. BARRETT, RM, WOOD, MA. Beyond transcription factors : The role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn Mem.* (2008); 460–7.
17. MILLER CA, SWEAT, JD. Article Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron.* (2007); 857–69.
18. ZOVKICK, IB, GUZMAN-KARLSSON, MC, SWEATT, JD. Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn Mem.* (2013); 61–74.
19. GUAN, J, XIE, H, DING, X. The role of epigenetic regulation in learning and memory. *Exp Neurol.* (2014); 268:30-6.
20. RUDENKO, A, TSAI, L. Epigenetic regulation in memory and cognitive disorders. *Neuroscience.* (2013); 264:51-63.
21. SWEATT, JD. The neuronal MAP kinase cascade : a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem.* (2001); 1–10.
22. LIPSKY, RH. Epigenetic mechanisms regulating learning and long-term memory. *Int J Dev Neurosci.* International Society for Developmental Neuroscience; (2012); 1–6.
23. BEKINSCHTEIN, P, CAMMAROTA, M, MEDINA, JH. Neuropharmacology Invited review BDNF and memory processing. *Neuropharmacology.* (2014); 5:1–7.
24. LEAL, G, COMPRIDO, D, DUARTE, CB. Neuropharmacology BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* (2013); (April):1–18.
25. COWANSAGE, KK, LEDOUX, JE, MONFILS, M. Brain-Derived Neurotrophic Factor : A Dynamic Gatekeeper of Neural Plasticity. *Curr Mol Pharmacol.* (2010); 12–29.
26. LU, B, NAGAPPAN, G, LU, Y. BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. *Handb Exp Pharmacol.* (2014); 223–50.
27. BEKINSCHTEIN, P, CAMMAROTA. M, IZQUIERDO, I, MEDINA JH, BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist.* (2007); 147-56.
28. GRAFF, J, TSAI, L. Histone acetylation : molecular mnemonics on the chromatin. *Nat Rev Neurosci.* Nature Publishing Group; (2013); 14(2):97–111.
29. MICHÁN, S, LI, Y, CHOU, MM, PARRELLA, E, LONG, JM, ALLARD, JS, SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci.* (2011); 30(29):9695–707.
30. MORRIS, MJ, KARRA, AS, MONTEGGIA, LM. Histone deacetylases govern cellular mechanisms underlying behavioral and synaptic plasticity in the developing and adult brain. *Behav Pharmacol.* (2011); 21:409–19.
31. SULTAN, FA, Day JJ. Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function. *Epigenomics.* (2012); 3(2):157–81.

32. PENNEY, J, TSAI, L. Histone deacetylases in memory and cognition. *Sci Signal.* (2014); 7(355):3–10.
33. JAROME, TJ, LUBIN FD. Histone lysine methylation : critical regulator of memory and behavior. *Rev Neurosci.* (2013); 24(4):375–87.
34. KOUZARIDES, T. Review Chromatin Modifications and Their Function. *Cell.* (2007); 693–705.
35. TURNER, BM, Group GE. Cellular Memory and the Histone Code. *Cell.* (2002); 111:285–91.
36. PEIXOTO, L, Abel T. The Role of Histone Acetylation in Memory Formation and Cognitive Impairments. *Neuropsychopharmacology.* Nature Publishing Group; (2012); 38(1):62–76.
37. BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* (2002); 6–21.
38. DAY, JJ, KENNEDY, AJ, SWEATT, JD. DNA methylation and its implications and accessibility for neuropsychiatric therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (2015); 591–611.
39. HEYWARD, FD, SWEATT, JD. DNA methylation in memory formation : Emerging insights. *Neuroscientist.* (2015); 21(5):475–89.
40. ROBERTSON, KD. DNA methylation and chromatin – unraveling the tangled web. *Oncogene.* (2002); 5361–79.
41. HURD, PJ, WOLF, D, NAN, X, BIRD, AP, KOUZARIDES, T. The Methyl-CpG-binding Protein MeCP2 Links DNA Methylation to Histone Methylation. *J Biol Chem.* (2003); 278(6):4035–40.
42. LANDRY, CD, KANDEL, ER, RAJASETHUPATHY, P. New mechanisms in memory storage : piRNAs and epigenetics. *Trends Neurosci.* (2013); 1–8.
43. LISTER, R, MUKAMEL, EA. Turning over DNA methylation in the mind. *Front Neurosci.* (2015); (July) 9:252.
44. RUDENKO, A, TSAI, L. Epigenetic modifications in the nervous system and their impact upon cognitive impairments. *Neuropharmacology.* (2014); 80:70-82
45. VECSEY, CG, HAWK, JD, LATTAL, KM, STEIN, JM, SARA, A, ATTNER, MA, et al. Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB *J Neurosci.* (2010); 27(23):6128–40.
46. MU, L, BEKINSCHTEIN, P, BEVILAGUA, LRM, MEDIN0A, JH. Article Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF-Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron.* (2007); 261–77.

ANEXO

Anexo 1 - HDACs dependentes de zinco: Tabela adaptada.(28)

Classes	Tipo	Localização predominante	Implicação no processo cognitivo
I	HDAC1	Núcleo	<ul style="list-style-type: none"> ● Facilita a extinção de memória. ● Aumentada após medo condicionado
	HDAC2	Núcleo	<ul style="list-style-type: none"> ● Constringe LTP, a memória espacial e a memória associativa em ratos tanto em cérebros saudáveis de como neurodegenerados ● Constringe EPSCs ● Diminuída após medo condicionado
	HDAC3	Núcleo e/ou citoplasma	<ul style="list-style-type: none"> ● Constringe a memória de localização de objectos ● Diminuída após medo condicionado
	HDAC8	Núcleo e/ou citoplasma	Não determinada
IIa	HDAC4	Núcleo e/ou citoplasma	<ul style="list-style-type: none"> ● A fracção citoplasmática constringe a memória termotóxica em <i>Caenorhabditis elegans</i> ● A perda de HDAC4 prejudica a LTP, a memória espacial e a memória associativa
	HDAC5	Núcleo e/ou citoplasma	<ul style="list-style-type: none"> ● Inibe LTF em <i>Aplysia californica</i> ● Aumentada em ratos modelo de esquizofrenia com défice de memória ● Diminuída após medo condicionado
	HDAC7	Núcleo e/ou citoplasma	Diminuída após medo condicionado
	HDAC9	Núcleo	CNV associada com défice cognitivo relacionado com a esquizofrenia
IIb	HDAC6	Citoplasma	Envolvimento pouco provável
	HDAC10	Núcleo e/ou citoplasma	Não foi determinada
IV	HDAC11	Núcleo	Aumentada após medo condicionado