

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ROSSANA ROSA PORTO

**PARTICIPAÇÃO DA HSP70 NOS PROCESSOS MNEMÔNICOS E SUA
INDUÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO COMO TRATAMENTO DE MODELO
DE ALZHEIMER**

Porto Alegre/RS

2018

ROSSANA ROSA PORTO

**PARTICIPAÇÃO DA HSP70 NOS PROCESSOS MNEMÔNICOS E SUA
INDUÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO COMO TRATAMENTO DE MODELO
DE ALZHEIMER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito final para a obtenção do título de doutora em Neurociências.

Orientador: Lucas de Oliveira Álvares

Co-orientador: Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

Orientador no exterior: R. M. Damian Holsinger

Porto Alegre/RS

2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, **Nadir** e **Wilson**, acima de tudo e todos, por acreditarem em mim, mesmo quando eu duvidava ser capaz, enxugando minhas lágrimas quando eu dizia que não ia conseguir. Neste momento, obrigada também pela frieza necessária em que disseram: "levanta essa cabeça, tu não lutou todos esses anos pra desistir agora!", que apenas disfarçava o amor incondicional que eu sempre buscava quando me sentia perdida. Obrigada por não me estimularem a casar, ter filhos e ser dona de casa, e sim a ser a melhor aluna da turma, a continuar estudando, a ser independente e conquistar sozinha todos os meus objetivos! Obrigada por também deixarem eu enfrentar os meus problemas, por não passarem a mão na minha cabeça quando eu estava errada, e acima de tudo, por me ensinarem a lutar com todas as forças pelos meus sonhos, mesmo que só eu acredite neles! Me fizeram forte, teimosa, persistente, sem deixar de ser amorosa e carinhosa! Obrigada por me ensinarem a ter orgulho da mulher que me tornei! Não existe nem nunca existiu na minha vida amor maior que esse!

Muito obrigada a toda minha **família** pelo amor e suporte, principalmente por entenderem a falta de tempo e a constante ausência. Um agradecimento especial à minha afilhada **Manuela**, que foi a minha maior fonte de energia, amor e carinho, te amo demais! Também à minha maior companheirinha, a **Luna**, minha cachorrinha, que literalmente ficou 24 h por dia ao meu lado nos momentos mais pesados, é meu anjinho de 4 patas.

Agradeço ao Professor **Lino Pinto de Oliveira Jr.**, o responsável pelo início da minha vida acadêmica, que me conquistou na minha primeira aula de biofísica, aos 16 anos, e imediatamente fez eu me apaixonar por neurônios e suas membranas excitáveis. Agradeço por acreditar no meu potencial, me pegar pela mão e me encaminhar com todo carinho ao encontro da ciência. Acima de tudo, obrigada pela amizade e por todo o apoio ao longo de todos esses anos! Te admiro demais meu mestre!

Muito obrigada ao Professor **Paulo Ivo Homem de Bittencourt jr.**, que foi muito mais do que meu co-orientador, pois abriu as portas de seu laboratório para uma menina que nem conhecia, já formada, sem nenhum conhecimento de fisiologia celular ou de qualquer técnica experimental. Você me deu todos os materiais necessários para fazer ciência, depois me desafiou, me fez correr atrás, e com isso, me fez cientista! Você me testa, e depois me prova todos os dias que eu sou melhor do que eu penso! Se eu me

tornei uma pesquisadora do c@\$%&#*, é devido ao tempo que pude partilhar de sua genialidade! Obrigado por todas as oportunidades e por tudo que me ensinou, onde destaco tua humildade.

Agradeço ao meu orientador, o Professor **Lucas de Oliveira Álvares**, por toda paciência comigo, pois sei que me orientar pode ter sido um desafio, além do assunto não ser bem o teu foco de estudo, eu não facilitei tua vida, pois sou teimosa e por vezes até dramática. Mas você sempre estava disponível para tudo que eu precisasse, obrigada por lutar sempre a meu favor e, principalmente, por me dar a honra de ser tua primeira doutora! Teu amor e dedicação pelo que faz é admirável, tenho muito orgulho de ser tua aluna! Você formou um grupo extremamente forte e competente em muito pouco tempo, pessoas que além de inteligentes, são criativas e com muita iniciativa, além de grandes amigos, e isso só reflete o teu trabalho e a tua pessoa.

Agradeço também à Professora **Denise Zancan**, o meu maior exemplo! Não existe palavras pra descrever minha admiração por essa professora, orientadora, coordenadora, mulher, pessoa! Tive a grande honra de ser tua aluna e orientanda e é por isso que posso afirmar que tu é a profissional mais competente, em todos os sentidos, que eu já conheci! Absolutamente tudo que tu faz é com 100% de dedicação! Tu fez neurofisiologia parecer simples e tornou neurobiologia dos invertebrados a disciplina mais linda que já vi! Meus olhos brilham instantaneamente quando tu abre a boca e começa a falar, que mulher maravilhosa! Às vezes eu penso que teu dia deve ter 30 ou mais horas! Nesses tempos que a Marvel faz sucesso com seus super heróis, tu é minha grande heroína e a profissional que eu sonho um dia ser. Obrigada por ser este modelo na minha vida!

Muito obrigada ao meu orientador no exterior, Professor **Damian Holsinger**, por me receber e também por aceitar o meu projeto, sem absolutamente nenhuma modificação. Obrigada por disponibilizar o seu laboratório e o seu tempo.

Agradeço também a todos os colegas que em algum momento me ajudaram durante o doutorado: ao **Thomas Burton**, que tantas vezes me salvou lá em Sidney, mas que acima de tudo foi um grande amigo e esteve ao meu lado quando me senti sozinha e desamparada. Agradeço ao **Fabício Dutra**, que foi muito importante no início do projeto, tanto no surgimento da pergunta quanto na execução dos primeiros experimentos. Obrigada ao **Bruno Popik**, **Mateus Silva**, **Mirelle Casagrande**,

Bárbara Cas e **Ana Paula Crestani**, vocês não ajudaram somente em uma cirurgia ou uma infusão, vocês colocaram um sorriso no meu rosto quando eu mais precisava, vocês tornaram dias difíceis em riso solto, vocês eram o motivo de eu querer ir pro laboratório mesmo que não tivesse experimento pra fazer. Eu tenho resistência para pedir ajuda, mas sei muito bem que vocês não hesitariam em oferecer auxílio, mesmo que fosse um final de semana com 10 treinos de extinção (tendo comida, né Mateus?! Posso dizer o mesmo da **Flávia Boos**, do **Jadier Redondo**, da **Ana Menegolla** e do **Josué Haubrich**, vocês foram muito mais do que colegas, são amigos que vou levar para a vida toda! Mesmo que longe, estarei sempre torcendo pelo sucesso de vocês! Ainda devo um agradecimento especial à **Dona Zelma**, nossa mãezona, da qual fui totalmente dependente para que meus experimentos se realizassem, não só pela sua fantástica organização, mas pela sua capacidade de solucionar problemas e acalmar as pessoas.

Do mesmo modo, agradeço aos meus colegas do laboratório de Fisiologia Celular, que apesar de não participarem diretamente nos experimentos do doutorado, foram essenciais na minha formação acadêmica. Ao professor **Maurício Krause**, por todas as oportunidades que me proporcionou, por confiar em mim e por todas as trocas de conhecimento. Que baita professor e orientador tu és! À **Cinthia Schöler**, que me recebeu com muito carinho e me ensinou o básico, desde pipetagem até eletroforese, mesmo quando corria com seus experimentos do mestrado. É uma pessoa forte, da qual admiro muito e também me espelho. Ao **Thiago Heck**, por jogar nas minhas mãos o encéfalo que "estava sobrando" e então me ajudar a descobrir meu amor por neurociências. Ao **Maciel Bruxel** e à **Patricia Bock**, grandes pesquisadores, que além de conhecimento, me proporcionaram boas risadas. Ao **Leandro Leal** e à **Helena Schroeder**, sempre disponíveis, mesmo em finais de semana e feriados, mesmo que fosse pra trocar 40 caixas de ratos, vocês são incríveis, como cientistas e como pessoas! À **Maria Inês Rodrigues** pela organização do laboratório, pelo ótimo apoio técnico e, principalmente, por nos tornar pessoas mais sociáveis e ajudar a fortalecer o grupo, com todas as festinhas e celebrações. À **Dona Ritinha**, por arrumar nossa bagunça, alimentar os mortos de fome e fazer parte da nossa família por tanto tempo, sempre presente nas datas importantes, dando apoio e carinho. A senhora é muito especial para todos que já passaram pelo FisCel. Obrigada ao meu eterno iniciador científico, **Ítalo Rakowski**, por toda ajuda e companheirismo, e mais ainda, por me dar a honra de te orientar neste período, tenho o maior orgulho de fazer parte da tua trajetória! À **Aline Bittencourt** e

Sofia Scomazzon, que são a prova de que o trabalho pode se tornar o seu maior e melhor passatempo. Com vocês do meu lado tudo fica divertido, cheio de gritos e abraços, do jeitinho que eu gosto de viver!

Agradeço imensamente pelas minhas colegas de curso **Ana Paula Crestani**, **Bruna Ferrary** e **Marina Marcolin**, por dividirmos todos os momentos de alegria e desespero desses 6 anos de pós-graduação. Sempre pude contar com vocês, e não foram poucas as vezes que corri pedindo ajuda, foram muitos skypes, mesmo quando tinha uma em cada canto do mundo, o amor e a ligação que temos nos unia através de continentes! Quando olhar pra trás, vocês vão ser a maior conquista da qual vou lembrar, o meu "P" mais significativo! Especialmente minha esposinha, **Ana**, que me aturou todos esses anos em casa e no laboratório, tu é tão incrível que não tem palavras pra te descrever! Tu foi a maior responsável por eu não desistir no meio do caminho, segurando minha mão e falando que ia ficar tudo bem, me aguentando falando sem parar quando tu chegava em casa cansada, e por vezes só por existir na minha vida! Sinto tua falta todos os dias!

Agradeço também a um amigo, que indiretamente, acabou sendo o grande responsável pelo melhor ano da minha vida: **Damien Warwick**, quem diria que uma noite de copa do mundo poderia mudar tanto a vida de alguém? Pois essa noite acabou sendo crucial na minha escolha da Universidade de Sidney para o doutorado sanduíche, onde eu conheceria grandes amigos como a **Cássia Gallas** e **Aline Maciel**, minhas gêmeas, minhas melhores amigas, mesmo com a distância de um mundo entre nós, afinal, ela só é física! A **Ingrid Grazziotin**, a beleza mais ogra que estive ao meu lado nos momentos mais alegres e também nos mais tristes. A **Marcela Dal Corso**, que me fez acreditar em amor verdadeiro novamente. A **Luna Collacchi** e o **Feng Xue**, italiana e chinês que se tornaram meus irmãos mais brasileiros, que me fizeram sorrir todos os dias. A **Andrezza Rodrigues**, **Elisa Struecker** e **Sara Maciel**, minhas parceiras de funk, sertanejo, conversas constrangedoras e de abraços bem apertados! Não foi o lugar, foram vocês que tornaram Sidney a minha nova casa! Guardo cada um no coração, aonde quer que eu vá.

Agradeço à uma pessoa que me ajudou a manter a sanidade nesse processo, a colocar a cabeça no lugar, a enxergar as coisas com clareza e me conhecer muito melhor ao longo desses anos, minha psicóloga **Rafaela Ethos**. Obrigada por sempre estar disponível, fazendo muito além do seu trabalho, me atendendo mesmo do outro lado do mundo.

Por fim, agradeço ao **Programa de Pós Graduação em Neurociências da UFRGS**, por me dar a oportunidade de fazer o que eu mais amo, por me ajudar a crescer como cientista, pelos professores fantásticos, e conseqüentemente, pelas ótimas disciplinas ofertadas. Tenho muito orgulho de fazer parte deste PPG. Obrigado também à **CAPES** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro que proporcionou todas essas conquistas ao longo dos anos.

EPÍGRAFE

“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existence. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day”.

Albert Einstein

RESUMO

Proteínas de choque térmico da família de 70 kDa (HSP70) são chaperonas moleculares citoprotetoras que estão presentes nas células neuronais e podem ser induzidas por uma variedade de insultos estressantes, mas também pela atividade sináptica, incluindo tarefas de aprendizado. Estímulos fisiológicos que induzem a formação de memória de longo prazo também são capazes de estimular a síntese de HSP70 através da ativação de seu fator de transcrição. Além disso, já foi demonstrado que a HSP70 está envolvida na estabilização de microtúbulos e também na degradação da proteína β -amiloide e, por esse motivo, vem sendo estudada como alvo terapêutico na doença de Alzheimer. Neste estudo, investigamos a influência da HSP70 nos processos relacionados à memória e sua indução através do tratamento de choque térmico como potencial alvo terapêutico nos déficits cognitivos relacionados à doença de Alzheimer. Primeiramente, utilizamos ratos machos, que foram treinados na tarefa de condicionamento aversivo contextual (CAC) e então o conteúdo de HSP70 foi analisado por western blot no hipocampo em diversos tempos após o treino e após reativação de curta ou longa duração. Observamos elevações rápidas e transitórias da HSP70 60 min depois do treino. Imunofluorescência com dupla marcação de GFAP e HSP70 revelou que os astrócitos não foram os responsáveis pela indução da HSP70 pelo aprendizado. A distribuição de HSP70 foi marcadamente ao redor das sinapses entre colaterais de Shaffer e células piramidais da região CA1. Do mesmo modo, a reativação, tanto de curta como longa duração, foi capaz de elevar os níveis desta proteína no hipocampo dorsal, com pico ainda mais rápido, em apenas 30 min. Esta elevação foi ainda mais significativa quando uma novidade foi incorporada durante a reativação. O choque utilizado não interferiu na indução de HSP70, pois não foi diferente do grupo apenas reativado. A infusão de HSP70 recombinante (hspa1a) no hipocampo dorsal imediatamente após o treino facilitou a consolidação da memória e aumentou a atividade ERK, diminuindo a atividade da JNK e p38 hipocampais. O bloqueio da HSP70 extracelular endógena através da administração de anticorpo específico não produziu nenhum efeito adicional na consolidação da memória quando aplicada imediatamente após o treinamento, sugerindo que ela está de fato atuando intracelularmente. Infusão de rHSP70 imediatamente após reativação não alterou os valores de freezing quando testado 2 dias depois. Utilizando camundongos 5XFAD, modelo severo da doença de Alzheimer, verificamos a capacidade da HSP70 em modificar parâmetros comportamentais, induzida a partir de terapia com choque térmico, a fim de minimizar os prejuízos encontrados na doença de Alzheimer. Dois meses de tratamento, iniciado aos 3 ou 8 meses de idade, foi capaz de melhorar a memória de reconhecimento de objetos, a memória de condicionamento aversivo ao contexto, e também proteínas relacionadas à plasticidade no hipocampo e córtex pré-frontal. Melhoras no comportamento do tipo ansioso, que são reduzidos em fêmeas 5XFAD, também foi normalizado pelo tratamento quando avaliado aos 10 meses de idade. Não houve alterações nos níveis totais de NF- κ B e na ativação de GSK3, tanto no hipocampo quanto no córtex pré frontal. A HSP70 mostrou ser importante nos processos relacionados à memória, sendo capaz de ser induzida rapidamente após aprendizado e reativação do mesmo, o que poderia ser uma indicação de que a tarefa está sendo dominada e pode ser uma boa ferramenta para ser utilizada como um índice de aprendizado. Além disso, o tratamento de choque térmico, através da utilização de sauna infravermelha, mostrou que a indução de HSP70 é capaz de melhorar parâmetros cognitivos da doença de Alzheimer que atualmente não possuem tratamento efetivo.

ABSTRACT

Heat shock proteins of 70 kDa (HSP70) are cytoprotective molecular chaperones that are present in neuronal cells and can be induced by a variety of stressful insults, but also by synaptic activity, including learning. The physiological stimuli that induce long-term memory formation is also capable of stimulating the synthesis of HSP70 through the activation of its transcription factor. In addition, it has been shown that HSP70 is involved in the stabilization of microtubules and also in the degradation of β -amyloid protein, and for this reason, it has been studied as a therapeutic target in Alzheimer's disease. In our study, we investigated the influence of HSP70 in the processes related to memory and its induction by heat shock as a potential therapeutic target in the cognitive deficits related to Alzheimer's disease. Firstly, male rats were trained in the contextual fear conditioning (CFC) and then the HSP70 content was analyzed by western blot in the hippocampus after training and after reactivation of short or long duration. We observed rapid and transient elevations of HSP70 60 min after training. Immunofluorescence with double labeling of GFAP and HSP72 showed that astrocytes were not responsible for the induction of HSP72 by learning. The distribution of HSP72 was markedly surround the synapses between the Shaffer collateral and pyramidal cells of the CA1 region. Likewise, reactivation, at short or long duration, was able to raise the levels of this protein in the dorsal hippocampus, even more rapidly, in just 30 min. This elevation was even more pronounced when a novelty was incorporated during reactivation. The shock did not interfere in the induction of HSP70, since its content was not different from the group that was only reactivated. Infusion of recombinant HSP70 (hspa1a) in the dorsal hippocampus immediately after training facilitated memory consolidation and increased ERK activity, decreasing JNK and p38 activity in the hippocampus. Blocking extracellular endogenous HSP70 through the administration of specific antibody did not produce any additional effect on memory consolidation when used immediately training, suggesting that it is actually acting intracellularly. Infusion of rHSP70 immediately after reactivation did not change the freezing levels when tested 2 days later. Using 5XFAD mice, a severe model of Alzheimer's disease, we tested the ability of HSP70 to modify behavioral parameters, induced by heat shock therapy, in order to minimize the damages found in Alzheimer's disease. Two months of treatment, initiated at 3 or 8 months of age, were able to improve object recognition memory, context fear conditioning memory, and also enhance plasticity-related proteins in the hippocampus and prefrontal cortex. Improvements in anxious-like behavior, which are reduced in females 5XFAD, were also reversed by treatment when evaluated at 10 months of age. There were no changes in total NF- κ B levels and in GSK3 activation in both the hippocampus and the prefrontal cortex. HSP70 has been shown to be important in memory-related processes, being induced quickly after learning and reactivation, which could be an indication that the task is being mastered and can be a good tool to be used as a learning index. In addition, heat shock treatment through the use of an infrared sauna showed that the induction of HSP70 is able to improve cognitive parameters of Alzheimer's disease that have no currently effective treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS

17-AAG.....	17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamicina
DA.....	Doença de Alzheimer
ADP.....	Difosfato de adenosina
AMPA.....	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico ácido
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF.....	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CA1.....	Corno de Ammon 1
CA2.....	Corno de Ammon 2
CAMKIV	Proteína quinase IV dependente de cálcio e calmodulina
CAMKII	Proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina
cAMP.....	Monofosfato de adenosina cíclico
CAC.....	Condicionamento aversivo ao contexto
CFTR.....	Regulador de condutância transmembrana de fibrose cística
CRE.....	Elementos responsivos ao cAMP
Csp	Proteína de sequência de cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGR-1.....	Proteína de resposta rápida ao crescimento - 1
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
GluR.....	glutamate receptor
GSK3	Glicogênio sintase quinase
HSC70.....	Proteína de choque térmico constitutiva de 70 kDa
HSE	Elemento Regulador de Choque Térmico
HSF	Fator de Choque Térmico
HSP	Proteínas de Choque Térmico
HSP27.....	Proteína de choque térmico de 27 kDa
HSP40.....	Proteína de choque térmico de 40 kDa
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
HSP72	Proteína de choque térmico de 72 kDa
HSP73	Proteína de choque térmico de 73 kDa
HSP90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
HSP110	Proteína de choque térmico de 110 kDa

HSR	Resposta ao choque térmico
IDE.....	Enzima que degrada insulina
JNK	c-Jun NH(2)-terminal quinase
LTD.....	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAPK.....	Proteína quinase ativada por mitógenos
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NMDA.....	N-metil D-aspartato
p-ERK.....	ERK fosforilada
p-JNK.....	c-Jun NH(2)-terminal quinase fosforilada
PBS.....	Tampão Salina tamponada com fosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA.....	Proteína quinase A
PKB	Proteína quinase B
PKC.....	Proteína quinase C
rHSP70.....	Proteína de choque térmico de 70 kDa recombinante
SNARE.....	Receptor de proteína de ligação ao fator sensível ao N-etilmaleimida solúvel
TGF-β1.....	Fator de crescimento transformador β1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bases moleculares da formação da memória.....	19
Figura 2. Processos mnemônicos decorrentes do aprendizado	21
Figura 3. Atividade de chaperona da HSP70 através do seu domínio ATPase.....	23
Figura 4. Ativação da síntese de HSP70	24
Figura 5. Mecanismos de ação da proteína HSP70 na sinapse	26
Figura 6. Mecanismos protetores da HSP70 na DA.....	32
Figura 7. Imunodeteção de HSP70 após curta reativação.	55
Figura 8. Imunodeteção de HSP70 após longa reativação.	56
Figura 9. Imunodeteção de HSP70 1 h após diferentes reativações.....	58
Figura 10. Infusão de rHSP70 após curta reativação.	60
Figura 11. Infusão de rHSP70 após longa reativação.	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Memória	16
1.2 Proteínas de choque térmico	21
1.3 HSP70 no Sistema Nervoso Central.....	24
1.4 HSP70 e memória	28
1.5 HSP70 e Alzheimer	30
2. OBJETIVOS	34
Capítulo I.....	34
Objetivo Geral.....	34
Objetivos Específicos	34
Capítulo II	34
Objetivo Geral.....	34
Objetivos Específicos	35
Capítulo III.....	35
Objetivo Geral.....	35
Objetivos Específicos	35
3. CAPÍTULO I.....	37
4. CAPÍTULO II	49
4.1. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1.1. Animais	49
4.1.2. Procedimentos Cirúrgicos	49
4.1.3. Infusão Intracerebral	51
4.1.4. Drogas	51
4.1.5. Condicionamento Aversivo Contextual (CAC)	51
4.1.6. Imunodeteção de proteínas	52
4.1.7. Análise Estatística	53
4.2. RESULTADOS.....	54
4.2.1. Reativação eleva rapidamente o conteúdo de HSP70 no hipocampo.....	54
4.2.2 Novidade durante reativação induz níveis mais elevados de HSP70 no hipocampo .	57
4.2.3. Infusão de rHSP70 após reativação não induz modificações na reconsolidação	59
5. CAPÍTULO III	61
6. DISCUSSÃO GERAL	96
7. CONCLUSÕES.....	109
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
APÊNDICE	120

1. INTRODUÇÃO

1.1. Memória

A memória pode ser definida como a capacidade de armazenar e posteriormente evocar informações adquiridas a partir de experiências. Este primeiro momento, onde ocorre a aquisição de conhecimentos, é definido como aprendizagem. Esses processos estão acontecendo constantemente, o que nos dá a capacidade de, baseado nas experiências prévias, repetir ou variar as respostas comportamentais de maneira a otimizá-las (Kandel et al., 2014). Sendo assim, a memória é uma capacidade crítica para a sobrevivência de todos os animais, ao mesmo tempo que se torna a base biológica da nossa individualidade, definindo nossa personalidade e o modo como interagimos com o mundo.

O substrato físico da memória é definido como engrama, introduzido a mais de 100 anos atrás por Richard Semon (1921). Engrama são modificações persistentes no encéfalo que resultam de uma experiência ou evento específico. Envolve o fortalecimento de conexões sinápticas entre populações de neurônios que estão ativos durante o aprendizado, o que aumenta a probabilidade de que este conjunto de neurônios sejam ativados com o mesmo padrão novamente (reativação) (Josselyn et al., 2015).

O primeiro a obter evidência de que os processos mnemônicos podiam estar localizados em regiões específicas no encéfalo foi o neurocirurgião Penfield. Em seus estudos, ele verificou que estimulações elétricas aplicadas no lobo temporal eram suficientes para induzir a reativação de experiências vividas anteriormente (Penfield, 1958). Resultados mais convincentes emergiram com pacientes que tiveram o lobo temporal retirado cirurgicamente para tratamento de epilepsia. Um estudo de caso especialmente importante foi o do paciente Henry Molaison (H.M.), que desenvolveu epilepsia refratária a medicamentos após um acidente na infância e suas crises intensificaram-se ao longo dos anos, impedindo que ele tivesse uma vida normal. Seu médico, William Scoville, optou pela retirada bilateral da região geradora das crises, que incluiu o hipocampo, amígdala e áreas adjacentes do lobo temporal medial. Depois da cirurgia, o paciente apresentou melhoras no quadro clínico, mas como efeito colateral se observou um grande prejuízo na formação de novas memórias (amnésia anterógrada),

além de amnésia retrógrada para memórias recentes, preservando a capacidade de formar memórias de procedimentos (Scoville & Milner, 1957).

Estes estudos foram essenciais para a classificação de memórias quanto à natureza de informação codificada e quanto ao tempo que ela pode persistir. A principal distinção dentre os tipos de memória se dá entre memórias declarativas e não-declarativas, também chamadas de explícitas e implícitas, respectivamente. As memórias explícitas são dependentes de estruturas como o hipocampo e o neocórtex e são facilmente formadas, mas também facilmente esquecidas, além de serem conscientemente evocadas. Já as memórias implícitas requerem a atividade de estruturas como o cerebelo e os núcleos da base e são formadas gradualmente, mas dificilmente são esquecidas; elas são consideradas difíceis de declarar, já que são relacionadas a habilidades motoras ou hábitos (Kandel et al., 2014).

Os indivíduos estão constantemente recebendo e processando informações sensoriais, mas apenas uma parcela delas é armazenada, o que é importante e inclusive benéfico, permitindo ao indivíduo realizar generalizações, evitando uma sobrecarga nos sistemas relacionados à memória. A intensidade e duração da memória é muito variável, sendo determinada pela importância da informação e o grau de atenção e emoção envolvidos no momento da aquisição (Dudai & Morris, 2013; Kandel et al., 2014; Katche et al., 2013). O tipo mais breve de memória, chamado de memória de trabalho, tem curtíssima duração, de segundos a poucos minutos, e é mantido pela atividade do córtex pré-frontal, sem criar um traço duradouro no encéfalo. As memórias de curta duração perduram por minutos até cerca de 6 horas, mantendo as informações disponíveis para serem evocadas enquanto uma memória de longa duração ainda não foi formada. Já as memórias de longa duração persistem por dias, anos ou mesmo décadas, dependendo de fatores como a sua relevância e valência emocional.

A memória não é formada instantaneamente, sendo necessária uma complexa sequência de eventos neurobiológicos para formação de um traço permanente (Alberini et al., 2006). Após um aprendizado, o traço de memória gradualmente progride de um estado inicial lábil e instável, onde tais processos ainda estão em andamento, para um estado fixo e estabilizado, que permite seu armazenamento. Este fenômeno foi definido por Müller & Pilzecker (1900) como consolidação da memória. O fato deste processo ser lento serve como uma função adaptativa, permitindo que processos endógenos ativados por uma experiência modulem a força da memória, podendo sofrer interferência durante esta janela (McGaugh, 2000).

Este processo de consolidação depende da ativação de quinases, fatores de transcrição, aumento da expressão gênica e síntese proteica na célula neuronal pós-sináptica (Abel & Lattal, 2001; Izquierdo et al., 2006). Uma das vias mais importantes para a formação da memória (Figura 1) é a ativação das proteínas quinases pela sinalização do receptor de glutamato que leva à ativação da CREB (proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP), um fator de transcrição responsável pela ativação de diferentes genes envolvidos na consolidação da memória (Izquierdo et al., 2006; Suzuki et al., 2011). Entre essas quinases, a família da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) ocupa uma posição crítica. As MAPKs são divididas em três subfamílias diferentes, incluindo as quinases reguladas pelo sinal extracelular (ERK), as quinases amino-terminais c-Jun (JNK) e a p38-MAPK (Seger & Krebs, 1995). A JNK mostrou ser um regulador negativo da aprendizagem associativa e, ao lado da p38, está envolvida na plasticidade sináptica, induzindo a depressão de longo prazo (LTD) (Moult et al., 2008; Sherrin et al., 2010; Sherrin et al., 2011). Alternativamente, o aumento dos níveis de AMPc e Ca^{2+} na célula pós-sináptica aumenta a atividade de PKA (proteína quinase A) e PKC (proteína quinase C), respectivamente, levando à ativação de ERK, fosforilação de CREB e iniciação da transcrição de vários genes (Alberini et al., 2009; Johansen et al., 2011; Kandel, 2012; Roberson et al., 1999). Um membro da família de 70 kDa de proteínas de choque térmico, HSP70 (HSPA1A), é um gene alvo potencial devido à presença de um motivo CRE em sua região promotora que pode ser ativado por CREB (Choi et al., 1991; Murshid et al., 2010).

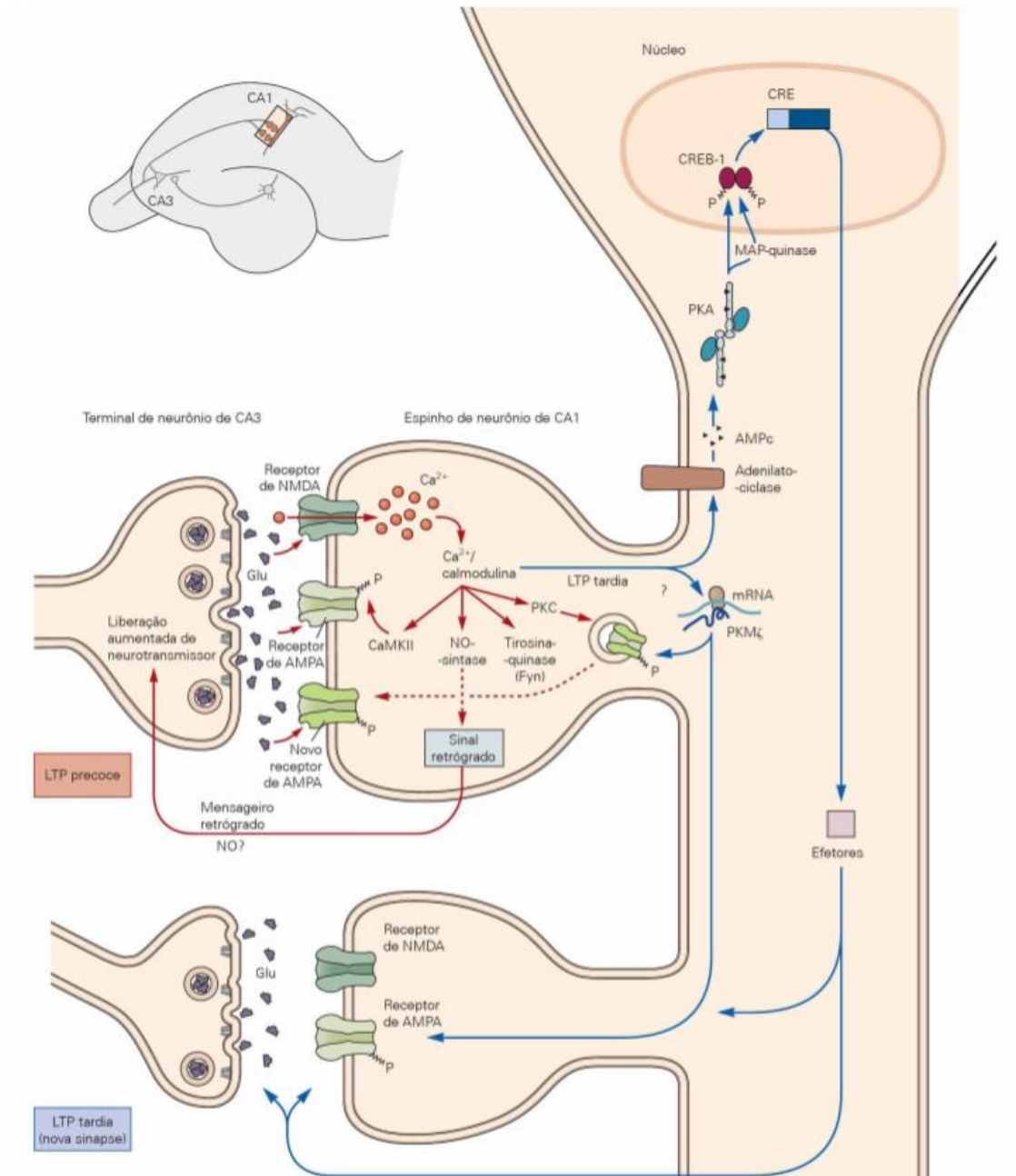


Figura 1. Bases moleculares da formação da memória. Ativação de receptores glutamatérgicos na célula pós sináptica causa influxo de cálcio, que ativa proteínas quinases, dentre elas a MAPK, que fosforila CREB e induz expressão de novas proteínas (Kandel, 2014).

Difícilmente formamos uma nova memória sem influências de alguma experiência previamente adquirida. Ao evocarmos essas informações prévias, acabamos por influenciar a forma com que interpretamos novos eventos, e consequentemente, como consolidamos novas memórias. Pavlov (1927) mostrou que ao evocar uma memória prévia condicionada e perceber que esta não prediz mais uma consequência,

uma nova memória é formada com um significado oposto, reduzindo as respostas condicionadas e inibindo a memória inicial. Este processo não envolve modificação da memória do primeiro aprendido, mas sim a formação de um novo traço inibitório, que chamamos de memória de extinção. Essas informações são conflitantes por natureza e não podem ser expressas concomitantemente, o que acontece é que a resposta condicionada inibida pela memória de extinção volta a se expressar com o passar do tempo (Rescorla, 2004).

A evocação da memória é um processo ativo, que necessita de síntese proteica e que pode causar desestabilização da memória anteriormente adquirida, tornando-a lábil novamente e suscetível a interferências (Lopez et al., 2015). Este fenômeno é chamado de reconsolidação, processo no qual o traço original da memória pode ser modificado, atualizando, prejudicando ou apenas reestabelecendo a memória original de maneira que esta seja fortalecida (Figura 2). A função biológica da reconsolidação parece ser de fortalecer memórias mais fracas, quando reativadas repetidamente. Memórias mais fortes são mais difíceis de desestabilizar durante reativação e conseqüentemente mais resistentes à interferências (Casagrande et al., 2018; Winters et al., 2009). O fato de a reconsolidação permitir modificações permanentes no traço de memória a tornou um grande alvo terapêutico para memórias mal adaptativas, como as de medo extremo no transtorno do estresse pós-traumático, ou as de atração intensa, como no abuso de substâncias. Ao reativar essas memórias, podemos modificar o seu componente indesejável afim de ressignificá-las (Piñeyro et al., 2013).

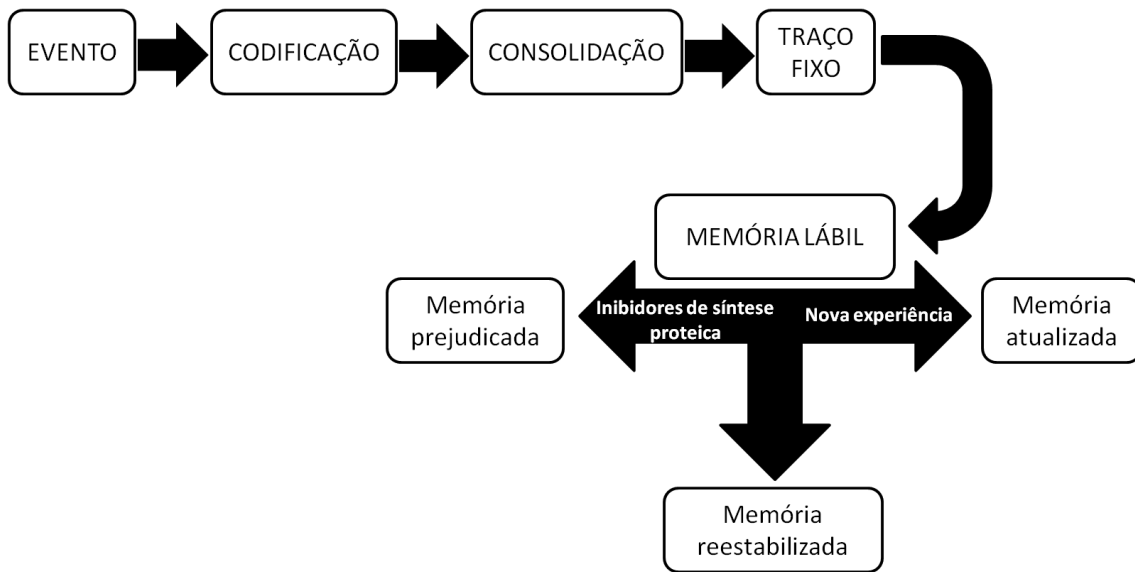


Figura 2. Processos mnemônicos decorrentes do aprendizado e modificações possíveis da memória já consolidada a partir de processos de reconsolidação (modificada de Nadel et al., 2012).

A consolidação e a reconsolidação compartilham diversos mecanismos similares, como a ativação de proteínas quinases e consequente ativação de CREB (Lee et al., 2004). Entretanto, apesar da síntese de BDNF ser necessário para a consolidação, não é para a reconsolidação, enquanto que o fator de transcrição Zif268 é recrutado na reconsolidação mas não na consolidação (Lee et al., 2004). Portanto, a reconsolidação é um processo neurobiológico distinto da consolidação, apesar de ambos apresentarem similaridades.

1.2 Proteínas de choque térmico

Todos os organismos respondem à altas temperaturas com a indução de proteínas de choque térmico (do inglês, *heat shock proteins*, HSP), sistema genético mais conservado que se tem conhecimento (Lindquist & Craig, 1988). As HSP foram altamente conservadas ao longo da evolução das espécies, encontradas em organismos eucarióticos e procarióticos, o que mostra a importância do seu papel nos processos fisiológicos. Foram descobertas em 1962, pelo surgimento de um novo padrão de espessamento cromossomal em células de glândulas salivares de *Drosophila busckii* quando expostas acidentalmente a altas temperaturas (Ritossa, 1962).

As HSP podem ser divididas em famílias, de acordo com suas massas moleculares. A família mais conservada e estudada é a com peso molecular de aproximadamente 70 kDa (HSP70), que é principalmente dividida em duas formas: a

constitutiva de 73 kDa (HSC70 ou HSP73), que está presente na maioria das células e é induzida somente de maneira moderada em resposta a estresse (Asea, 2005), e a induzível de 72 kDa (HSP70 ou HSP72), que está presente em pequenas quantidades em níveis basais, mas pode ser rapidamente sintetizada em resposta à estresse (Kiang & Tsokos, 1998).

Sua principal função é de chaperona molecular, sendo capaz de reconhecer e interagir com outras proteínas, auxiliando na sua translocação para organelas alvo, no dobramento correto de proteínas nascentes, evitando assim interações inapropriadas e formação de agregados proteicos. A HSP70 também reconhece e se liga a resíduos hidrofóbicos expostos de proteínas deformadas ou desnaturadas, que são acompanhadas para ubiquitinação, e posteriormente direcionadas ao proteossoma para degradação, participa da autofagia e regula a função de receptores esteroides (Akerfelt et al., 2010). A HSP70 é induzida em situações de estresse, prevenindo agregação e mutação de proteínas, além de ter efeito citoprotetor por ser anti-inflamatória (principalmente por bloquear o fator de transcrição NF- κ B e a via da JNK), antiapoptóticas (reduzindo liberação de citocromo-c) e defender o organismo contra o estresse oxidativo e privação de glicose e de oxigênio (Lee et al., 2001; Matsumori et al., 2006). Quando uma célula é exposta a um insulto subletal, causando elevações na expressão desta proteína, um posterior insulto mais severo não causa tantos danos, devido ao efeito protetor da HSP70, o que é associado ao fenômeno de tolerância (Lee et al., 2001).

A HSP70 possui um fragmento N-terminal de 44 kDa que contém um domínio ATPase e um fragmento C-terminal de 28 kDa que contém o domínio de ligação de peptídeos. A ligação do ATP ao domínio de ligação ao nucleotídeo promove uma alteração conformacional que inicia um contato de baixa afinidade com o substrato. A hidrólise do ATP para ADP causa um fechamento do domínio de ligação, iniciando um contato de alta afinidade com o substrato (aumento de 10 vezes, Figura 3). Quando o ADP é trocado por ATP por um fator de troca de nucleotídeo acessório, há novamente mudança na sua conformação e o substrato é liberado (Mayer, 2013; Mayer et al., 2000).

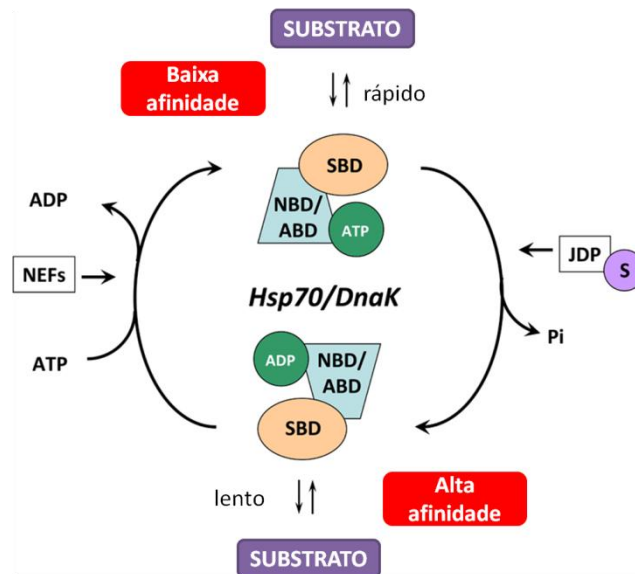


Figura 3. Atividade de chaperona da HSP70 através do seu domínio ATPase. Ligado ao ATP, o complexo possui baixa afinidade pelo substrato, mas ao ser hidrolisado, o complexo HSP70 : ADP inicia um contato de alta afinidade com o substrato, que só é liberado com auxílio de fatores de troca de nucleotídeos (NEFs).

As HSPs respondem a estressores e situações clínicas que causam distúrbio na forma terciária das proteínas e efeitos adversos no metabolismo, como hipoglicemia e hiperglicemia (De Maio, 1999). Diversos outros estímulos fisiológicos, patológicos e ambientais são capazes de induzir a expressão destas proteínas, como metais pesados, infecção microbiana, inflamação, isquemia, óxido nítrico, estresse oxidativo, hormônios, antibióticos, estimuladores da PKC e de Ca^{2+} (Kiang & Tsokos, 1998).

A regulação da resposta ao estresse (Figura 4) é mediada pelo fator de choque térmico (HSF), um fator de transcrição que liga-se ao seu elemento regulador de choque térmico (HSE) presente em todos os genes promotores. Em condições normais, o HSF está presente na célula na forma de monômero, ligado à HSP70. Entretanto, em condições estressantes, a HSP70 libera o HSF, que sofre fosforilação e trimerização e adquire alta afinidade pelo DNA, se ligando no HSE e aumentando a expressão gênica da proteína de choque térmico (Orosz et al., 1996; Akerfelt et al., 2010).

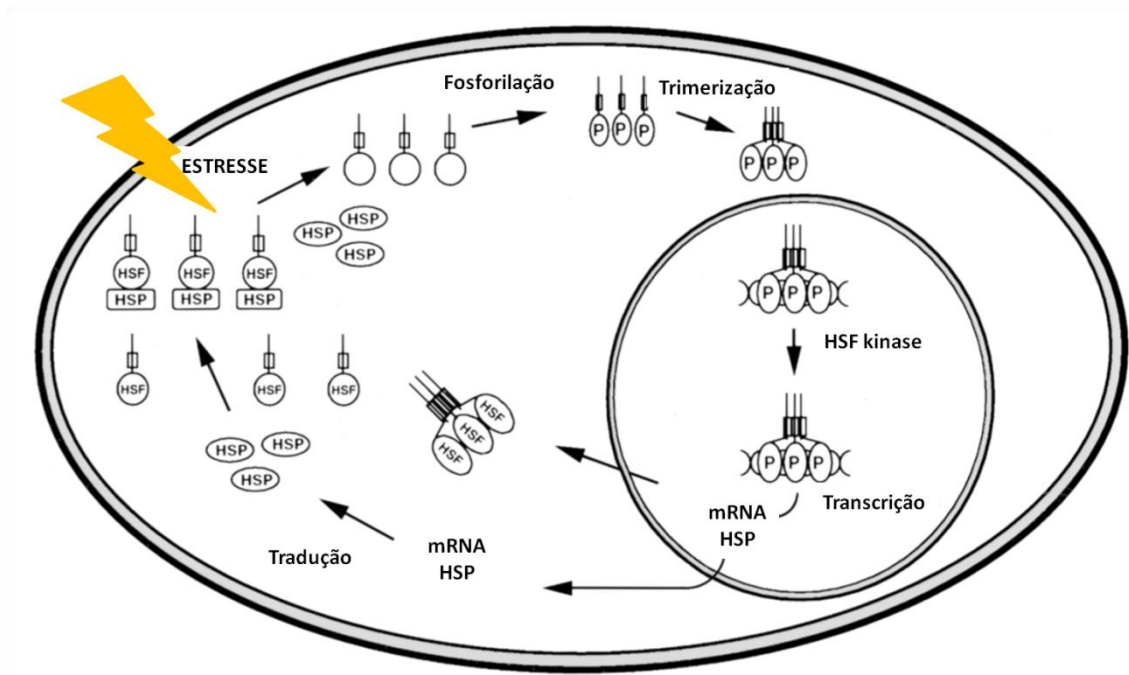


Figura 4. Ativação da síntese de HSP70. Em estado de repouso, o Fator de choque térmico 1 (HSF1) é um monômero no citoplasma e no núcleo, sendo uma fosfoproteína mesmo em situações não estressantes que interage com a HSP70, ficando inativo. Durante o estímulo estressor, o HSF1 se dissocia do complexo das proteínas de choque térmico, permitindo que este seja fosforilado e trimerizado e se ligue aos elementos responsivos ao estresse (HSE) nos genes da HSP70, aumentando seu mRNA e expressão proteica (Kiang & Tsokos, 1998).

1.3 HSP70 no Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central possui uma grande variedade celular, que mostram diferentes suscetibilidades a situações de estresse. Após choque térmico, observou-se em encéfalos de ratos, que as células da glia eram capazes de expressar de 3 a 30 vezes mais HSP72 que os neurônios, e que os neurônios menores expressavam 2 a 12 vezes mais HSP72 que os neurônios maiores, mostrando uma dependência de tipo e tamanho celular na expressão desta proteína (Morrison-Bogorad et al., 1994). Ainda não se sabe ao certo os mecanismos envolvidos, mas evidências apontam para diferenças na ligação do fator de transcrição ao DNA, que apesar de ter uma ativação mais tardia em cultura de neurônios corticais de ratos, está é mais prolongada do que em cultura cortical de astrócitos (Nishimura & Dwyer, 1996). Além disso, os neurônios que são capazes de

sintetizar a forma induzível da HSP70, parecem utilizar mecanismos pós transcricionais, não envolvendo o HSF1, como por exemplo uma forma constitutiva de proteína quinase tipo IV dependente de cálcio e calmodulina (CAMKIV), que é capaz de induzir robusta elevação de HSP70 em motoneurônios (Taylor et al., 2007).

Células pós-mitóticas, como os neurônios, são particularmente vulneráveis ao estresse e ao efeito prejudicial de proteínas desdobradas e/ou agregadas porque não podem diluir moléculas potencialmente tóxicas através da divisão celular. Essa falha da capacidade funcional das chaperonas moleculares com consequente acúmulo de proteínas desdobradas nos neurônios e em outras células, acontece ao longo do envelhecimento, concomitante com um declínio da atividade do proteassoma (Calderwood et al., 2009).

HSP73 foi detectada em neurônios indiferenciados e diferenciados de humanos e de roedores (Chow & Brown, 2007). Já foi demonstrado que neurônios motores na medula espinhal de ratos apresentam altos níveis de HSP73 em comparação com os neurônios dopaminérgicos da substância negra, enquanto os neurônios do córtex entorrinal e do hipocampo demonstram valores ainda mais baixos dessa proteína constitutiva. A localização neuronal dessa forma constitutiva foi detectada nas frações sinápticas derivadas de animais sem estresse, sugerindo que elas desempenham papéis na função sináptica normal (Bechtold et al., 2000).

Uma de suas funções na sinapse que está bem caracterizada é a remoção da cobertura de clatrina nas vesículas sinápticas (Figura 5A). Esse processo acontece com a ajuda de um co-fator, a proteína auxilina, que se liga na clatrina e recruta a HSP73 na presença de ATP. A HSP então se liga à proteína clatrina, hidrolizando ATP e formando um complexo estável com ADP, permanecendo associado à proteína mesmo após desfazer o revestimento da vesícula, para evitar sua polimerização (Ungewickell et al., 1995). Quando solicitada para endocitose, a clatrina é liberada da HSP73 por um fator de troca de nucleotídeo, cuja atividade pode ser regulada por desfosforilação dependente de Ca^{2+} (Sousa et al., 2016). O bloqueio desta ligação entre auxilina e HSP73 é capaz de inibir a transmissão sináptica no axônio de lula gigante (Lu et al., 2010).

Foi demonstrado também que a HSP73 também se associa com a syntaxina e promove a sua incorporação no complexo SNARE, o que é crítico para a liberação de neurotransmissores, sendo que esta é necessária para a fusão de vesículas e exocitose (Swayne et al., 2006). Na região pós sináptica, a HSP70 pode estar implicada também no tráfego de canais e receptores para a superfície da membrana (Figura 5B), como já

visto com o canal de cloreto transmembrana regulador de condutância da fibrose cística (CFTR), que tem papel crucial na manutenção do balanço iônico e hidratação de superfícies epiteliais (Young, 2014).

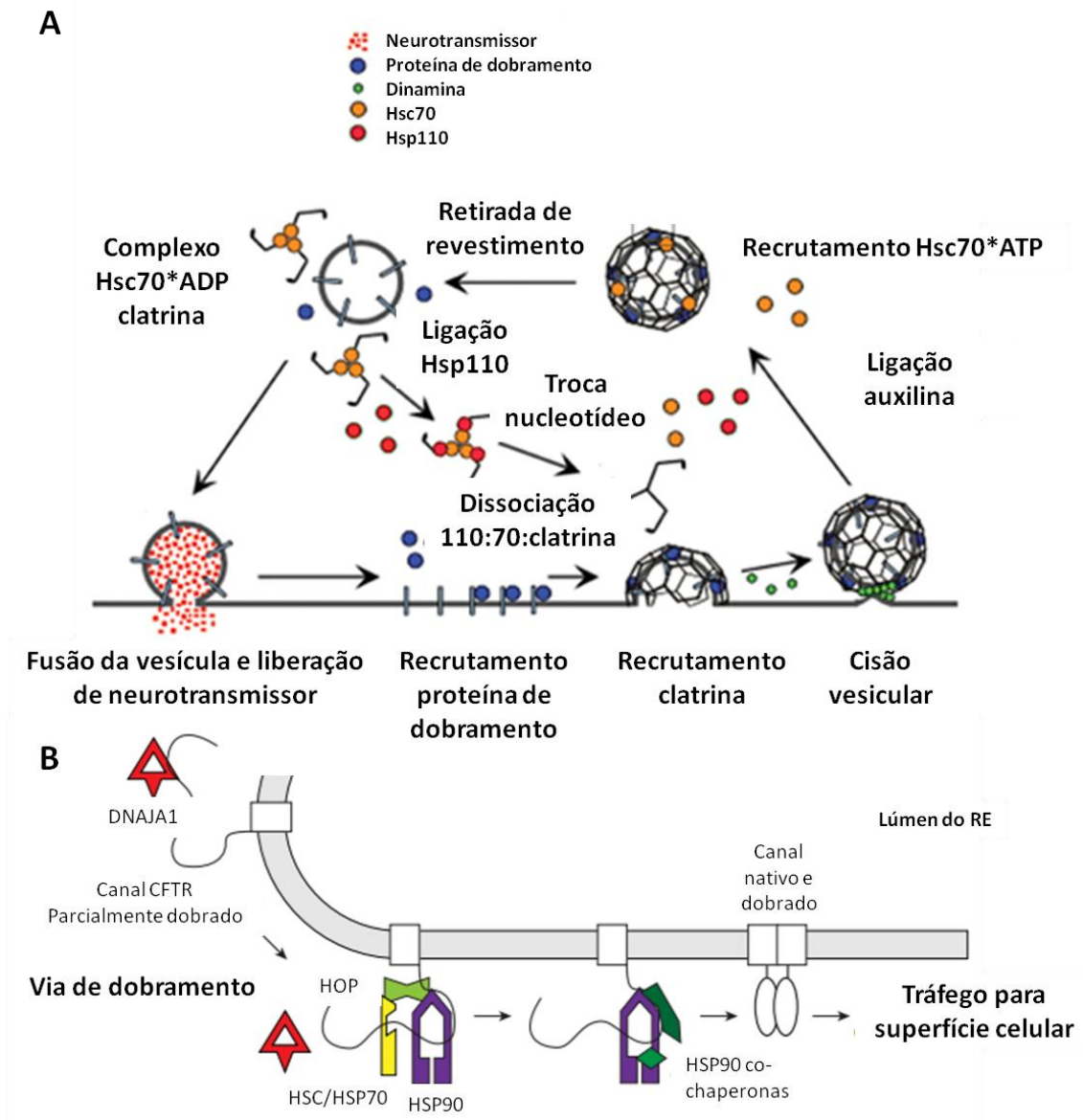


Figura 5. Mecanismos de ação da proteína HSP70 na sinapse. **(A)** O recrutamento de clatrina leva à invaginação da membrana e subsequente cisão da vesícula pela dinamina (esferas verdes), seguida pela ligação da auxilina, que recruta a HSP70 ligada ao ATP (esferas laranjas) para o revestimento da vesícula. A então HSP70 retira o revestimento da camada de clatrina, resultando em complexos estáveis de HSP70 : ADP : Clatrina. A ligação de outra HSP, de 110 kDa, induz a troca de ADP por ATP e dissociação do complexo Hsp110: HSP70: Clatrina. **(B)** A HSP70 também auxilia no dobramento correto de receptores, auxiliando seu tráfego na membrana para superfície celular (modificado de Sousa & Lafer, 2015; Young, 2014).

Em outro estudo, demonstrou-se que havia altos níveis de HSP73 em populações neuronais no giro denteado, região CA1 e CA2 do hipocampo e neurônios de Purkinje do cerebelo. Morte celular induzida por hipertermia não foi observada nas células neuronais dessas regiões que expressavam níveis mais elevados da proteína constitutiva, sugerindo que a expressão neuronal da HSP73 pode desempenhar um papel na proteção dos neurônios a estímulos estressantes (Belay & Brown, 2006). A elevação da temperatura corporal em si não parece alterar os níveis de HSP73 no sistema nervoso central, mas aumento de 3,5°C foi capaz de induzir fortemente HSP72, que também foi detectada nas sinapses, onde poderia facilitar o reparo de proteínas desnaturadas (Bechtold et al., 2000).

Esse choque térmico não letal resulta em um pré-condicionamento, evitando a redução do conteúdo quantal de vesículas (número de vesículas que liberam neurotransmissores por estímulo) e estabilizando as funções pré-sinápticas. Ele também mantém as correntes pós-sinápticas na junção neuromuscular em uma amplitude constante em moscas com choque térmico à medida que a temperatura aumenta. Essas mudanças sinápticas correlacionam-se bem com o curso do tempo de elevação da Hsp70 após o choque térmico. Assim, os efeitos protetores sinápticos do pré-condicionamento térmico são, em parte, atribuíveis à alta regulação da HSP70 (Karunanithi et al., 2002).

Fatias de córtex olfatório de ratos pré tratadas com HSP70 (1 µg / ml) protege os mecanismos pré e pós-sinápticos da transmissão sináptica glutamatérgica após excitotoxicidade por glutamato (50 mM), induzindo o bloqueio da função pós-sináptica excitatória e reduzindo os processos pré-sinápticos. Foi hipotetizado que a proteína de choque térmico possa proteger os processos mediados por receptores AMPA e NMDA (Mokrushin et al., 2005). Indução de HSP72 por choque térmico também protege a região CA3 do hipocampo, reduzindo apoptose neuronal causada por estresse psicológico crônico (Yao et al., 2007).

As células da glia sintetizam HSP72 em grandes quantidades e muito rapidamente (Loones et al., 2000; Pavlik et al., 2003), podendo liberá-las para o meio extracelular, onde ficam disponíveis para captação pelos neurônios, respondendo com redução de 60% na morte celular quando posteriormente expostas a choque térmico por 30 minutos (Guzhova et al., 2001; Sheller et al., 1998). Essa liberação de HSP70 pelos astrócitos acontece via exossomos e segue mesmo após 48 h do choque térmico. A sinalização intracelular envolvida na exportação de HSP70 necessita da via quinase

regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1 e 2) e proteína quinase B (PKB), além da diminuição da ativação da via da JNK (Taylor et al., 2007).

Diversos estudos mostraram que superexpressão de HSP72 protege neurônios e astrócitos de diversos insultos, como elevação de peróxido de hidrogênio, privação de glicose e de oxigênio, excitotoxicidade glutamatérgica, depleção de ATP, reduzindo o dano neuronal e apoptose (Chen et al., 2009; Lee et al., 2001; Xu & Giffard, 1997). Hsp70 também é capaz de suprimir a ativação do fator nuclear de fator de transcrição inflamatório κ B (NF- κ B) diretamente, reduzindo o nível de expressão de genes regulados por NF- κ B (Zheng et al., 2008).

1.4 HSP70 e memória

A HSP70 é sintetizada na porção pós-sináptica, o que sugere que sua expressão possa ser um marcador de atividade metabólica em áreas encefálicas engajadas no processamento cognitivo. Ela é induzida pela ativação sináptica (Kaneko et al., 1993) e parece ser fundamental para a transmissão e regulação desta mesmo na ausência de estímulo nocivo, principalmente por seu papel na síntese proteica local, fator essencial para a manutenção da plasticidade sináptica já expressa, tal como potenciação de longa duração (LTP) e a consolidação de memórias (Rao & Steward, 1991).

Um inibidor de tirosina quinase (Genistéina), que é capaz de bloquear seletivamente a indução de LTP em neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo (O'Dell et al., 1991), bloqueia também a transcrição do gene da HSP70, sem afetar a ligação de seu fator de transcrição ao DNA, mostrando outra via de ativação desta proteína (Price & Calderwood, 1991), além de uma possível correlação com a indução da LTP. Esta relação foi posteriormente comprovada ao verificar-se que a indução de LTP em fatias de hipocampo (CA1) não era suprimida por escopolamina em ratos que foram submetidos a tratamento prévio de choque térmico. A indução da LTP era realizada durante o pico de expressão de HSP70 no hipocampo, induzida 16 h após o choque térmico, tendo efeito preventivo sobre a supressão de LTP por escopolamina (Lin et al., 2004). Outro estudo comprovou novamente este efeito preventivo, bloqueando o efeito amnésico causado por injeção intraperitoneal de escopolamina, também realizado no momento em que houve o pico de indução de HSP70 (Hung et al., 2004).

Estímulos fisiológicos que envolvem a transição da memória de curta para longa duração, como aumento de íons Ca^{2+} , PKC, CaMKII α , também são capazes de estimular a síntese de HSP70, ativando o HSF1. Acredita-se também que esta proteína possa estar envolvida nos mecanismos que induzem receptores AMPA funcionais em sinapses silenciosas durante a indução de LTP (Song et al., 1998), isto porque já foi demonstrado que a HSP70 está envolvida nos mecanismos de transporte de canais de cloreto que são afetados na fibrose cística (Yang et al., 1993). Já foi demonstrado também aumento na expressão de HSP70 induzido por memória aversiva 3 e 24 h após o treino (Frenkel et al., 2012; Igaz et al., 2004) e também durante o aprendizado no labirinto aquático, tendo pico de expressão no momento em que esta memória está sendo formada, com níveis mais baixos quando este aprendizado foi dominado (Pizarro et al., 2003).

Alguns estudos utilizaram um inibidor de HSP90, o 17-AAG, que libera a ligação do HSF1 com a HSP90, deixando ele livre para ativação gênica, consequentemente, elevando níveis proteicos de HSP70. Chen e colaboradores (2014) mostraram que o 17-AAG levou a um aumento da expressão de sinapsina I e sinaptofisina, proteínas que ajudam no transporte de vesículas, ancoragem e liberação nos terminais nervosos. Na densidade pós-sináptica, houve um aumento da proteína estrutural PSD95 e o bloqueio de HSF1 aboliu essa indução. Múltiplos locais para elementos responsivos a HSF1 foram encontrados em promotores dos genes sinápticos. Assim, enquanto o 17-AAG ativou a resposta ao estresse com o aumento da expressão de HSP70, HSP40 e HSP27, as proteínas sinápticas selecionadas foram diretamente aumentadas pelo HSF1 (Chen et al., 2014). Certamente, o papel do HSF1 na geração e conservação sináptica incorpora uma conexão entre circuitos neurais e eventos ambientais que podem levar ao comportamento adaptativo.

Embora já tenha sido demonstrado aumento de HSP70 induzido por aprendizagem, não se sabe ao certo qual a função desta proteína sobre os processos relacionados à memória e qual mecanismo de ação que ela poderia desempenhar, além de sua função como chaperona molecular. Sabe-se que há semelhanças nos processos moleculares que levam à indução da HSP70 com os processos envolvidos na formação da memória, mas não há evidências concretas que provem uma correlação direta. Os trabalhos sobre este tema são escassos e muito especulativos, por esta razão, é de grande importância se aprofundar no tema, a fim de buscar novas perspectivas a respeito de sua função na consolidação de memórias.

1.5 HSP70 e Alzheimer

Nos últimos anos, a HSP70 surgiu como novo alvo farmacológico para o tratamento de doenças neurodegenerativas, principalmente por seu papel fundamental no dobramento incorreto de proteínas. De acordo com o relatório mundial de Alzheimer, em 2016 havia 47 milhões de pessoas no mundo vivendo com demência (World Alzheimer Report, 2016) e esse número irá crescer para 65.7 milhões até 2030 e para 115.4 milhões até 2050. A doença de Alzheimer é responsável por 50-60% dos casos de demência e afeta 11% da população acima de 65 anos (Alzheimer's Association, 2017).

A gravidade dos prejuízos cognitivos na doença de Alzheimer geralmente correlaciona-se com características histopatológicas: formação de placas amiloides extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelulares (proteína tau hiperfosforilada), o que reduz a funcionalidade celular e leva à morte neuronal (Hardy, 2009). Há também altos níveis de estresse oxidativo e inflamação (Akiyama et al., 2000; Akiyama et al., 2000), além de grande atrofia encefálica (Pini et al., 2016). Não há atualmente nenhum tratamento eficaz disponível, principalmente devido à falta de conhecimento sobre a base molecular da doença, e conseqüentemente, à dificuldade de diagnóstico precoce.

O envelhecimento no sistema nervoso central pode envolver perda do controle da qualidade de proteínas pela falha de chaperonas moleculares, um déficit que pode acabar facilitando o aumento da formação de agregados e emaranhados neurofibrilares (Calderwood et al., 2009). Em culturas neuronais, a superexpressão da HSP70 foi capaz de proteger os neurônios contra a toxicidade da proteína β -amiloide (Magrané et al., 2004). As regiões hidrofóbicas expostas em oligômeros são “sinalizadores” para o reconhecimento da HSP70 e posterior reorganização da sua conformação (Muchowski & Wacker, 2005). A β -amiloide é eliminada do sistema nervoso central através de degradação mediada por enzimas, fagocitose pela microglia e astrócitos, e então é transportada para o sangue e nódulos linfáticos. A HSP70 pode estimular a remoção de β -amiloide através da regulação positiva da expressão da enzima de degradação da insulina (IDE, que degrada β -amiloide) e TGF- β 1 (citocina que estimula a remoção de β -amiloide através da ativação da microglia fagocitária). A superexpressão de HSP70 aumenta a degradação de proteínas mutantes e também pode prevenir a disfunção neuronal auxiliando o tráfego intracelular e a transmissão sináptica (Figura 6, Muchowski e Wacker, 2005).

A homeostase da tau é normalmente controlada pela ação de chaperonas moleculares. A HSP70 pode promover a ligação da tau aos microtúbulos e impedir a agregação da tau, promovendo sua degradação pelo sistema de ubiquitina-proteassoma e autofagia, prevenindo assim a taupatia. A HSP70 inibe diretamente a agregação de tau por um mecanismo envolvendo associações preferenciais com espécies de tau oligoméricas solúveis, monoméricas e pré-fibrilares (Jinwal et al., 2010).

O inibidor de HSP90, 17-AAG, foi capaz de restaurar a densidade de espinhos além das estruturas tipo cogumelo nos neurônios tratados com oligômeros de β -amiloide. In vivo, o 17-AAG administrado a camundongos via injeção intracerebroventricular preveniu a perda de memória contextual induzida pela injeção de oligômeros de β -amiloide, além de restaurar os níveis de PSD95 e BDNF (Chen et al. 2014). Ortega e colaboradores descobriram que o 17-AAG preservava a aprendizagem e a memória quando administrado antes da injeção de β -amiloide na região CA1 do hipocampo de ratos. 17-AAG aumentou a imunomarcação de HSF1, HSP27 e HSP70 (Ortega et al., 2014). Mais recentemente, Thistrup et al. relataram que o tratamento com um novo inibidor de HSP90 com alta capacidade de indução de HSP70 reverteu as deficiências sinápticas no modelo de camundongo transgênico rTg4510 da doença de Alzheimer, que apresenta disfunção sináptica mediada por hiperfosforilação da proteína tau.

O tratamento com HP70 exógena (administrada por via intranasal, durante 21 dias) mostrou um efeito terapêutico em modelos de camundongos com doença de Alzheimer (5XFAD), normalizando a densidade de neurônios do hipocampo e do córtex, que foram correlacionados com a acumulação diminuída de β -amiloide e formação de placas, protegendo também o aprendizado espacial (Bobkova et al., 2014). Sendo essa uma proteína tão altamente conservada ao longo da evolução e essencial para sobrevivência celular, é de grande importância a avaliação da participação da mesma sobre os processos cognitivos e mnemônicos, e de suas ações moleculares, tão pouco conhecidas nesta área, a fim de buscar novos tratamentos e intervenções em casos patológicos como da doença de Alzheimer. Esforços para promover a síntese endógena de HSP70 poderiam ser terapeuticamente relevantes para a DA.

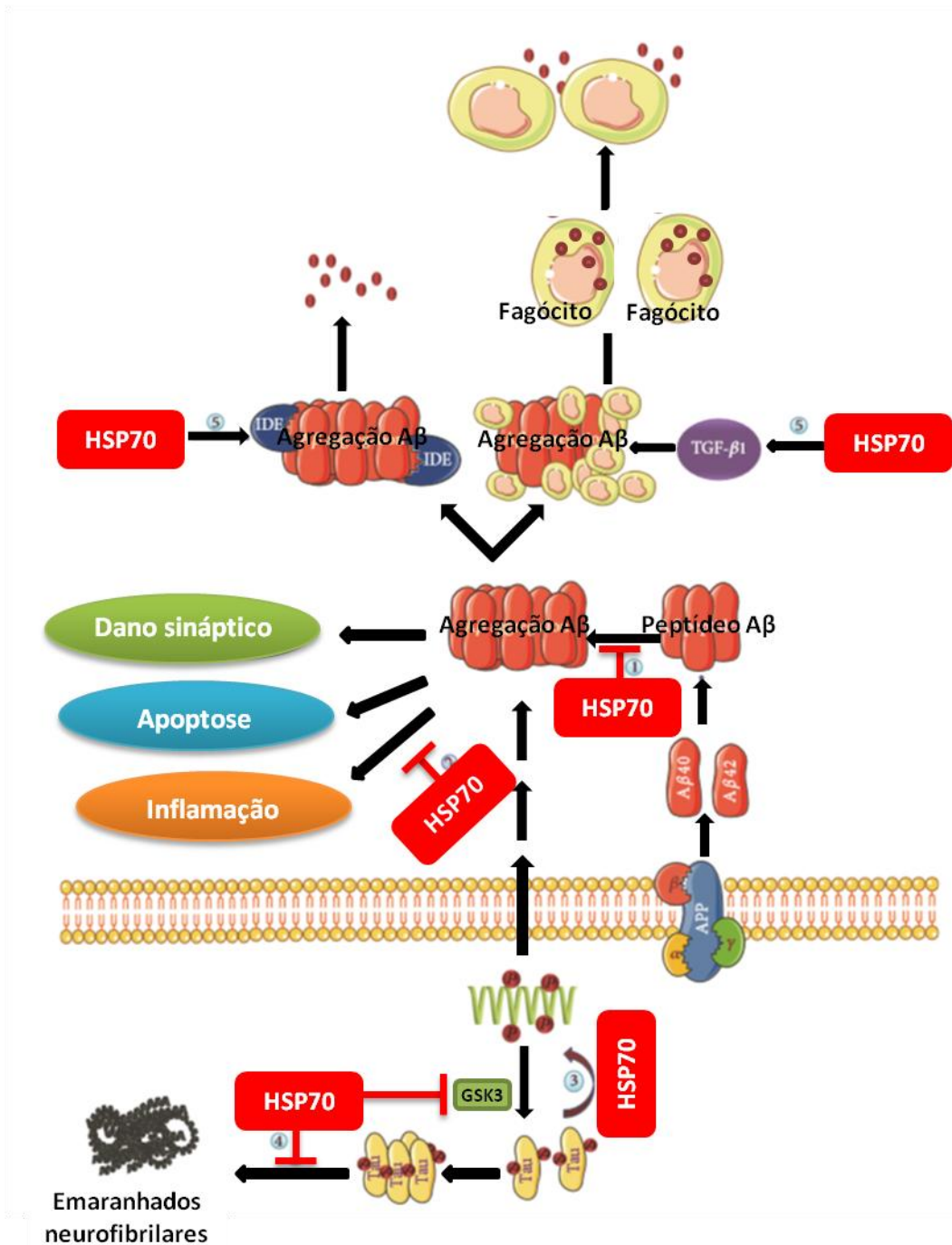


Figura 6. Mecanismos protetores da HSP70 na DA. (1) Reconhece oligômeros e inibe a agregação de β -amiloide; (2) Modula vias que resultam em atenuação da apoptose; (3) Promove estabilização dos microtúbulos; (4) inibe diretamente a agregação de tau se associando preferencialmente com a forma solúvel, monomérica e pré-fibrilar da proteína e também inibe a GSK3 (5) Regula expressão de vias que aumentam a remoção de β -amiloide (modificado de Lu et al., 2014).

Dessa forma, o presente trabalho será dividido em 3 partes respondendo as seguintes hipóteses:

Capítulo I

A proteína HSP70 é induzida por aprendizagem e é capaz de influenciar a consolidação da memória, atuando não somente como chaperona molecular.

Capítulo II

A HSP70 é induzida por reativação da memória e também participa dos processos que a seguem.

Capítulo III

O tratamento com choque térmico, utilizado como indutor de HSP70, é capaz de melhorar déficits cognitivos em modelo da doença de Alzheimer.

2. OBJETIVOS

Capítulo I

Objetivo Geral

Verificar a influência da proteína HSP70 na consolidação de memória aversiva dependente de hipocampo.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o imunoconteúdo de HSP70 no hipocampo dorsal de ratos em diferentes tempos após o treino no condicionamento aversivo ao contexto.
2. Verificar a localização de HSP70 no hipocampo dorsal no momento de pico após o treino no condicionamento aversivo ao contexto.
3. Verificar a influência da infusão de rHSP70 no hipocampo dorsal imediatamente após o treino no condicionamento aversivo ao contexto na consolidação da memória.
4. Avaliar o efeito da infusão de rHSP70 imediatamente após o treino sobre o imunoconteúdo e atividade de proteínas da via da MAPK no hipocampo dorsal de ratos 1 e 3 h após o treino de condicionamento aversivo ao contexto.
5. Verificar se o bloqueio da HSP70 extracelular causa algum efeito sobre a consolidação da memória.

Capítulo II

Objetivo Geral

Verificar a importância da proteína HSP70 após reativação de uma memória aversiva dependente de contexto.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o imunoconteúdo de HSP70 no hipocampo dorsal de ratos em diferentes tempos após curta (reconsolidação) reexposição ao condicionamento aversivo ao contexto.
2. Avaliar o imunoconteúdo de HSP70 no hipocampo dorsal de ratos em diferentes tempos após longa reexposição (extinção) ao condicionamento aversivo ao contexto.
3. Verificar a influência da novidade no imunoconteúdo de HSP70 no hipocampo dorsal de ratos 1 h após curta (reconsolidação) reexposição ao condicionamento aversivo ao contexto.
4. Verificar a influência da infusão de rHSP70 no hipocampo dorsal imediatamente após reexposição de 4 ou 15 min no condicionamento aversivo ao contexto.

Capítulo III

Objetivo Geral

Verificar o efeito do tratamento com choque térmico com luz infravermelha como alvo terapêutico em um modelo animal da doença de Alzheimer e seus possíveis mecanismos de ação.

Objetivos Específicos

1. Analisar imunoconteúdo de HSP70 no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos 5XFAD após 2 meses de tratamento de choque térmico iniciando aos 3 ou 8 meses de idade.
2. Analisar imunoconteúdo de proteínas relacionadas à plasticidade sináptica no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos 5XFAD após 2 meses de tratamento de choque térmico iniciando aos 3 ou 8 meses de idade.

3. Analisar imunoconteúdo de proteínas relacionadas ao processo inflamatório no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos 5XFAD após 2 meses de tratamento de choque térmico iniciando aos 3 ou 8 meses de idade.

4. Verificar o efeito do tratamento de choque térmico por 2 meses sobre parâmetros comportamentais (memória, ansiedade e locomoção) de camundongos 5XFAD aos 5 ou 10 meses de idade.

3. CAPÍTULO I

Artigo científico intitulado: *HSP70 facilitates memory consolidation of fear conditioning through MAPK pathway in the hippocampus* — publicado na revista *Neuroscience* (I.F. 3.277) em abril de 2018. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.028.

HSP70 Facilitates Memory Consolidation of Fear Conditioning through MAPK Pathway in the Hippocampus

Rossana R. Porto,^{a,b,c,d} Fabricio D. Dutra,^c Ana Paula Crestani,^{a,c} R. M. Damian Holsinger,^d Jorge A. Quillfeldt,^{a,c} Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.,^b and Lucas de Oliveira Alvares^{a,c*}

^a Neurobiology of Memory Laboratory, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91509-900, Brazil

^b Laboratory of Cellular Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90046-900, Brazil

^c Graduate Program in Neuroscience, Institute of Basic Health Sciences Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90046-900, Brazil

^d Laboratory of Molecular Neuroscience and Dementia, Brain & Mind Centre, The University of Sydney, Camperdown, New South Wales 2050, Australia

Abstract—Heat shock proteins of the 70-kDa (HSP70) family are cytoprotective molecular chaperones that are present in neuronal cells and can be induced by a variety of homeostatically stressful situations (not only proteostatic insults), but also by synaptic activity, including learning tasks. Physiological stimuli that induce long-term memory formation are also capable of stimulating the synthesis of HSP70 through the activation of heat shock transcription factor-1 (HSF1). In this study, we investigated the influence of HSP70 on fear memory consolidation and MAPK activity. Male rats were trained in contextual fear conditioning task and HSP70 content was analyzed by western blot in the hippocampus at different time points. We observed rapid and transient elevations in HSP70 60 min following training. Double immunofluorescence with GFAP and HSP72 revealed that astrocytes were not the site for HSP72 induction by CFC training. HSP72 distribution markedly surrounded synapses between Shaffer collateral and CA1 pyramidal cells. Infusion of recombinant HSP70 (*hspa1a*) into the dorsal hippocampus immediately after training facilitated memory consolidation and enhanced ERK activity while decreasing the activated forms of JNK and p38 in the hippocampus. Blocking endogenous extracellular HSP70 through the administration of specific antibody did not produce any further effect on memory consolidation when applied immediately after training, suggesting that it is indeed acting intracellularly. Induction of HSP70 after fear conditioning is fast and can act as a signaling molecule, modulating MAPK downstream signaling during memory consolidation in the hippocampus, which is crucial for fear memory formation. © 2018 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: molecular chaperone, HSP70, contextual fear conditioning, MAPK.

1. INTRODUCTION

Memory consolidation is a process in which new memories are transformed from a labile state to a more

stable one. This process depends on the activation of kinases, transcription factors, increased gene expression and protein synthesis in the postsynaptic neuronal cell (Elgersma and Silva, 1999; Abel and Lattal, 2001; Izquierdo et al., 2006). One of the most important pathways for long-term memory formation is the activation of protein kinases by glutamate receptor signaling that leads to the activation of CREB (cAMP responsive element-binding protein), a transcription factor responsible for the activation of different genes involved in memory consolidation (Suzuki et al., 2011; Izquierdo et al., 2006). Among those kinases, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family occupies a critical position. MAPKs are divided into three different subfamilies, including the extracellular signal-regulated kinases (ERK), the c-Jun amino-terminal kinases (JNK) and the p38-MAPK (Seeger and Krebs, 1995). JNK was shown to

*Correspondence to: L. de Oliveira Alvares, Neurobiology of Memory Lab, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91509-900, Brazil. E-mail address: lucas_alvares@yahoo.com (L. de Oliveira Alvares).
Abbreviations: AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; CAMK, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase; CFC, Contextual Fear Conditioning; CNS, central nervous system; CREB, cAMP responsive element-binding protein; ERK, extracellular signal-regulated kinases; GluR, glutamate receptor; HSF-1, heat Shock Factor 1; HSP70, heat shock proteins of the 70 kDa; HSP72, inducible form of heat shock protein 70; JNK, c-Jun amino-terminal kinases; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NMDA, N-methyl D-aspartate; p-ERK, phosphorylated ERK; p-JNK, phosphorylated JNK; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; rHSP70, recombinant human HSP70.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.028>
0306-4522/© 2018 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

be a negative regulator of associative learning and, alongside p38, is involved in synaptic plasticity, inducing long-term depression (LTD) (Moult et al., 2008; Sherin et al., 2010, 2011). Alternatively, the increase of cAMP and Ca^{2+} levels in the postsynaptic cell enhances both protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) activities, respectively, leading to the activation of the ERK pathway, CREB phosphorylation and the initiation of transcription of several genes (Alberini, 2009; Kandel, 2012; Johansen et al., 2011; Roberson et al., 1999). HSP70, a member of the 70-kDa family of heat shock proteins (HSPs), is a potential target gene due to the presence of a CRE motif in its promoter region that can be activated by CREB (Choi et al., 1991; Murshid et al., 2010).

Inducible HSP70 (or HSP72, encoded by *HSPA1A* gene in humans) is a cytoprotective molecular chaperone (Lindquist and Craig, 1988), which is synthesized in the central nervous system (CNS) under a variety of homeostatically stressful situations, including heat shock, glucose and oxygen deprivation, glutamatergic excitotoxicity and psychophysiological stress (Belay and Brown, 2006; Lee et al., 2001). The synthesis of this protein under these conditions protects cells against oxidative stress and cell death, since HSP70 is capable of blocking inflammation and apoptosis signaling (Beere et al., 2000; Garrido et al., 1999). Exogenous HSP70 is able to cross the blood–brain barrier, protect motor neurons from death induced by energy deprivation (Robinson et al., 2005), attenuate seizures (Ekimova et al., 2010) and is envisaged as a potential treatment in Alzheimer's disease, diminishing accumulation of amyloid- β and protecting against spatial memory deficits in animal models of the disease (Bobkova et al., 2014).

In neurons, HSP70 is present in postsynaptic structures (Suzuki et al., 1999) where it can be induced by synaptic activation (Rao and Steward, 1991; Kaneko et al., 1993). Physiological stimuli that induce long-term memory formation, such as increased Ca^{2+} , PKC and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CAMK) levels, are also capable of stimulating the synthesis of HSP70 following on from the activation of its most important transcription factor (Heat Shock Factor-1, HSF1) (Price and Calderwood, 1991). Elevation of HSP70 by heat shock prevents the suppression of long-term potentiation (LTP) induced by scopolamine in hippocampal slices (Lin et al., 2004). Similar results have also been observed *in vivo*, in which heat shock pretreatment has shown to block the amnesic effect of scopolamine in the inhibitory avoidance test just 16 h following intervention, a time point of HSP70 peak in the hippocampus (Hung et al., 2004).

Increased HSP70 mRNA and protein content was found to be increased following learning, using different protocols. HSP70 is induced in the hippocampus following aversive and spatial learning (Pizarro et al., 2003; Igaz et al., 2004) and in the cerebellum following a two-way avoidance task (Ambrosini et al., 2005), which suggests that its expression is dependent on the region engaged in the task. Despite numerous assumptions regarding the involvement of HSP70 in synaptic plasticity and memory, there is no concrete evidence of its role and/or

downstream signaling in memory formation besides its chaperone function. Therefore, the aim of our study was to verify the influence of HSP70 on memory consolidation and its possible downstream signaling pathways.

2. MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male Wistar rats (270–350 g) from our breeding colony were housed four to five per cage and maintained under constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with controlled photoperiods (12 h light/12 h dark; lights on at 7:00 a.m.) and 60% relative humidity. A standard commercial laboratory diet (Nuvilab, Curitiba, Brazil) was provided *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with local and national guidelines (Federal Law no 11.794/2008) for animal care and the project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA n. 27791).

Stereotaxic surgery and placement of cannulae

Rats were deeply anesthetized via an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively) and bilaterally implanted with 27-gauge guide cannulae with respect to bregma aimed at AP -4.0 mm, ML ± 3.6 mm, DV -1.6 mm (from brain surface), positioned 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus (Paxinos and Watson, 1998). The animals were exposed to behavioral procedures one week after the surgery. Following behavioral experiments, the rats were euthanized and brains dissected and preserved in 10% formaldehyde to verify cannula position. Only animals with correct cannula placements were included.

Drugs

Recombinant mouse low-endotoxin heat shock protein 70 (hsp72, inducible form of HSP70, encoded by the *hspa1a* gene, Enzo, ADI-ESP-502) was diluted in Dulbecco's PBS pH 7.4, containing 8.1 mM sodium phosphate, 1.5 mM potassium phosphate, 2.7 mM potassium chloride and 137 mM sodium chloride at a total concentration of either 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ or 1.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Anti-Heat Shock Protein 70 monoclonal antibody produced in mouse (Sigma, H5147, clone BRM-22) was diluted in PBS containing 15 mM sodium azide to a total concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ or 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. The vehicle used was the buffer in which the drugs were diluted. Drugs were infused bilaterally into the dorsal hippocampus either immediately, 1 h or 6 h after the training session.

Intrahippocampal infusion

At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into the guide cannula, with its tip protruding 1.0 mm beyond the end of the guide cannula. A volume of 1 μL was infused bilaterally at a slow rate (20 $\mu\text{L}/\text{h}$) and the needle was removed 30 s following complete administration of the drug.

Contextual fear conditioning (CFC)

The CFC task was chosen as it is able to form a long-term memory with just one training session. The CFC chamber consisted of an illuminated Plexiglas box (25.0 × 25.0 cm² grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart). In the conditioning (training) session, rats were placed in the chamber for 3 min, received two footshocks (0.7 mA for 2 s) separated by a 30-s interval. Animals were kept in the conditioning environment for 30 s after the last shock before returning to their home cages. The test was conducted 48 h following training and subjects were re-exposed to the same context without footshock for 240 s. The fear reaction was measured (% of freezing) every minute.

Protein separation and detection

In order to examine protein immunodetection, both dorsal hippocampi were extracted and prepared for electrophoresis as described previously (Ludwig et al., 2014). For immunoblotting procedures, membranes were blocked in 0.5% (w/v) non-fat dry milk (Nestlé) in wash buffer [TBS-Tween 20 solution (0.1% w/v)]. Membranes were washed three times with wash buffer and incubated overnight with primary antibody at a concentration of 1:1000 for HSP70 (Sigma H5147, clone BRM22) and 1:500 for ERK1/2 (Santa Cruz, sc-135900, clone MK1), phospho-ERK (Sigma, M7802), JNK (Sigma SAB4200176, clone 1C2), phospho-JNK (Sigma J4750, clone JNK-PT48), p38 (Sigma, M0800), and phospho-p38 (Sigma, P1491, P-THR180/P-TYR182) (Di Naso et al., 2015). After three washings with wash buffer, secondary peroxidase-labeled antibody was utilized at a concentration of 1:10,000 for mouse (Sigma A9044) and 1:20,000 for rabbit (Sigma, A0545). As a gel loading control, anti-GAPDH produced in rabbit (Sigma, G9545) or anti-actin produced in goat (Santa Cruz, sc-1616) were used at a concentration of 1:500. Blot visualization was acquired for 30 s using ECL-Prime Western Blotting Reagent (GE Healthcare, UK) in ImageQuant TM 350 chemiluminescence system (GE). Data are shown as mean ± S.E.M. of protein content normalized to actin or GAPDH from its respective gel. One representative gel was used for each protein in the results section.

Immunofluorescence double-labeling

Rats were deeply anesthetized via an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively) for transcardially perfusion, firstly with 100 mL of PBS (NaCl – 136.8 mM, KCl – 2.7 mM, KH₂PO₄ – 0.9 mM, Na₂HPO₄ – 6.4 mM, pH 7.4) and then with 300 mL of 4% paraformaldehyde diluted in phosphate buffer 0.1 M (pH7.4). The brain was extracted and post fixed for 4 h in 4% paraformaldehyde. The tissue was cryoprotected with sucrose and frozen in liquid nitrogen. The cuts were made in the cryostat (Leitz) with 40 μm thickness and incubated for 30 min with PBS containing 1% albumin and 0.2% Triton x-100. The primary antibodies (anti-HSP72 mouse FITC conjugate, clone C92F3A-5, Enzo ADI-SPA-810FI, 1:100; anti-GFAP

rabbit, Sigma G9269, 1:200; anti-calbindin rabbit, sigma c2724, 1:400) were diluted in PBS with 1% albumin and 0.2% Triton x-100 and incubated overnight at 4 °C followed by three washes in PBS. The secondary antibody was anti-rabbit conjugated with CY3 (Sigma C2306, 1:500) and was incubated for 1 h at room temperature. After three washes, DAPI Fluorshield™ (Sigma F6057) was applied over the tissue and the coverslip was mounted. For negative control we used the same steps except the primary antibody, which was replaced by the antibody diluent. The micrographs were obtained in a Zeiss epifluorescent microscope. Fluorescence intensity was presented as total fluorescence-negative control. For colocalization it was used the Pearson's correlation coefficient and total colocalization volume between HSP72 and GFAP. Both analyses were made using ImageJ software.

Statistical analysis

Data were analyzed through statistical software GraphPad prism 6. Memory, measured by quantifying freezing behavior, was depicted as the percentage of the total session time and analyzed by a one-way ANOVA followed by Tukey post hoc, or Student's *t* test. Protein immunodetection is shown as arbitrary units relative to β-actin or GAPDH expressions and data were analyzed by a one-way ANOVA or a two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. The level of significance used was *P* < 0.05.

RESULTS

CFC training rapidly induces HSP70 in the dorsal hippocampus

First, we analyzed whether endogenous HSP70 would be elevated following contextual fear condition training since it has already been demonstrated that this protein can be altered following synaptic activity as well as other types of learning (Ambrosini et al., 1999; Pizarro et al., 2003; Igaz et al., 2004; Frenkel et al., 2012). We trained animals (*n* = 5 per group) in the CFC task and evaluated HSP70 immunodetection in the dorsal hippocampus at eight different time points following training (1 min, 30 min, 60 min, 90 min, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h). One-way ANOVA revealed a significant difference among groups ($F(8,35) = 2.815, P = 0.0161$), as shown in Fig. 1. HSP70 was significantly elevated 60 min after CFC when compared to the naive group (Tukey post hoc, *P* < 0.05). This elevation was rapid and transient, since 30 min later (90 min following CFC) HSP70 levels were not statistical different from the naive group.

Previous studies demonstrated that HSP70 can be rapidly induced in astrocytes following stressful stimuli and that neurons can take up the extracellular HSP70 released by the glia (Guzhova et al., 2001; Taylor et al., 2007). In order to evaluate which cell type expressed HSP70 60 min following CFC, we performed immunofluorescence to analyze colocalization between astrocytes and HSP72 (the inducible form of HSP70). As depicted in Fig. 2A and B, HSP72 is basically expressed only in

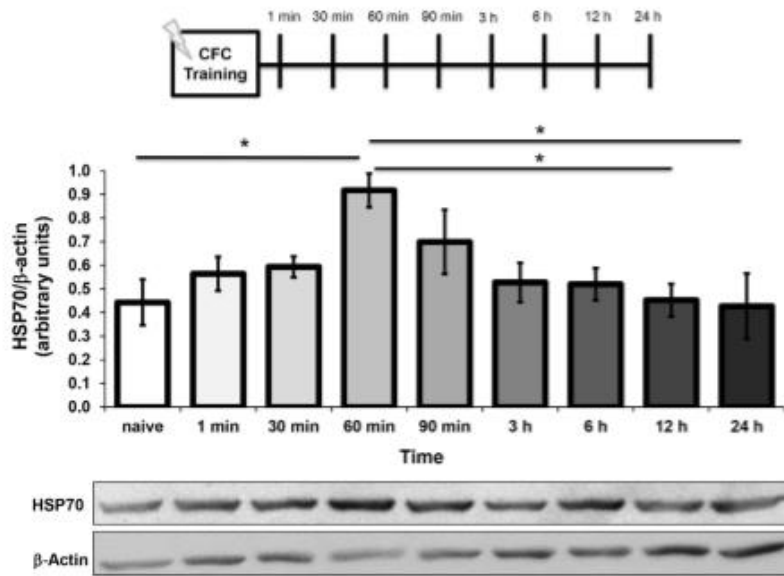


Fig. 1. HSP70 immunodetection in the hippocampus at different time points following CFC ($n = 5$). Data are mean \pm S.E.M. One-way ANOVA ($P = 0.0161$) followed by Tukey post hoc ($P < 0.05$). A representative gel is shown.

the hippocampus of the group that went through CFC ($P < 0.0001$, Student's t test), as quantified and displayed in the scatterplot showing the colocalization distribution between astrocytes and HSP72 (Fig. 2C). There was almost no colocalization between GFAP and HSP72 (Pearson's colocalization coefficient = 0.14, Fig. 2C; colocalized volume = 5%, Figure E), which eliminates this cell as the site for the HSP70 expression induced by the CFC training. The localization of HSP72 mainly surrounded the Schaffer collateral axons and pyramidal cells of the CA1 region, which can be seen in the merged image of calbindin and HSP72 (Fig. 2A).

Exogenous HSP70 facilitates CFC memory consolidation

Extracellular HSP70 usually activates proinflammatory cascades in most tissues (Asea et al., 2002). However,

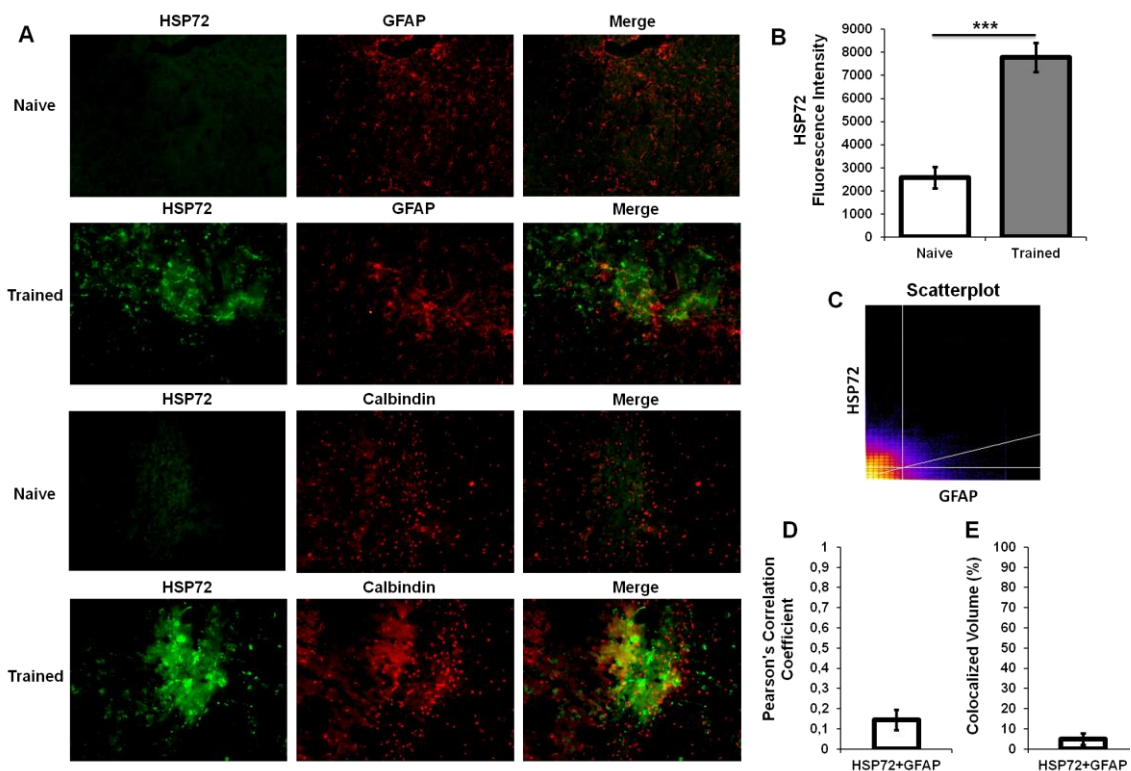


Fig. 2. Cellular localization of HSP72 by immunofluorescence double labeling in the CA1 region of the hippocampus. (A) Neuron and astrocyte, Calbindin and GFAP respectively, were labeled with red fluorescence, while HSP72 was labeled with green fluorescence ($n = 5$). Original magnification $\times 20$. (B) HSP72 Fluorescence intensity in the naive and trained group. (C) Scatterplot showing colocalization of HSP72 (Y axis) and GFAP (X axis). (D) Pearson's correlation coefficient for colocalization between HSP72 and astrocytes. (E) Volume of HSP72 and GFAP fluorescence colocalized. Data are mean \pm S.E.M. ***Student's t test ($P < 0.0001$).

in the CNS HSP70 appears to have a protective effect similar to that of intracellular HSP70, maybe after being imported inside cells. Indeed, it has been proposed that HSP70 could be envisaged as an effective treatment against Alzheimer's disease-associated memory deficits (Bobkova et al., 2014). In order to verify the influence of extracellular HSP70 on memory consolidation, we infused recombinant human HSP70 (rHSP70) at three different concentrations (0.25, 0.5 or 1.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) bilaterally into the dorsal hippocampus immediately after CFC training. We tested the animals two days following training in the same context for 240 s and analyzed the amount of freezing behavior. The results showed a significant difference among groups ($F(3, 28) = 3.502$, $P = 0.0018$, one-way ANOVA). As shown in Fig. 3, the animals that received rHSP70 infusion at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ demonstrated higher freezing levels when compared to vehicle (Tukey post hoc, $P < 0.01$) and 1.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ groups (Tukey post hoc, $P < 0.05$). Lower and higher concentrations of rHSP70 (0.25 or 1.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) did not result in any alterations in freezing behavior as compared to vehicle (Tukey post hoc, $P > 0.05$), but the animals who received a concentration of 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ had higher freezing levels when compared to those who received 1.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tukey post hoc, $P < 0.05$). The results displayed an inverted U-shape pattern for the phenomenon, where the intermediate concentration was the only one capable of facilitating memory consolidation. HSP70 did not affect behavior when infused 6 h after the CFC at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Fig. 4; $P = 0.9109$, Student's t test). We also evaluated HSP70 content in the dorsal hippocampus 1 and 3 h after the infusion of rHSP70 post-CFC training (Fig. 5). Significant effects of treatment ($F(1,20) = 4.961$, $P = 0.0376$, two-way ANOVA) and an interaction between treatment and time ($F(1,20) = 5.500$, $P = 0.0294$, two-way ANOVA), but not of time alone

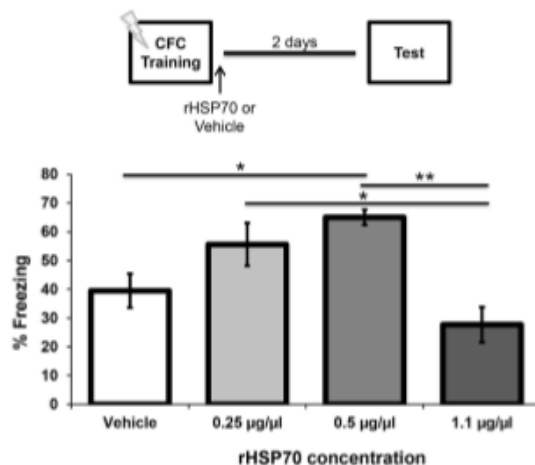


Fig. 3. Exogenous HSP70 facilitates memory consolidation. Exogenous rHSP70 was infused bilaterally in the dorsal hippocampus immediately after CFC training at different concentrations ($n = 6-10$) and freezing behavior was quantified 48 h later during the test session. Data are mean \pm S.E.M. One-way ANOVA ($P = 0.018$), followed by Tukey Post hoc ($P < 0.05$, $**P < 0.01$).

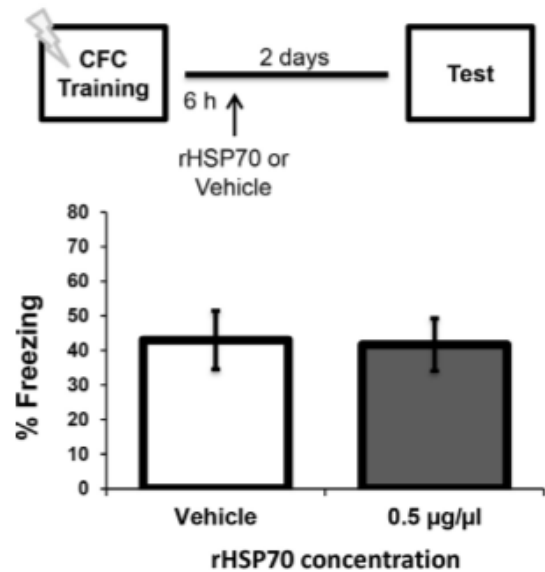


Fig. 4. Exogenous HSP70 infused 6 h after CFC does not affect memory consolidation. Exogenous rHSP70 was infused bilaterally in the dorsal hippocampus 6 h after CFC training at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($n = 6-10$) and freezing behavior was quantified 48 h later during the test session. Data are mean \pm S.E.M. Student's t test ($P = 0.2819$).

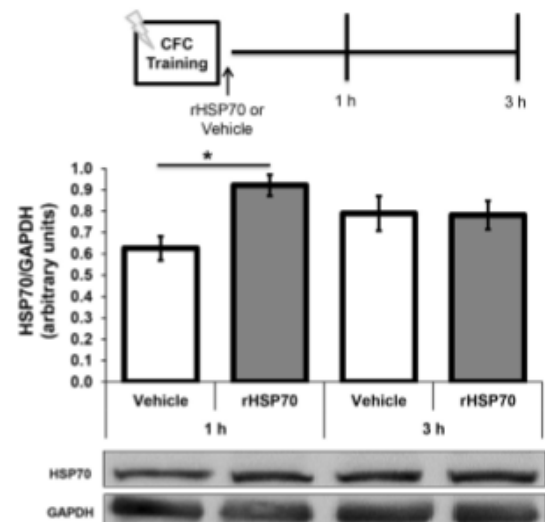


Fig. 5. Intrahippocampal infusion of rHSP70 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) immediately after CFC increases HSP70 content above the physiological levels one hour later ($n = 6$). Data are mean \pm S.E.M. Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc ($P < 0.05$).

($F(1,20) = 0.032$, $P = 0.8577$, Two-way ANOVA) were observed. Post hoc analyses revealed that the group that received rHSP70 infusion after CFC had elevated levels of HSP70 in the hippocampus when analyzed after 1 h, as compared to the vehicle group ($P < 0.05$, Tukey post hoc test).

Exogenous HSP70 modulates MAPK pathway following CFC

Mitogen-activated protein kinases are involved in the process of memory consolidation (Sharma et al., 2003; Giese and Mizuno, 2013; Cestari et al., 2014) and their activities can also be affected by HSP70 expression (Gabai et al., 1997, 1998). For this reason, we analyzed their activities 1 and 3 h after CFC immediately followed by HSP70 infusion in the dorsal hippocampus (Fig. 6A). The group that received rHSP70 infusion following CFC had elevated levels of total ERK protein in the hippocampus when analyzed only 3 h later as compared to the vehicle group at the same time point and there was no difference between controls (interaction: $F(1,19) = 0.8389$, $P = 0.3712$; treatment: $F(1,19) = 12.4$, $P = 0.023$ and time: $F(1,19) = 0.7399$, $P = 0.4004$, two-way ANOVA followed by Tukey post hoc, $P < 0.05$; Fig. 6C). When we examined the activated form of ERK (phosphorylated ERK, p-ERK), the results revealed that the vehicle group had higher levels of p-ERK at 3 h when compared to the vehicle at 1 h (interaction: $F(1,16) = 0.25$, $P = 0.6239$; treatment: $F(1,16) = 13.61$, $P = 0.002$ and time: $F(1,16) = 31.61$, $P < 0.0001$, two-way ANOVA followed by Tukey post hoc, $P < 0.05$; Fig. 6D). The group receiving rHSP70 infusion after CFC showed elevated levels of p-ERK when analyzed after 3 h as compared to the vehicle

group at the same time point (Tukey post hoc, $P < 0.05$) and to rHSP70 at 1 h (Tukey post hoc, $P < 0.01$). Infusion of rHSP70 after CFC did not affect JNK 1 (interaction: $F(1,15) = 0.01$, $P = 0.9216$; treatment: $F(1,15) = 0.144$, $P = 0.7097$ and time: $F(1,15) = 0.003$, $P = 0.9505$, two-way ANOVA; Fig. 6E) and 2 content (interaction: $F(1,15) = 0.1380$, $P = 0.7155$; treatment: $F(1,15) = 0.012$, $P = 0.9139$ and time: $F(1,15) = 0.123$, $P = 0.7307$, two-way ANOVA; Fig. 6F) and there was also no treatment effect on JNK 1 phosphorylation ($F(1,20) = 1.437$, $P = 0.2446$, two-way ANOVA) rather, there was an effect of time ($F(1,20) = 9.932$, $P = 0.005$, two-way ANOVA) with lower levels of p-JNK when HSP70 was analyzed at 3 h after the infusion compared to 1 h in both the treated and vehicle groups ($P < 0.05$, Tukey post hoc; Fig. 6G). With reference to the other member of the MAPK family, p38, no effects were observed following either rHSP70 treatment ($F(1,16) = 2.608$, $P = 0.1259$, two-way ANOVA) or in respect to time ($F(1,16) = 0.118$, $P = 0.7357$, two-way ANOVA; Fig. 6H). However, the activated form (phospho-p38) was significantly decreased 1 h following treatment with rHSP70 as compared to the vehicle group at the same time point (interaction: $F(1,16) = 4.146$, $P = 0.0586$; treatment: $F(1,16) = 6.042$, $P = 0.0258$ and time: $F(1,16) = 2.627$, $P = 0.1246$, two-way ANOVA followed by Tukey post hoc, $P < 0.05$; Fig. 6I).

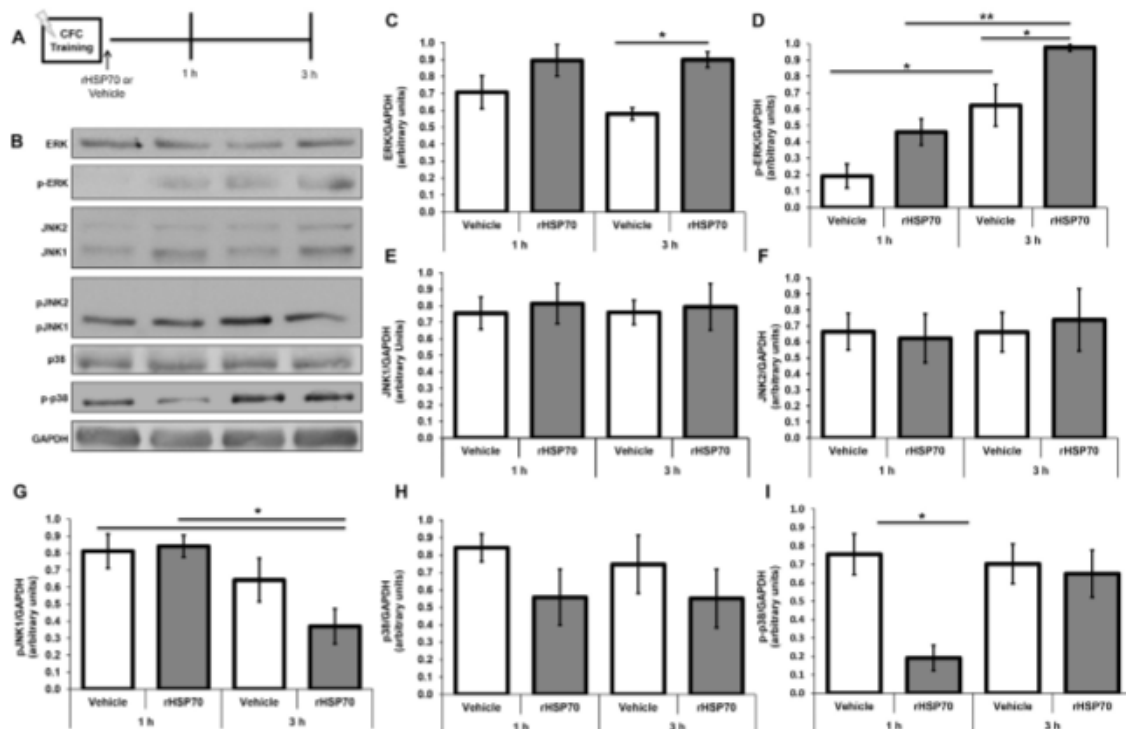


Fig. 6. Intra-hippocampal infusion of rHSP70 (0.5 µg/µL) immediately after CFC decreases p38 activity one hour later and increases ERK activity while decreasing p-JNK in the hippocampus three hours after the infusion ($n = 6$). Data are mean \pm S.E.M. Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc ($P < 0.05$, $**P < 0.01$).

Anti-HSP70 mAb does not affect CFC memory consolidation

Since HSP70 content is rapidly increased in the hippocampus after CFC training, we questioned whether it was acting via a paracrine mechanism rather than being synthesized in the hippocampus. To assess the impact of physiological extracellular HSP70 (eHSP70) on memory consolidation, we used a monoclonal antibody raised against HSP70 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ or 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) infused bilaterally into the dorsal hippocampus to block the extracellular protein immediately after CFC. These results showed that endogenous extracellular HSP70 has no significant effect in the formation of long-term memory of the CFC ($F(3,49) = 1.337$, $P = 0.2730$, One-way ANOVA; Fig. 7), leading us to conclude that HSP70 should have been being synthesized inside the cell.

DISCUSSION

In this study, we investigated whether HSP70 is involved in the formation of long-term memory, using contextual fear conditioning as a measure of associative learning. HSP70 was elevated one hour following training and this elevation was rapid and transient. These results differ from other studies that have observed elevations in HSP70 following inhibitory avoidance and water maze after 3 and 24 h, respectively (Pizarro et al., 2003; Igaz et al., 2004). It should be noted that the previous studies have not analyzed shorter periods of time and, in addition, have used the water maze (Pizarro et al., 2003) or 8-arm radial maze (Ambrosini et al., 2005) task as a measure of memory consolidation, which requires more than one training session to form a long-term memory and cannot

be directly compared to CFC. Fast and transient elevations of HSP70 mRNA have already been reported in the CNS following administration of quinolinate, an NMDA agonist (Walker and Carlock, 1993) as well as by synaptic activity induced by electroshock (Kaneko et al., 1993). This pathway of HSP70 induction by glutamate receptors and synaptic activity could also be involved in the induction of HSP70 observed in our experiments following contextual fear conditioning. The entry of Ca^{2+} activates protein kinases such as CAMKII/IV, PKC and PKA (Murshid et al., 2010; Schafe et al., 2001). Ca^{2+} , CAMKII and PKC are known activators of HSP70 gene transcription (Price and Calderwood, 1991). PKA and CREB can directly activate HSP70 gene transcription and protein content (Choi et al., 1991). In fact, PKA and CREB activity are elevated immediately after training (Izquierdo et al., 2006) and could explain the hippocampal elevation of HSP70 observed in our experiments. Whether PKA and CREB are directly responsible for this elevation is currently under investigation.

Experiments made by Pizarro et al. (2003) indicated that expression of HSP72 in the hippocampus of two different strains of mice (C57 and DBA) varies as a function of the learning performance, independently from exposure to chronic acoustic stress. Accordingly, HSP72 is low in the condition in which each strain shows the higher performance and high in the condition in which each strain shows the lower performance. HSP70 elevation appears to be related to learning since HSP70 has been found to be maximally expressed when rats are beginning to master a task, but lower when memory is fully consolidated (Pizarro et al., 2003; Ambrosini et al., 2005). Therefore, it is plausible that both the time course of HSP70 elevation and its relation to performance may be critical factors for elucidating the role played by these proteins in learning-associated cellular changes. A peak in HSP70 content that occurs during consolidation in the hippocampus could be an indication that the task is being mastered and new neural connections are being established. This would explain why HSP70 increase was rapid and transient, being important in the first hours where the process of memory consolidation in the CFC is needed (consolidation window).

Studies have demonstrated that astrocytes are able to induce HSP70 rapidly and export them to the extracellular space where it can be taken up by neurons (Guzhova et al., 2001; Pavlik et al., 2003; Taylor et al., 2007). To address whether HSP70 was expressed by astrocytes, we performed double immunofluorescence with HSP72 and GFAP. First, we replicated the enhancement of HSP70 following CFC, now evaluating only the inducible form of the protein and we showed that it was highly expressed only in the animals that were trained. The low Pearson's correlation coefficient found demonstrated that there was basically no colocalization between those proteins, so we can claim that the astrocytes were not responsible for the expression of HSP70 induced by contextual fear conditioning training. Also, double immunofluorescence with calbindin and HSP72 revealed that the localization of HSP72 mainly surrounded synapses

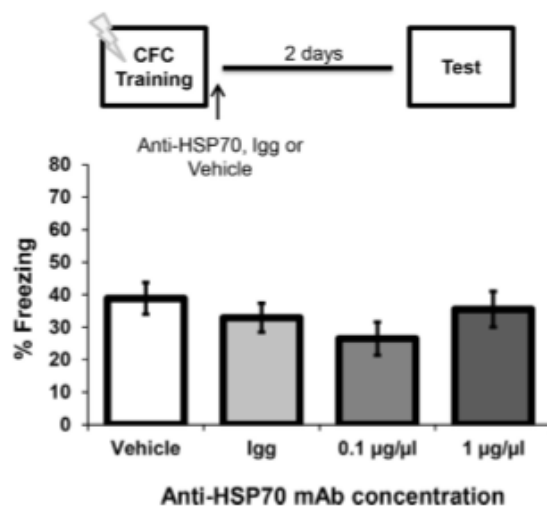


Fig. 7. Anti-HSP70 mAb does not affect memory consolidation. An antibody against HSP70 was infused bilaterally into the dorsal hippocampus immediately after CFC training at different concentrations ($n = 6-10$) and freezing behavior was quantified 48 h later, in the test session. Data are mean \pm S.E.M. One-way ANOVA ($P = 0.2730$).

between the Schaffer collateral axons and pyramidal cells of the CA1 region of the hippocampus.

The effects observed following infusion of rHSP70 into the hippocampus immediately after training further supports its role on learning in the CFC paradigm. Previous studies (Ekimova et al., 2010; Guzhova et al., 1998) have demonstrated that exogenous HSP70 can penetrate cells (*in vitro*) and brain structures (*in vivo*). Labeled Hsp70/Hsc70 injected into the third ventricle of rats penetrated many brain structures, including the hippocampus, and was found in the cytosol of neurons (Ekimova et al., 2010). Interestingly, the labeled protein was also found in neuronal terminals, suggesting that it may have been required for specific neuronal function (Ekimova et al., 2010). In the present study, the infusion of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of rHSP70 immediately after training facilitated memory consolidation while lower and higher concentrations failed to produce an effect on memory. It is possible that levels of rHSP70 higher than that used in this study could be cytotoxic and activate different molecular targets such as toll like receptors in microglia thereby activating proinflammatory pathways (Calderwood et al., 2007; De Maio, 2011). A study (Ammon-Treiber et al., 2008) employing transgenic mice overexpressing human HSP70 revealed deficits in learning. They suggest that the poor performance was a consequence of excessive LTP, corresponding to the so-called saturation hypothesis, suggesting disruption of spatial learning in animals with no residual LTP (Moser et al., 1998). This chronic elevation of HSP70 caused sustained changes in synaptic plasticity, which is completely different from the acute response of this protein after learning demonstrated in our work.

Infusion of rHSP70 after CFC was able to modulate the MAPK pathway, enhancing ERK while decreasing p38 and JNK activity. These kinases may contribute to the bidirectional control of synaptic strength by either complementing or opposing each other during synaptic depotentiation, LTD and LTP (Zhu et al., 2002, 2005). The rapid initial increase in CREB phosphorylation in response to neuronal activity is mediated by CaMKIV. However, the prolonged phosphorylation of CREB that is essential for CRE-dependent transcription appears to be dependent on ERK activity since it is blocked by MEK inhibitors, indicating a requirement for ERK signaling in the maintenance of Ser133 phosphorylation (Thomas and Huganir, 2004). ERK activity is also necessary for the insertion of GluA1 subunit of GluR (glutamate receptor) in the postsynaptic membrane; an action carried out by CAMKII. Consequently, ERK activity is also important for LTP and memory consolidation. On the other hand, JNK activation blocks hippocampal LTP (Wang et al., 2004) and is involved in low frequency stimulation-dependent LTD in the dentate gyrus (Curran et al., 2003). JNKs are also involved in AMPA receptor trafficking (Zhu et al., 2005; Thomas et al., 2008) and metabotropic glutamate receptor-dependent LTD in the dorsal hippocampus (Li et al., 2007). Increased JNK1 activity following CFC appears to be a protective mechanism from over-consolidating a fear associative memory since this kinase negatively regulates learning (Sherrin et al.,

2010). Similar to JNK, p38 activity is also enhanced by metabotropic glutamate receptor activation through MKK3/6 phosphorylation that leads to GluAR internalization and, consequently, LTD (Eales et al., 2014; Xiong et al., 2006). It is also known that BDNF dependent synaptic plasticity can be suppressed by IL-1 β through p38 activation (Tong et al., 2012). Blocking p38 activity immediately after inhibitory avoidance impairs memory, which was not seen when blocking occurred 30 to 180 min after the training session (Alonso et al., 2003), implying that this activity may only be required immediately after memory training. HSP70 was also shown to block JNK and p38 in other studies (Gabai et al., 1997, 1998). It is possible that HSP70 might facilitate memory consolidation through blockage of p38 and JNK activity, which in turn can enhance ERK activity and consequently enhance the maintenance of CREB phosphorylation and gene transcription. Those results are summarized in Fig. 8, with the proposed mechanism of action of HSP70 in memory consolidation.

Blocking extracellular HSP70 with a specific antibody did not affect memory consolidation, thus suggesting that it is indeed acting intracellularly. There also exists the possibility that extracellular HSP70 infused may be internalized, acting in the same way as the endogenous protein, possibly through a receptor or membrane interaction, as it is known that HSP70 binds to membrane scavenger receptors and C-type lectins, being afterward transported to the intracellular milieu, in



Fig. 8. Proposed role of HSP70 in synaptic plasticity and memory consolidation. Enhancement of HSP70 1 h after CFC leads to a decrease in p38 and JNK activity, which are known LTD inducers and, consequently, could act as memory repressors. HSP70 is also able to enhance ERK synthesis and activity, which could lead to its translocation into the nucleus where it can phosphorylate RSK and MSK, thereby phosphorylating CREB, that, in turn, can induce the maintenance of gene transcription and, consequently, memory consolidation. ERK is also involved in the translocation of glutamate receptor (GluR) subunit GluA1 to the membrane, another possibility that could be influenced by enhancing ERK activity.

which it preserves its biological function (Thériault et al., 2006). These possibilities are currently under investigation in our laboratory.

Our results shed light on a critical role of HSP70 in memory consolidation mechanisms, not acting just as a molecular chaperone, but through MAPK downstream pathways. HSP70 can be rapidly induced in the hippocampus after learning, which could be an indication that the task is being mastered and may be a good tool to be used as a learning index.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest and no competing interests such as consultancies, financial involvement, patent ownership, etc. in relation to the work described.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants received from the CNPq (#563870/2010-9, 402626/2012-5 and 402364/2012-0), CAPES and PROPESQ (UFRGS). RRP, FDD, PIHBJ and LOA designed the study. RRP, FDD and APC completed all the experiments described in this manuscript. RRP, PIHBJ, LOA and RMDH were involved in analyzing the results. PIHBJ, LOA, RMDH and JAQ provided experimental advice. RRP wrote the manuscript. FDD, PIHBJ, LOA, APC, RMDH and JAQ provided writing assistance and proof reading. RMDH provided language help. PIHBJ, LOA and JAQ provided the necessary equipment and material for the execution of experiments. All the authors had final approval of the submitted and published versions.

REFERENCES

- Abel T, Lattal KM (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 11(2):180–187.
- Alberini CM (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89(1):121–145. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2008>.
- Alonso M, Bevilacqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M (2003) Memory formation requires p38MAPK activity in the rat hippocampus. *Neuroreport* 14(15):1989–1992. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000091129.97039.f6>.
- Ambrosini MV, Mariucci G, Tantucci M, Bruscellini G, Giuditta A (1999) Induction of cerebellar hsp72 in rats learning a two-way active avoidance task. *Brain Res Mol Brain Res* 70(1):164–166.
- Ambrosini MV, Mariucci G, Tantucci M, Van Hooijdonk L, Ammassari-Teule M (2005) Hippocampal 72-kDa heat shock protein expression varies according to mice learning performance independently from chronic exposure to stress. *Hippocampus* 15(4):413–417. <https://doi.org/10.1002/hipo.20069>.
- Ammon-Treiber S, Grecksch G, Angelidis C, Vezyraki P, Höllt V, Becker A (2008) Emotional and learning behaviour in mice overexpressing heat shock protein 70. *Neurobiol Learn Mem* 90(2):358–364. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.04.006>.
- Asea A, Rehi M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Calderwood SK (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277(17):15028–15034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200497200>.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Green DR (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2(8):469–475. <https://doi.org/10.1038/35019501>.
- Belay HT, Brown IR (2006) Cell death and expression of heat-shock protein Hsc70 in the hyperthermic rat brain. *J Neurochem* 97(Suppl. 1):116–119. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03591.x>.
- Bobkova NV, Garbuz DG, Nesterova I, Medvinskaya N, Samokhin A, Alexandrova I, Evgen'ev M (2014) Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 38(2):425–435. <https://doi.org/10.3233/JAD-130779>.
- Calderwood SK, Thériault J, Gray PJ, Gong J (2007) Cell surface receptors for molecular chaperones. *Methods* 43(3):199–206. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.06.008>.
- Cestani V, Rossi-Arnaud C, Saraulli D, Costanzi M (2014) The MAP (K) of fear: from memory consolidation to memory extinction. *Brain Res Bull* 105:8–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.09.007>.
- Choi HS, Li B, Lin Z, Huang E, Liu AY (1991) CAMP and cAMP-dependent protein kinase regulate the human heat shock protein 70 gene promoter activity. *J Biol Chem* 266(18):11858–11865.
- Curran BP, Murray HJ, O'Connor JJ (2003) A role for c-Jun N-terminal kinase in the inhibition of long-term potentiation by interleukin-1beta and long-term depression in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience* 118(2):347–357.
- De Maio A (2011) Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones* 16(3):235–249. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0236-4>.
- Di Naso FC, Porto RR, Fillmann HS, Maggioni L, Padoin AV, Ramos RJ, de Bittencourt PI (2015) Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity* 23(1):120–129. <https://doi.org/10.1002/oby.20919>.
- Eales KL, Palygin O, O'Loughlin T, Rasooli-Nejad S, Gaestel M, Müller J, Corrêa SA (2014) The MK2/3 cascade regulates AMPAR trafficking and cognitive flexibility. *Nat Commun* 5:4701. <https://doi.org/10.1038/ncomms5701>.
- Ekimova IV, Nitsinskaya LE, Romanova IV, Pastukhov YF, Margulis BA, Guzhova IV (2010) Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. *J Neurochem* 115(4):1035–1044. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06989.x>.
- Elgersma Y, Silva AJ (1999) Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 9(2):209–213.
- Frenkel L, Dimant B, Suárez LD, Portiansky EL, Delorenzi A (2012) Food odor, visual danger stimulus, and retrieval of an aversive memory trigger heat shock protein HSP70 expression in the olfactory lobe of the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Neuroscience* 201:239–251. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.052>.
- Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY (1997) Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272(29):18033–18037.
- Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, Sherman MY (1998) Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett* 438(1–2):1–4.
- Garido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E (1999) HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J* 13(14):2061–2070.
- Giese KP, Mizuno K (2013) The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn Mem* 20(10):540–552. <https://doi.org/10.1101/lm.028449.112>.
- Guzhova I, Kislyakova K, Moskaliova O, Fridlanskaya I, Tytell M, Cheetham M, Margulis B (2001) In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res* 914(1–2):66–73.

- Guzhova IV, Arnholtz AC, Darieva ZA, Kinev AV, Lasunskaja EB, Nilsson K, Margulis BA (1998) Effects of exogenous stress protein 70 on the functional properties of human promonocytes through binding to cell surface and internalization. *Cell Stress Chaperones* 3(1):67–77.
- Hung CH, Lin MT, Liao JF, Wang JJ (2004) Scopolamine-induced amnesia can be prevented by heat shock pretreatment in rats. *Neurosci Lett* 364(2):63–66. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.02.074>.
- Igaz LM, Bekinschtein P, Izquierdo I, Medina JH (2004) One-trial aversive learning induces late changes in hippocampal CaMKII α , Homer 1a, Syntaxin 1a and ERK2 protein levels. *Brain Res Mol Brain Res* 132(1):1–12. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.08.016>.
- Izquierdo I, Bevilacqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 29(9):496–505. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.07.005>.
- Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE (2011) Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 147(3):509–524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.009>.
- Kandel ER (2012) The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain* 5:14. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-14>.
- Kaneko M, Abe K, Kogure K, Saito H, Matsuki N (1993) Correlation between electroconvulsive seizure and HSC70 mRNA induction in mice brain. *Neurosci Lett* 157(2):195–198.
- Lee JE, Yenari MA, Sun GH, Xu L, Emond MR, Cheng D, Giffard RG (2001) Differential neuroprotection from human heat shock protein 70 overexpression in vitro and in vivo models of ischemia and ischemia-like conditions. *Exp Neurol* 170(1):129–139. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7614>.
- Li XM, Li CC, Yu SS, Chen JT, Sabapathy K, Ruan DY (2007) JNK1 contributes to metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression and short-term synaptic plasticity in the mice area hippocampal CA1. *Eur J Neurosci* 25(2):391–396. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05300.x>.
- Lin YW, Yang HW, Min MY, Chiu TH (2004) Heat-shock pretreatment prevents suppression of long-term potentiation induced by scopolamine in rat hippocampal CA1 synapses. *Brain Res* 999(2):222–226. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.11.057>.
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631–677. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>.
- Ludwig MS, Minguetti-Câmara VC, Heck TG, Scorzazon SP, Nunes PR, Bazotte RB, Hornem de Bittencourt PI (2014) Short-term but not long-term hypoglycaemia enhances plasma levels and hepatic expression of HSP72 in insulin-treated rats: an effect associated with increased IL-6 levels but not with IL-10 or TNF- α . *Mol Cell Biochem* 397(1–2):97–107. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2176-2>.
- Moser EI, Krobot KA, Moser MB, Morris RG (1998) Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* 281(5385):2038–2042.
- Moult PR, Corrêa SA, Collingridge GL, Fitzjohn SM, Bashir ZI (2008) Co-activation of p38 mitogen-activated protein kinase and protein tyrosine phosphatase underlies metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Physiol* 586(10):2499–2510. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.153122>.
- Murshid A, Chou SD, Prince T, Zhang Y, Bharti A, Calderwood SK (2010) Protein kinase A binds and activates heat shock factor 1. *PLoS One* 5(11):e13830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013830>.
- Pavlik A, Aneja IS, Lexa J, Al-Zoabi BA (2003) Identification of cerebral neurons and glial cell types inducing heat shock protein Hsp70 following heat stress in the rat. *Brain Res* 973(2):179–189.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in Stereotaxic coordinates*. Academic press.
- Pizarro JM, Haro LS, Barea-Rodríguez EJ (2003) Learning associated increase in heat shock cognate 70 mRNA and protein expression. *Neurobiol Learn Mem* 79(2):142–151.
- Price BD, Calderwood SK (1991) Ca²⁺ is essential for multistep activation of the heat shock factor in permeabilized cells. *Mol Cell Biol* 11(6):3365–3368.
- Rao A, Steward O (1991) Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes. *J Neurosci* 11(9):2881–2895.
- Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratieff C, Sweatt JD (1999) The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* 19(11):4337–4348.
- Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM, Graves J, Milligan CE (2005) Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival. *J Neurosci* 25(42):9735–9745. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1912-05.2005>.
- Schafe GE, Nader K, Blair HT, LeDoux JE (2001) Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* 24(9):540–546.
- Seeger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9(9):726–735.
- Sharma SK, Sherff CM, Shobe J, Bagnall MW, Sutton MA, Carew TJ (2003) Differential role of mitogen-activated protein kinase in three distinct phases of memory for sensitization in *Aplysia*. *J Neurosci* 23(9):3899–3907.
- Sherrin T, Blank T, Hippel C, Rayner M, Davis RJ, Todorovic C (2010) Hippocampal c-Jun N-terminal kinases serve as negative regulators of associative learning. *J Neurosci* 30(40):13348–13361. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3492-10.2010>.
- Sherrin T, Blank T, Todorovic C (2011) C-Jun N-terminal kinases in memory and synaptic plasticity. *Rev Neurosci* 22(4):403–410. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.032>.
- Suzuki A, Fukushima H, Mukawa T, Toyoda H, Wu LJ, Zhao MG, Kida S (2011) Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *J Neurosci* 31(24):8786–8802. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-10.2011>.
- Suzuki T, Usuda N, Murata S, Nakazawa A, Ohtsuka K, Takagi H (1999) Presence of molecular chaperones, heat shock cognate (Hsc) 70 and heat shock proteins (Hsp) 40, in the postsynaptic structures of rat brain. *Brain Res* 816(1):99–110.
- Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE (2007) Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev Neurobiol* 67(13):1815–1829. <https://doi.org/10.1002/dneu.20559>.
- Thériault JR, Adachi H, Calderwood SK (2006) Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *J Immunol* 177(12):8604–8611.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5(3):173–183. <https://doi.org/10.1038/nrn1346>.
- Thomas GM, Lin DT, Nuriya M, Huganir RL (2008) Rapid and bidirectional regulation of AMPA receptor phosphorylation and trafficking by JNK. *EMBO J* 27(2):361–372. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601969>.
- Tong L, Prieto GA, Kramár EA, Smith ED, Cribbs DH, Lynch G, Cotman CW (2012) Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 β via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 32(49):17714–17724. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1253-12.2012>.
- Walker PD, Carlock LR (1993) Timing the excitotoxic induction of heat shock protein 70 transcription. *Neuroreport* 4(6):699–702.
- Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, Anwyl R (2004) Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid β -peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated

- protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci* 24(13):3370–3378. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1633-03.2004>.
- Xiong W, Kojic LZ, Zhang L, Prasad SS, Douglas R, Wang Y, Cynader MS (2006) Anisomycin activates p38 MAP kinase to induce LTD in mouse primary visual cortex. *Brain Res* 1085 (1):68–76. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.015>.
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110(4):443–455.
- Zhu Y, Pak D, Qin Y, McCormack SG, Kim MJ, Baumgart JP, Zhu JJ (2005) Rap2-JNK removes synaptic AMPA receptors during depotentiation. *Neuron* 46(6):905–916. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.037>.

(Received 2 October 2017, Accepted 15 January 2018)
(Available online 31 January 2018)

4. CAPÍTULO II

Resultados parciais de reativação da memória.

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1. Animais

Este projeto (nº 27791) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (08/12/2014) [anexo 1].

Foram utilizados ratos Wistar machos (60 dias), de 250-300g, obtidos do biotério central da UFRGS (CREAL), mantidos em caixas de polipropileno (33x17x40 cm), quatro animais por caixa, em um ciclo de claro/escuro de 12 h e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, dieta comercial padrão para ratos de laboratório, contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos. Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras (Goldim, 1995) e os cuidados com os animais foram de acordo com a Lei Arouca (11794/2008) e com as recomendações da *Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório* (SBCAL/COBEA), da *Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento* (SBNeC), da *International Brain Research Organization* (IBRO) e do *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS).

A morte dos animais por decapitação foi escolhido para eutanásia por ser eficaz na perda imediata de reflexos, além de produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação. A morte dos animais sob anestesia é incompatível com nossos experimentos, pois todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (Brown 2005; Saha 2005), o que afeta também as concentrações de HSP70 (Febbraio 2004).

4.1.2. Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com um anestésico geral, *Cetamina* juntamente com xilazina, um sedativo/miorrelaxante/ analgésico, administrados intraperitonealmente (i.p.), xilazina 10 mg.kg⁻¹ (0,05 mL de xilazina 2% para 100 g de rato) e cetamina 90 mg.kg⁻¹ i.p. (0,09 mL de cetamina 10% para 100 g de rato).

Cada animal operado foi cuidadosamente colocado em um Aparelho estereotáxico (Fabricação: *David Kopf*, modelo 1404), e a superfície de seu crânio exposta mediante incisão sagital com bisturi No 20 ou 21. Uma craniotomia bilateral foi feita com o emprego de uma broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas anteroposteriores (AP) e látero-laterais (LL) da estrutura em questão. Uma cânula de aço inoxidável (manufaturada a partir de agulha com diâmetro interno de 0,7 mm, calibre ou *gauge* 27, e diâmetro interno de 0,3 mm), presa à torre móvel do estereotáxico, foi introduzida cuidadosamente através de cada um desses orifícios feitos na calota craniana e baixada lentamente até a coordenada dorsoventral (DV) definitiva. A cânula foi fixada nesta posição com acrílico dentário, aplicado ainda quando na forma de um líquido espesso, que deixamos secar e consolidar. O acrílico é trabalhado para formar uma espécie de "capacete" sobre o osso do crânio, fechando a janela óssea produzida. As cânulas mantêm-se fixas na posição desejada por tempo suficiente após a cirurgia (10 dias, no mínimo).

A estrutura de interesse foi o hipocampo dorsal e suas coordenadas foram obtidas, inicialmente, do Atlas de Paxinos e Watson (1986), de acordo com a faixa de peso dos animais utilizados. As coordenadas finais corrigidas para nossos animais (para a posição da ponta da cânula, 1 mm acima do verdadeiro "alvo"), medidas a partir do *bregma*, foram as seguintes: AP = -0,40mm; LL = ±0,30mm; DV = -0,16mm. As cânulas intracerebrais foram fixadas 1 mm acima da posição desejada e, através destas, injetadas as substâncias através de um tipo de agulha mais fina ("mizzy", de calibre 30), introduzida por dentro da primeira. A penetração da estrutura-alvo com a agulha mais fina minimiza lesões locais.

No período imediatamente posterior à cirurgia, os animais permaneceram sob aquecimento e umidade controlados, numa câmara pós-operatória. Para reduzir o índice pós-operatório de infecção, os animais receberam, antes da cirurgia, a administração de um antibiótico intramuscular, Tilosina (1 mg/kg). Para manejo algico/nociceptivo pós-operatório foi administrado (subcutâneo) meloxicam (1 mg/kg) uma vez ao dia, por 3 dias. Após decorrido um período de recuperação pós-operatória de 5-7 dias, os animais foram submetidos às tarefas comportamentais.

Após finalização dos experimentos e morte dos animais, os encéfalos foram imersos em formaldeído 10% por uma semana, congelados e cortados no criostato para visualização da posição das cânulas e controle histológico das cirurgias.

4.1.3. Infusão Intracerebral

Os animais foram gentilmente imobilizados, envolvidos em um pano e segurados com uma mão pelo experimentador. A agulha *Mizzy* conectada por um tubo P10 de polietileno a uma microseringa Hamilton contendo o fármaco foi inserida cuidadosamente na cânula até travar, que se dá quando sua extremidade penetrou o trecho final do tecido. A microseringa foi então acionada (manual ou automaticamente) para empurrar 1 μ L da solução do fármaco em um período de 90 segundos, aguardando mais 30s antes de ser removida para que o fármaco se difunda; o procedimento foi realizado bilateralmente.

4.1.4. Drogas

Os fármacos utilizados foram a HSP70 recombinante de camundongo (*hsp72*, forma induzível da HSP70, codificada pelo gene *hsp72* gene, Enzo, ADI-ESP-502) e o bloqueador da função ATPase da HSP70, YM-08 (Sigma, SML0822). A proteína recombinante foi diluída em Dulbecco PBS pH 7.4, contendo 8.1 mM de fosfato de sódio, 1.5 mM de fosfato de potássio, 2.7 mM de cloreto de potássio e 137 mM de cloreto de sódio e usada em uma concentração final de 0.5 μ g/ μ L. O bloqueador também foi diluído no mesmo PBS, porém com 10% de DMSO e em uma concentração final de 0.05 ou 0.5 μ g/ μ L. O veículo utilizado foi o tampão no qual cada droga foi diluída. Ambas foram infundidas bilateralmente no hipocampo dorsal.

4.1.5. Condicionamento Aversivo Contextual (CAC)

Esta tarefa comportamental foi realizada em uma caixa de condicionamento automatizada de esquiva (Fabricação: Albarsch) adaptada para expor apenas a grade (que dá os choques numa área de dimensões 25 X 25 X 25 cm). A parede frontal é de vidro, através do qual se observa o animal. O assoalho é uma grade de barras de bronze

de 1 mm de diâmetro cada, espaçadas 1 cm uma das outras. Nesta grade aplica-se uma diferença de potencial elétrico, obtendo-se, conseqüentemente, uma corrente elétrica de 0.2 a 1.0 mA, conforme o desejado.

Sessão de Condicionamento: Os animais foram colocados na caixa de condicionamento e após 3 min eles receberam 2 choques de 0.7mA (protocolo médio) ou 0.3 mA (protocolo fraco), com intervalo de 30 s entre eles. Os animais permaneceram por mais 30 s antes de voltarem para suas caixas de habitação.

Sessão de Reativação da Memória: Os animais foram reexpostos por 4 ou 15 min para protocolos de reconsolidação e 30 min para extinção na mesma caixa de condicionamento.

Sessão de Teste: Os animais foram testados por 4 min, através da simples reexposição ao contexto. No presente estudo utilizamos o tempo de congelamento, definido como imobilidade em uma posição estereotipada de agachamento, com exceção dos movimentos necessários para respiração, como índice de memória.

4.1.6. Imunodeteção de proteínas

Quantidades iguais de proteína celular (40 µg) foram carregadas em gel de poliacrilamida (12%) - dodecil sulfato de sódio para eletroforese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) em cuba Mini-Protean 3 (Bio-Rad). Após as corridas nos géis, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (*GE Health Care*) por eletrotransferência (Bio-Rad). Foi empregada coloração de vermelho de Ponceau S para confirmar o sucesso da transferência e a seguir, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio com 5% de leite desnatado (Nestlé) em tampão de lavagem [TEN-Tween 20 (solução a 0.1 % m/v); TEN é 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7,4]. Posteriormente, as membranas foram incubadas overnight com anticorpo monoclonal anti-HSP70 feito em camundongo (1:1000, clone BRM22, Sigma H5147) diluído em tampão de lavagem com 1% de BSA e lavadas três vezes. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:10.000, Sigma A9044), conjugado a peroxidase de rabanete, foi incubado por 1 h em temperatura ambiente. Após, as membranas foram

lavadas novamente, e a seguir, submetidas à solução para revelação da peroxidase (luminol/ácido *p*-coumárico). As bandas foram visualizadas com o sistema de quimiluminescência ImageQuant TM 350 (GE) e quantificadas no Software ImageJ. Utilizamos o anti-GAPDH produzido em coelho (1:1000, Sigma G9545) como normalizador, seguido do secundário anti-IgG de coelho (1:20.000, Sigma A0545). Os dados estão mostrados como média± E.P.M. de conteúdo de HSP70 normalizado pelo GAPDH do seu respectivo gel. Um gel representativo é mostrado para cada proteína na seção de resultados.

4.1.7. Análise Estatística

Para as comparações entre dois grupos foi aplicado o teste t de Student para amostras independentes. Para comparações entre múltiplos grupos, ANOVA de uma ou duas via seguida pelo teste post hoc de Tukey. Para comparações de diferentes tratamentos em mais de um momento foi utilizado ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste post hoc de Tukey. Para todas as análises, o α considerado foi de 5%. Os dados serão expressos como média ± erro padrão da média.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Reativação eleva rapidamente o conteúdo de HSP70 no hipocampo

Como demonstramos anteriormente, o conteúdo de HSP70 no hipocampo dorsal é elevado 1 h após treino de CAC (Porto et al., 2018). Além disso, já foi demonstrado em caranguejos esta mesma elevação de HSP70, em glomérulos olfatórios, induzida por estimulação com cheiro de alimento (não aversivo) e por estímulo visual aversivo condicionado ao contexto. Quando esta memória aversiva foi reativada por um curto período, houve novamente elevações no conteúdo de HSP70 (Frenkel et al., 2012). A fim de verificar se uma curta reativação também é capaz de elevar os níveis de HSP70 no hipocampo de ratos, fizemos uma curva de tempo após reativação de 4 min no CAC e analisamos seu imunoc conteúdo no hipocampo dorsal. Similar aos nossos resultados de consolidação, a HSP70 teve um pico de elevação rápido e transiente após reativação (Figura 7, ANOVA de uma via, $P=0.0017$). Entretanto, o pico foi ainda mais cedo, em apenas 30 min (post hoc de Tukey, $P<0.05$), já normalizando aos 90 min (post hoc de Tukey, $P<0.05$).

Uma reativação prolongada é capaz de formar uma nova memória, suprimindo a anterior. Não existem dados avaliando o conteúdo de HSP70 no hipocampo durante a formação de uma memória de extinção. Do mesmo modo, realizamos uma curva de tempo para medir o conteúdo de HSP70 no hipocampo, agora após 30 min de reativação da memória de CAC. Apesar de não encontrarmos uma diferença significativa (Figura 8, ANOVA de uma via, $P=0.3506$), podemos visualizar um pico no conteúdo de HSP70 em 30 min, assim como encontrado após curta reativação.

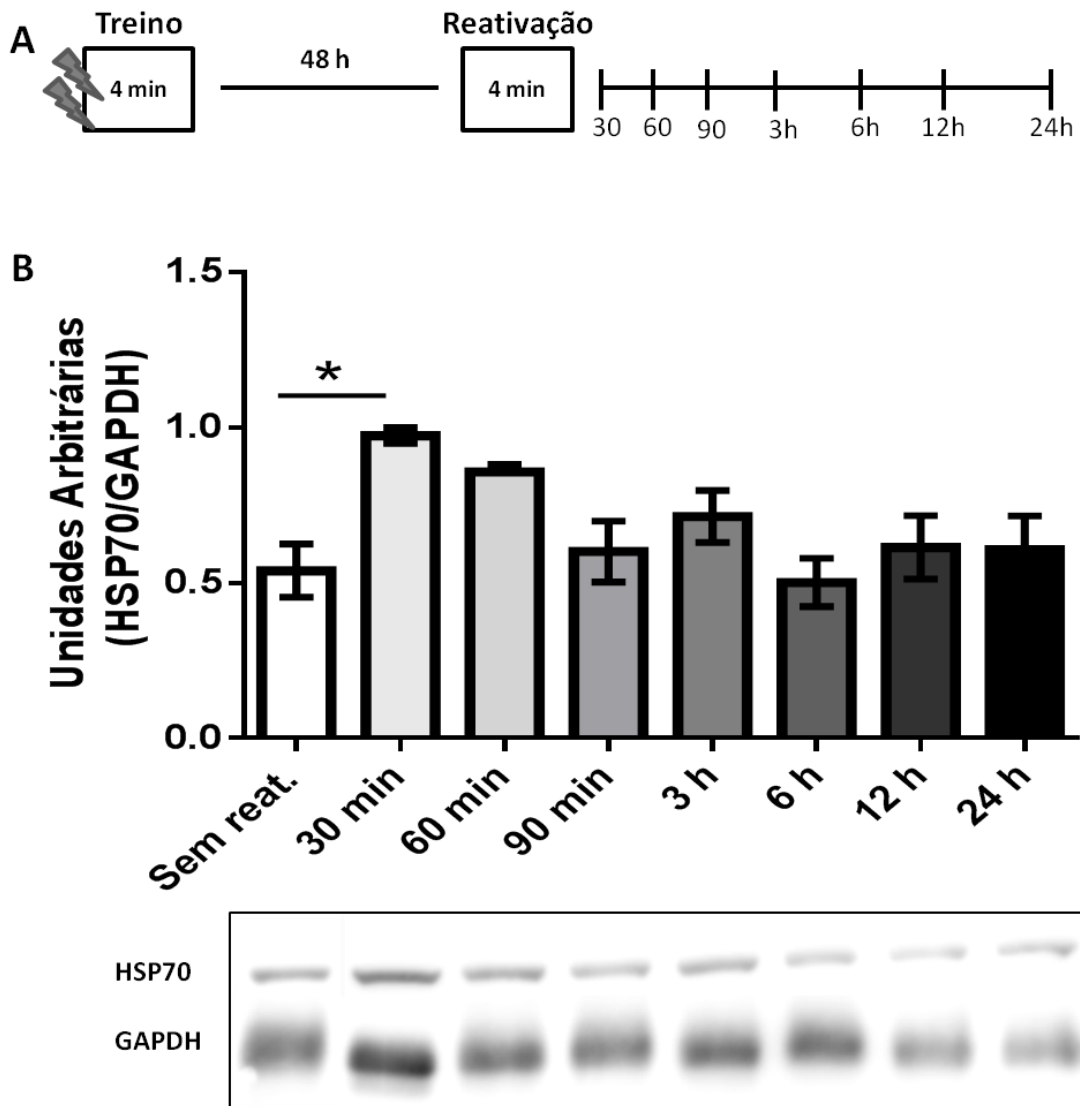


Figura 7. Imunodeteção de HSP70 após curta reativação. **(A)** Desenho experimental. **(B)** Imudeteção de HSP70 no hipocampo em diferentes tempos após reativação de 4 min no CAC ($n = 4-6$). Um gel representativo é mostrado. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de uma via ($P=0.0017$) seguido de post hoc de Tukey ($*P<0.05$).

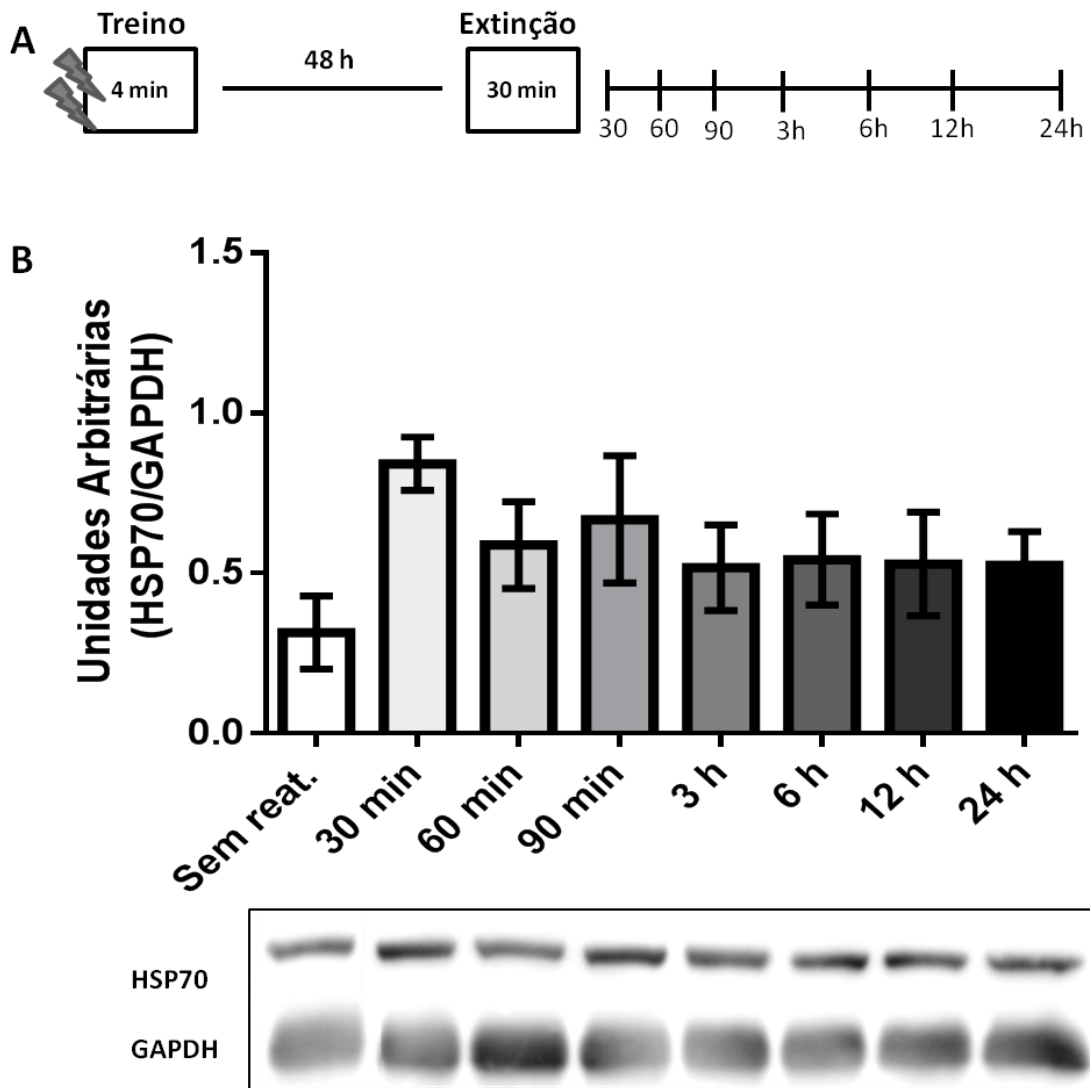


Figura 8. Imunodeteccção de HSP70 após longa reativação. **(A)** Desenho experimental. **(B)** Imudeteccção de HSP70 no hipocampo em diferentes tempos após reativação de 30 min no CAC ($n = 5$). Um gel representativo é mostrado. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de uma via ($P=0.3506$).

4.2.2 A novidade durante reativação induz níveis mais elevados de HSP70 no hipocampo

Já vimos que tanto a consolidação como a reativação da memória são capazes de elevar os níveis de HSP70 no hipocampo. A reativação de curta duração leva a um processo que chamamos de reconsolidação. Durante esta reativação, que é um processo ativo, podemos prejudicar, fortalecer, ou atualizar a memória anteriormente consolidada. Nos perguntamos então, se a resposta de elevação da HSP70 no hipocampo também poderia depender do tipo de reativação. Os grupos foram então divididos em animais sem reativação, animais com reativação de 4 min, animais reativados com um choque mais forte (0.7 mA) que o treino (0.3 mA) e animais reativados com um choque de mesma intensidade (0.7 mA) que o treino (0.7 mA). Verificamos o conteúdo de HSP70 no hipocampo 1 h após cada reativação e encontramos novamente um aumento em relação ao controle (Figura 9, post hoc de Tukey, $P < 0.01$), como já apresentado nos resultados acima. O grupo com choque de igual intensidade também causou aumentos maiores que o controle sem reativação (post hoc de Tukey, $P < 0.0001$), mas não foi diferente do grupo que foi somente exposto ao contexto ($P > 0.05$). Interessantemente, o grupo que teve choque de intensidade diferente do treino teve valores maiores de HSP70 quando comparado com o grupo controle ($P < 0.0001$) e também com o grupo com exposição ao contexto ($P < 0.01$). Esses resultados nos mostram que o conteúdo de HSP70 não é induzido pelo choque e sim pelos processos de aprendizagem, e também que esse aumento é influenciado pela novidade incorporada durante a reativação.

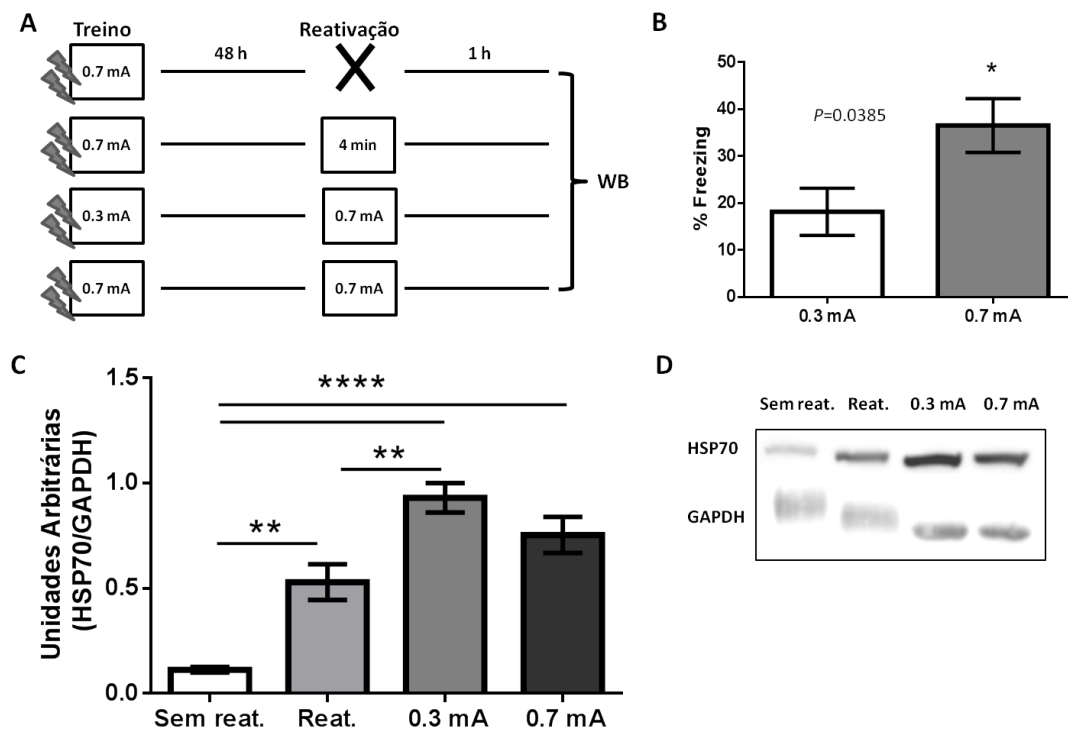


Figura 9. Imunodeteção de HSP70 1 h após diferentes reativações. **(A)** Desenho experimental. **(B)** Porcentagem de freezing na reativação dois dias após treino com 0.3 mA e 0.7 mA. **(C)** Imudeteção de HSP70 no hipocampo após reativação ou re-treino no CAC ($n = 4-6$). **(D)** Gel representativo. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de uma via ($P < 0.0001$) seguido de post hoc de Tukey (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$).

4.2.3. Infusão de rHSP70 após reativação não induz modificações na reconsolidação

A infusão de HSP70 recombinante no hipocampo dorsal imediatamente após o treino no CAC facilita a consolidação desta memória (Porto et.al., 2018). Como vimos que a HSP70 se eleva após reativação de maneira similar à consolidação, avaliamos se a infusão imediatamente após a reativação causaria algum efeito sobre a memória. Quando testamos 2 dias após reativação de 4 (Figura 10, ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação $P=0.4167$; Teste $P=0.7894$; Tratamento $P=0.4878$) ou 15 min (Figura 11, Interação $P=0.3246$; Teste $P=0.0691$; Tratamento $P=0.1791$), a infusão de rHSP70 no hipocampo dorsal não causou nenhuma influência sobre a memória, tendo valores de freezing iguais aos do grupo que foi infundido com veículo. Entretanto, quando a reativação foi mais prolongada, um segundo teste foi realizado, duas semanas depois, onde o grupo veículo demonstrou níveis de freezing reduzidos (Figura 11, $P<0.05$) em comparação aos seus valores durante a reativação (antes da infusão de rHSP70). Já o grupo que recebeu infusão de rHSP70 após reativação, manteve os níveis de freezing, sem mostrar decaimento da resposta de medo ao longo do tempo.

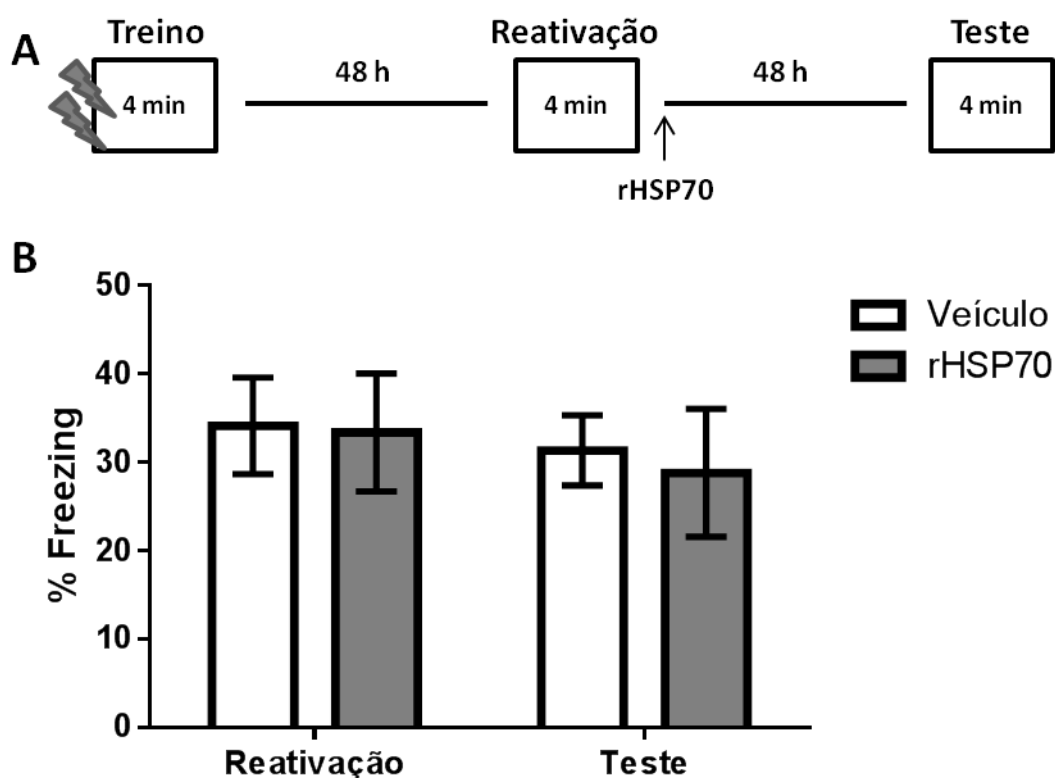


Figura 10. Infusão de rHSP70 após curta reativação. **(A)** Desenho experimental. **(B)** Porcentagem de freezing durante a reativação no CAC de 4 min e no teste 48 h depois da infusão de rHSP70 ou veículo. A infusão foi realizada imediatamente após reativação ($n = 6-7$). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de duas vias de medidas repetidas (Interação $P=0.4167$; Teste $P=0.7894$; Tratamento $P=0.4878$).

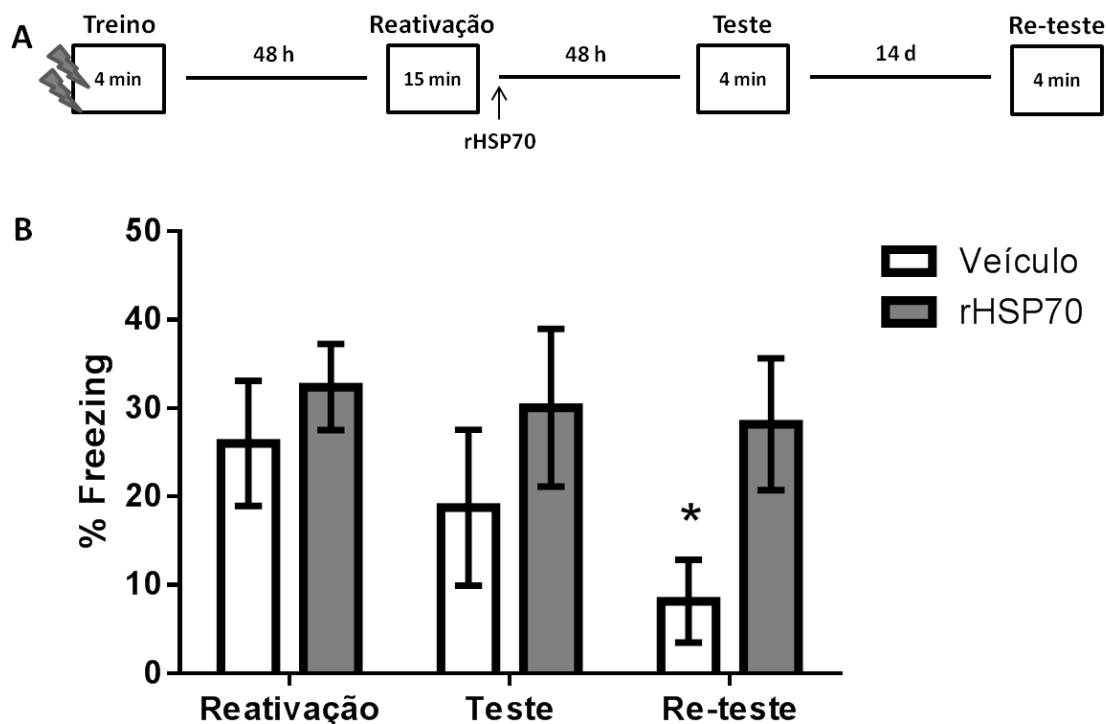


Figura 11. Infusão de rHSP70 após longa reativação. **(A)** Desenho experimental. **(B)** Porcentagem de freezing durante a reativação no CAC de 15 min, no teste 48 h depois da infusão de rHSP70 ou veículo e re-teste 14 dias depois. A infusão foi realizada imediatamente após reativação ($n = 5-6$). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de duas vias de medidas repetidas (Interação $P=0.3246$; Teste $P=0.0691$; Tratamento $P=0.1791$; post hoc de Tukey, $*P<0.05$).

5. CAPÍTULO III

Artigo científico intitulado: *Heat shock therapy with Far-infrared light improves cognitive related deficits in a mouse model of Alzheimer's Disease* — será submetido na revista *Neurobiology of Aging* (I.F. 5.117).

HEAT SHOCK THERAPY WITH INFRARED LIGHT IMPROVES COGNITIVE
RELATED DEFICITS IN A MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

Rossana R. Porto^{1,2,3,4}, Thomas Burton⁵, Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.², Lucas de Oliveira Alvares^{1,3}, R. M. Damian Holsinger⁴

¹Neurobiology of Memory Laboratory, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Postal code: 91509-900.

²Laboratory of Cellular Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Postal code: 90046-900.

³Graduate Program in Neuroscience, Institute of Basic Health Sciences Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Postal code: 90046-900.

⁴Laboratory of Molecular Neuroscience and Dementia, Brain & Mind Centre, The University of Sydney, Camperdown, New South Wales, Australia. Postal code: 2050.

Correspondence to:

Rossana Rosa Porto

¹Neurobiology of Memory Lab, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Postal code: 91509-900.

Email: rossanaefi@hotmail.com

Telephone: 5551991513692

1. INTRODUCTION

According to the World Alzheimer Report, in 2016 there were 47 million people worldwide living with dementia (World Alzheimer Report, 2016) and this number is projected to increase to more than 131 million by 2050. Alzheimer's Disease (AD) is the most frequent form of dementia, accounting for 60-80% of the dementia cases (Alzheimer's Association, 2017). It is characterized by the accumulation of extracellular beta-amyloid plaques and hyperphosphorylated tau (tau tangles) inside neurons. Beta amyloid plaques contribute to cell death by interfering with neuron-to-neuron communication at synapses, while tau tangles block the transport of nutrients and other essential molecules inside neurons (Hardy, 2009). The brain of people with advanced AD shows inflammation (Akiyama et al., 2000; Akiyama et al., 2000), dramatic shrinkage from cell loss, and widespread debris from dead and dying neurons (Pini et al., 2016). Research suggests that the brain changes associated with Alzheimer's may begin 20 or more years before behavioral symptoms appears, what makes it harder to find an effective treatment.

In the last few years, a protein called HSP70 (Heat Shock Protein of 70kDa) has emerged as pharmacological target for neurodegenerative disorders treatment, mainly because of its critical role in protein misfolding (Jinwal et al., 2010). HSP70 is a molecular chaperone that can be synthesized in the nervous system under a variety of insults, such as glucose and oxygen deprivation, glutamatergic excitotoxicity, psychophysiological stress, and elevations in body temperature (Guzhova et al., 2001; Lee et al., 2001). HSP70 localizes mostly in the post-synaptic but also in the pre-synaptic site following a physiologically relevant increase in temperature in the mammalian nervous system, facilitating the repair of stress-induced damage to synaptic proteins (Bechtold & Brown, 2000; Bechtold et al., 2000). Moreover, it also contributes to neuroprotective events at the synapse. Induction of the heat shock response protects the nervous system at the functional level and permits neurotransmission events to proceed at synaptic connections between neurons under stressful conditions (Karunanithi et al., 2002). Manipulation of this cellular stress response offers strategies to protect brain cells from damage induced by ischemia and neurodegenerative diseases (Chen & Brown, 2007; Chen et al., 2009).

HSP70 can be cytoprotective by preventing protein aggregation and mutation, but it also acts as a signaling molecule blocking the inflammation and apoptosis cascade

(blocking NF- κ B transcription factor, JNK pathway and reducing cytochrome-c release, respectively), oxidative stress, and consequently, neuronal death (Buzzard et al., 1998; Lee et al., 2001). Interestingly, neurons in the hippocampus and entorhinal cortex, which are highly affected in AD, show comparatively low levels of HSP70 when compared to other structures like the spinal cord (Chen & Brown, 2007; Manzerra et al., 1997), suggesting that elevations in HSP70 levels in those regions could be a target for the treatment of cognitive impairments in AD.

In neuronal cultures, overexpression of HSP70 is able to protect neurons from amyloid- β (A β) toxicity (Magrané et al., 2004). Furthermore, when microtubules are destabilized, HSP70 engages tau protein and helps its stabilization, establishing a protective conformation (Jinwal et al., 2010). Treatment with exogenous HSP70 (intranasally) shows a therapeutic effect in mouse models of AD, normalizing neuronal density in the hippocampus and cortex, diminishing A β peptide and plaque formation accumulation, and improving spatial learning (Bobkova et al., 2014).

The use of heat therapy (whole body heat shock) has become an increasingly regular practice around the world, with the simple aim to elevate body temperature, and consequently, elevate HSP70 expression. Several studies have shown benefits of heat therapy for people with metabolic and cardiovascular disease and that it is tightly associated with the role of HSP70 in blocking inflammation (Beever, 2010; Chung et al., 2008; Crinnion, 2011; Gupte et al., 2009; Hooper, 1999; Karpe & Tikoo, 2014). Moderate to high frequency of sauna bathing was also associated with lowered risks of dementia and Alzheimer's disease (Laukkanen et al., 2017). Studies using infrared therapy in AD showed that either acute (weeks; Michalikova et al., 2008) or chronic (months; Grillo et al., 2013; Purushothuman et al., 2015; Purushothuman et al., 2014) exposure reduces β -amyloid plaques, neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein, inflammation and oxidative stress, together with increased ATP levels and improved overall mitochondrial function (mainly targeting cytochrome c oxidase, a key enzyme of the mitochondrial respiratory chain that is a photoacceptor of light in the infrared range) (Hamblin, 2016, 2018). Considering that the total estimated worldwide cost of dementia is US\$818 billion (Alzheimer's Association, 2017) and that there is no effective treatment for AD, heat therapy could be a great valuable intervention since it is a truly low cost non-pharmacological treatment that could be easily applicable in the clinic.

The aim of our study was to verify the influence of chronic heat shock treatment in the 5XFAD mouse model of AD, which is a transgenic mice that presents 5 different mutations and recapitulates a variety of AD features, including working memory impairment, reduced anxiety, astrogliosis and microgliosis that are proportional to extensive extracellular A β deposition in hippocampal and cortical areas beginning at 2 months of age, and selective neuron loss, making it a suitable research model for early onset AD (Maarouf et al., 2013; Oakley et al., 2006; Ohno et al., 2007).

2. METHODS

2.1 Animals

We used 5XFAD female and male mice (3 and 8 months) which is a double transgenic APP/PS1 mouse model for AD. These transgenic mice co-overexpress 5 Familial Alzheimer's Disease (FAD) mutations, the Swedish (K670N, M671L), Florida (I716V), and London (V717I) mutations in the human APP and M146L and L286V in the human PSEN1. Expression of both transgenes is regulated by neural-specific elements of the mouse Thy1 promoter to drive overexpression in the brain. 5XFAD mice were bred in our animal facility, housed four to five per cage (IVC) and maintained under constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with automatically controlled photoperiods (12 h light/12 h dark) and 60 % relative humidity. A standard commercial laboratory diet was provided *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with local and national guidelines for animal care and the project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Sydney (#2015/915).

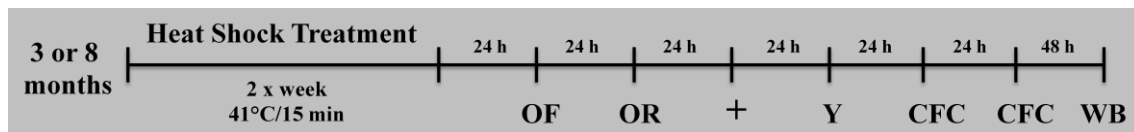


Figure 1. Experimental time line. The animals started the heat treatment with 3 or 8 months of age, where they were kept at 41°C body temperature for 15 minutes, two times per week. One day after the last heat shock session, the behavior tests started, beginning with open field (OF), object recognition (OR), plus maze (+), y maze (Y) and contextual fear conditioning (CFC) followed by euthanasia 48 hours after the last test. Hippocampus and prefrontal cortex were removed for western blot (WB).

2.2 Heat shock treatment

We used a red light (Philips 175 W PAR38, where 90% of the energy is transmitted as infrared, suppl.1AB) to mimic an infrared sauna (FIR sauna). The infrared lamp directly heat an object or person at which they are directed without heating the surrounding air, what makes them highly efficient heat sources. The mice were anesthetized with 1-2% isoflurane, to lose the control of their body temperature. The initial temperature was recorded and they were put in the anesthetic chamber under the red light (60 cm distance from the mice). When their rectal temperature reached 41°C , they were kept in that temperature ($41^\circ\text{C} \pm 0.5$) for 15 minutes. Final and

maximum temperature were recorded after every session.. The controls had the same protocol but no light exposure, rectal temperature was kept around $36^{\circ}\text{C}\pm 0.5$. Body weight and length was measured in the beginning (3 or 8 months) and the end (5 or 10 months) of the intervention for Lee

Index calculation: $\sqrt[3]{\frac{\text{weight(g)} \cdot 1000}{\text{length(cm)}}}$.

2.3 Behavior tests

2.3.1 Open Field (OF)

The animals were free to explore the arena (40 x 40 x 20 mm) for 10 minutes (used also as the first day of adaptation for the object recognition test). The test was recorded to be analyzed later with a tracking software (TopScan, CleverSys Inc.). The apparatus was cleaned with 70% alcohol and allowed to dry between animals. The parameters analyzed were the total distance and time in the center and border of the open field.

2.3.2 Object Recognition (OR)

One day after the habituation in the open field, the animals were put again in the apparatus and were free to explore the space for 10 minutes, with two equal objects (two culture flasks or two lego blocks), during the training session. The test session was one hour later where one of the objects was replaced by a novel object (lego or flask). The apparatus and objects were cleaned with 70% alcohol and allowed to dry between animals. Exploration of each object was analyzed in the training and test session characterized by the amount of time the animal was sniffing the object. Exploration index was calculated as $(\text{novel object})/(\text{novel object} + \text{familiar object})$.

2.3.3 Plus Maze

The two open arms lie across from each other measuring 25 x 5 x 5 cm and perpendicular to two closed arms measuring 25 x 5 x 16 cm with a center platform (5 x 5 x 0.5 cm). The closed arms have a high wall (16 cm) to enclose the arms whereas the open arms have no side wall, 70 cm high from the floor. Mice were placed in the central platform facing the closed arm and their behavior recorded for 5 min. The criterion for arm visit was considered only when the animal decisively moved all its four limbs into an arm. The maze was cleaned with 70% ethanol after each trial. We analyzed the time spent in the open and closed arms, the number of entries into the open and closed arms and the risk assessment was analyzed as the time spending with at least the head out of the closed arms in direction to the open arms.

2.3.4 Y Maze

The Y maze was composed of three equally spaced arms (120°, 41 cm long and 15 cm high) with 5 cm wide floor. Each mouse was placed in one of the arm compartments and was allowed to move freely until its tail completely enters another arm. The sequence of arm entries was manually recorded, the arms being labeled A, B, or C. An alternation is defined as entry into all three arms consecutively, for instance if the animal makes the following arm entries: A, C, B, C, A, B, C, A, C, A, B, C, A, in this example, the animal made 13 arm entries 8 of which are correct alternations. The number of maximum spontaneous alternations is then the total number of arms entered minus two, and the percentage alternation is calculated as (actual alternations / maximum alternations) x 100. For each animal the Y-maze testing was carried out for 5 minutes. The apparatus was cleaned with 70% alcohol and allowed to dry between animals.

2.3.5 Contextual Fear Conditioning (CFC)

The animals were placed in the fear conditioning chamber (13 x 17 cm) and allowed to explore the context for 3 minutes. Two 0.5 mA footshock were applied, separated by 30 s, with 2 s duration each. Hippocampus-dependent contextual fear memory formation was evaluated by scoring freezing behavior (the absence of all but respiratory movement) for 5 min when the mice were placed back into the same conditioning chamber 24 hours after the training.

2.4 Western Blot

In order to examine protein immunodetection, both dorsal hippocampi and prefrontal cortex were extracted and homogenized in 350 µL of 0.1 % (w/v) SDS buffer. After protein assay, samples were diluted in Laemmli's gel loading buffer [50 mM Tris, 10% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 10% (v/v) 2-mercaptoethanol and 2 mg/mL bromphenol blue] in a ratio of 1:1, boiled for 5 min and electrophoresed in an 8.5% (for HSP70) or 12% (for GSK3, NF-κB, pCREB and BDNF) polyacrylamide gel. A total of 10 µg of protein was applied in each well and ran at 40 mA for 1 hour. The proteins were transferred onto nitrocellulose membranes at 380 mA for 25 minutes using a semidry electrotransfer apparatus. The membranes were incubated in blocking solution (1% dry milk in TBST 1x) for 1 hour in room temperature. The incubations with the primary antibodies were: monoclonal rabbit anti-HSP70 (EPR16892, ab181606) in a concentration of 1:2000 diluted in TBST solution for 1 hour in room temperature; monoclonal mouse anti-pGSK3 (alpha + beta phospho Y216 + Y279, M132, ab45383) in a concentration of 1:1000 diluted in TBST solution overnight at 4°C; monoclonal rabbit anti-pCREB (phospho S133,

E113, ab32096) in a concentration of 1:1000 diluted in TBST solution overnight at 4°C; monoclonal rabbit anti-BDNF (EPR1292, ab108319) in a concentration of 1:1000 diluted in TBST solution overnight at 4°C; polyclonal rabbit anti-NF- κ B p65 (ab16502) in a concentration of 1:1000 diluted in TBST solution overnight at 4°C; monoclonal mouse anti-Tubulin in a concentration of 1:200.000 diluted in blocking solution overnight at 4°C. Membranes were washed 3 times for 15 minutes in TBST and incubated with the secondary antibody (anti-rabbit or anti-mouse) in a concentration of 1:20.000 diluted in TBST in room temperature for 1 hour. Membranes were washed again for 3 times and revelation was made with ECL for 90 seconds in the light following 8 minutes in the dark into a film; for tubulin it was 30 seconds in the dark. The film stayed in the developer until the bands were visualized, washed in distilled water and put in the fixer until it got black. Quantification of the bands were made with ImageJ and data are shown as the mean \pm S.E.M. of protein expression normalized to tubulin.

2.5 Statistical Analysis

Data were analyzed through statistical software GraphPad prism 6. Unpaired Student's *t* test was used for behavioral and molecular analysis. We used Two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc for Lee index before and after the treatment, and between training and test session in the object recognition test. The level of significance used was $P < 0.05$.

3. RESULTS

2.1 Heat shock treatment effect on anxiety-like behavior

It is well known that 5XFAD mice have reduced anxiety levels (Jawhar et al., 2012), a clinical factor that can be present in 20 to 35% of AD patients, manifested by disinhibition and inappropriate euphoria (Chung & Cummings, 2000). For that reason we analyzed anxiety-like behavior in the open field and plus maze test. Heat shock treatment for two months didn't have any effect on the time spent in the center (Figure 2A; $t_{(22)}= 0.7838$, $P=0.4415$), time spent in the border (Figure 2C; $t_{(22)}= 0.7838$, $P=0.4415$) and locomotion (Figure 2E; $t_{(22)}= 0.1702$, $P=0.8664$) of mice that started the treatment with 3 months of age in the open field. There was also no effect when analyzing the time spent in the center (Figure 2B; $t_{(26)}= 0.8672$, $P=0.3937$), time spent in the border (Figure 2D; $t_{(26)}= 0.8579$, $P=0.3988$) and locomotion (Figure 2F; $t_{(26)}= 0.2115$, $P=0.8342$) of mice that started the treatment with 8 months of age. Separated analysis of male and female is available in the supplementary material (Suppl 2).

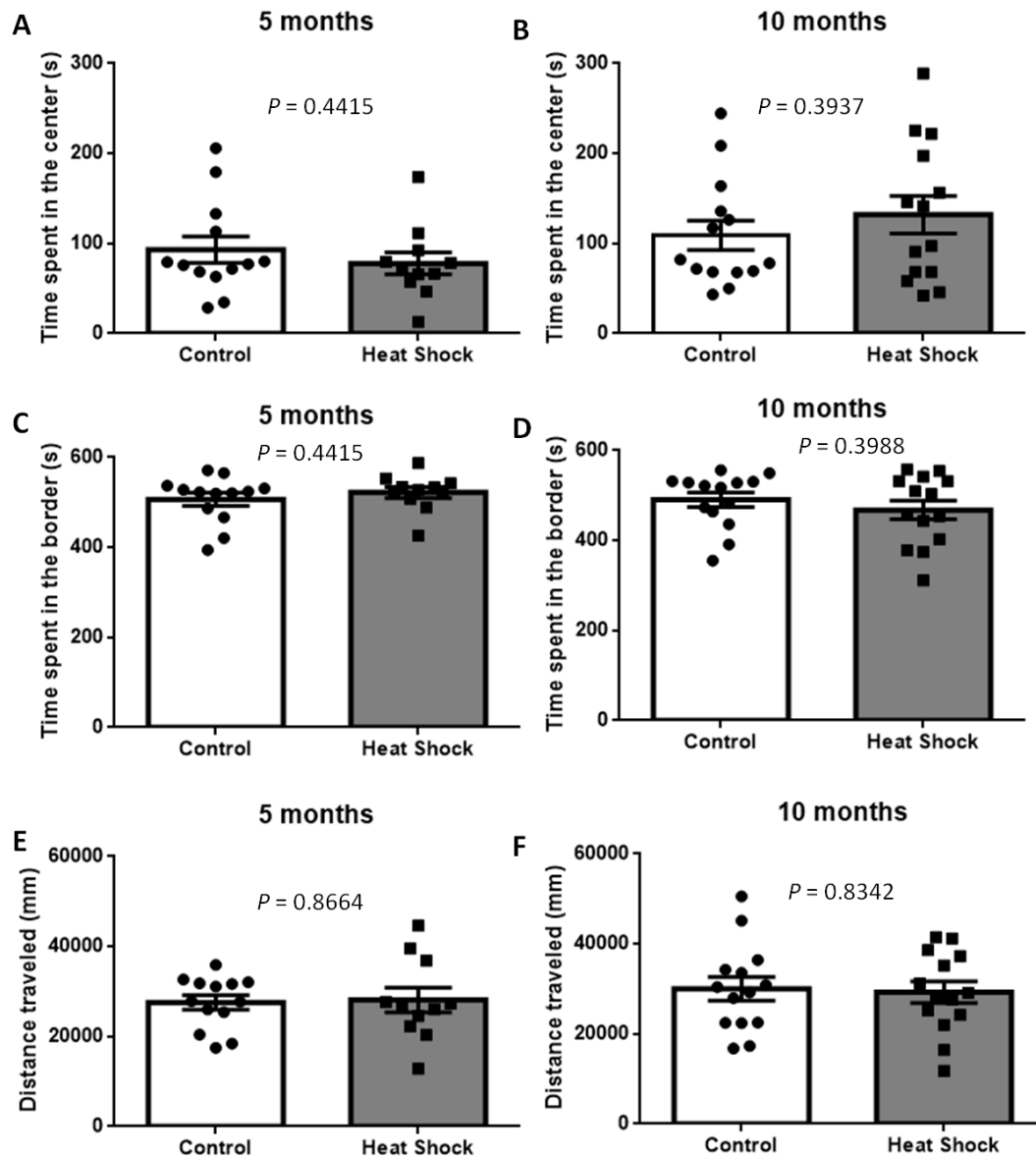


Figure 2. Heat Shock treatment does not influence behavior and locomotion of 5XFAD mice in the open field. Time spent in the center of the open field after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (A) or 10 (B) months of age. Time spent in the border of the open field after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (C) or 10 (D) months of age. Total distance traveled in the open field after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (E) or 10 (F) months of age. Student's *t* test ($P > 0.05$). Data are the means \pm S.E.M.

When we analyzed anxiety behavior in the plus maze we didn't also find any difference between control and treated animals in the time spent in the open arms (Figure 3A; $t_{(22)} = 0.6807$, $P = 0.5032$), time spent in the closed arms (Figure 3E; $t_{(22)} =$

0.4264, $P=0.6740$), entries in the open arms (Figure 3C; $t_{(21)}= 0.6642$, $P=0.5138$) or entries in the closed arms (Figure 3G; $t_{(22)}= 1.571$, $P=0.1305$), neither for risk assessment (Figure 3I; $t_{(22)}= 0.2536$, $P=0.8024$) at 5 months of age. Although we also didn't see any difference in the plus maze test for time spent in the open arms (Figure 3B; $t_{(26)}= 1.822$, $P=0.08$), time spent in the closed arms (Figure 3F; $t_{(26)}= 1.883$, $P=0.0709$), entries in the open arms (Figure 3D; $t_{(26)}= 0.8780$, $P=0.3880$) or entries in the closed arms (Figure 3H; $t_{(26)}= 0.4239$, $P=0.6752$), neither for risk assessment (Figure 3J; $t_{(26)}= 1.367$, $P=0.1834$) at 10 months of age, when we separated by sex, females showed a better response to the treatment. The treatment had an effect in the time spent in the open arms (Suppl. Fig.3B; $t_{(15)}= 2.428$, $P=0.0282$), time spent in the closed arms (Suppl. Fig.3F; $t_{(15)}= 2.266$, $P=0.0387$) and entries in the open arms (Suppl. Fig.3D; $t_{(14)}= 2.679$, $P=0.0180$) only in females.

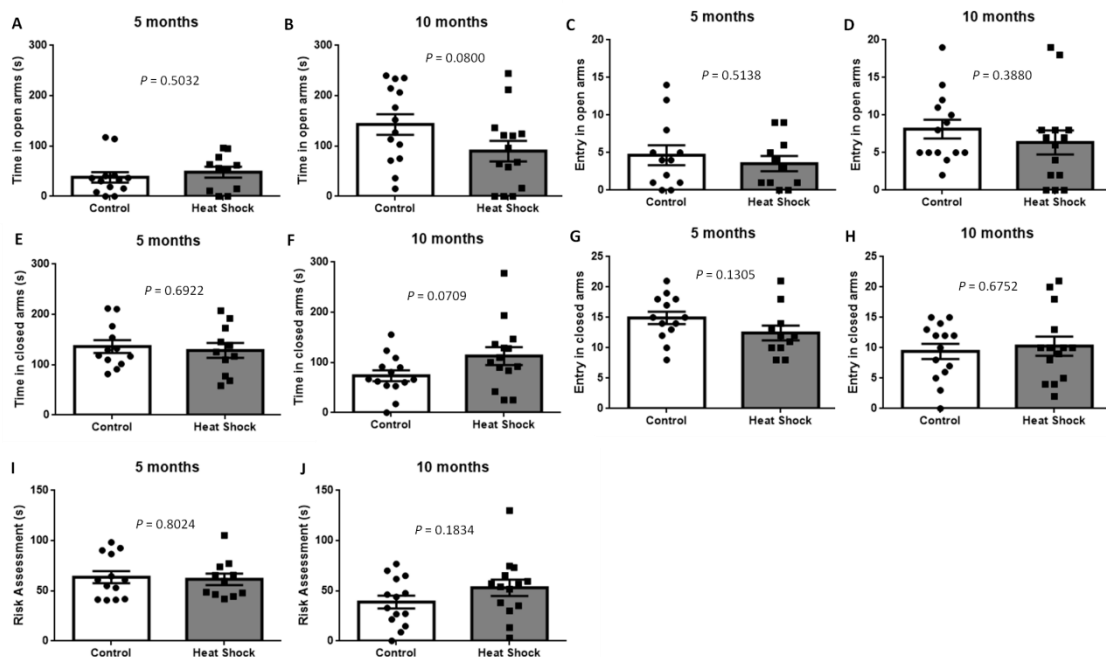


Figure 3. Heat Shock treatment effect on anxiety-like behavior in 5XFAD mice. Entries and time spent in the open arms of the plus maze after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (A, C) or 10 (B, D) months of age. Number of entries and time spent in the closed arms of the plus maze after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (E, G) or 10 (F, H) months of age. Risk assessment time in the plus maze after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (I) or 10 (J) months. Student's t test ($P>0.05$). Data are the means \pm S.E.M.

2.2 Heat shock treatment improves memory recognition and long term fear memory

Impairments in memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD AD model (Kimura & Ohno, 2009). Memory deficits start at four months with a substantial increase at six months of age (Girard et al., 2014; Jawhar et al., 2012; Kimura & Ohno, 2009; Oakley et al., 2006). We first analyzed hippocampus-dependent spatial working memory in the Y maze and we didn't see any difference between control and heat shock treated animals at 5 (Figure 4A; $t_{(22)}= 1.245$, $P=0.2264$) or 10 (Figure 4B; $t_{(19)}= 0.3399$, $P=0.7377$) months of age in the spontaneous alternation. However, the treatment had a huge effect improving recognition memory at 5 (Figure 5A; $t_{(22)}= 3.222$, $P=0.0039$) and 10 (Figure 5B; $t_{(26)}= 3.420$, $P=0.0011$) months of age represented as the exploration index in the test session and also compared to the training session, showing that only the treated animals were able to learn the task at 5 (Figure 5C; $t_{(22)}= 2.762$, $P=0.0227$) and 10 (Figure 5E; $t_{(25)}= 0.2027$, $P=0.0004$) months. Separated analysis of male and female is available in the supplementary material (Suppl 4).

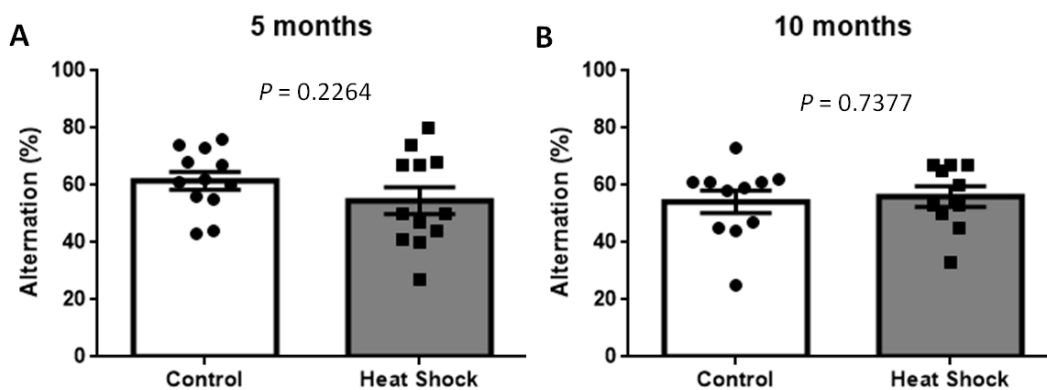


Figure 4. Heat Shock treatment does not influence spontaneous alternation in the Y maze. Percentage of alternation in the Y maze after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (A) or 10 (B) months of age. Student's t test ($P>0.05$). Data are the means \pm S.E.M.

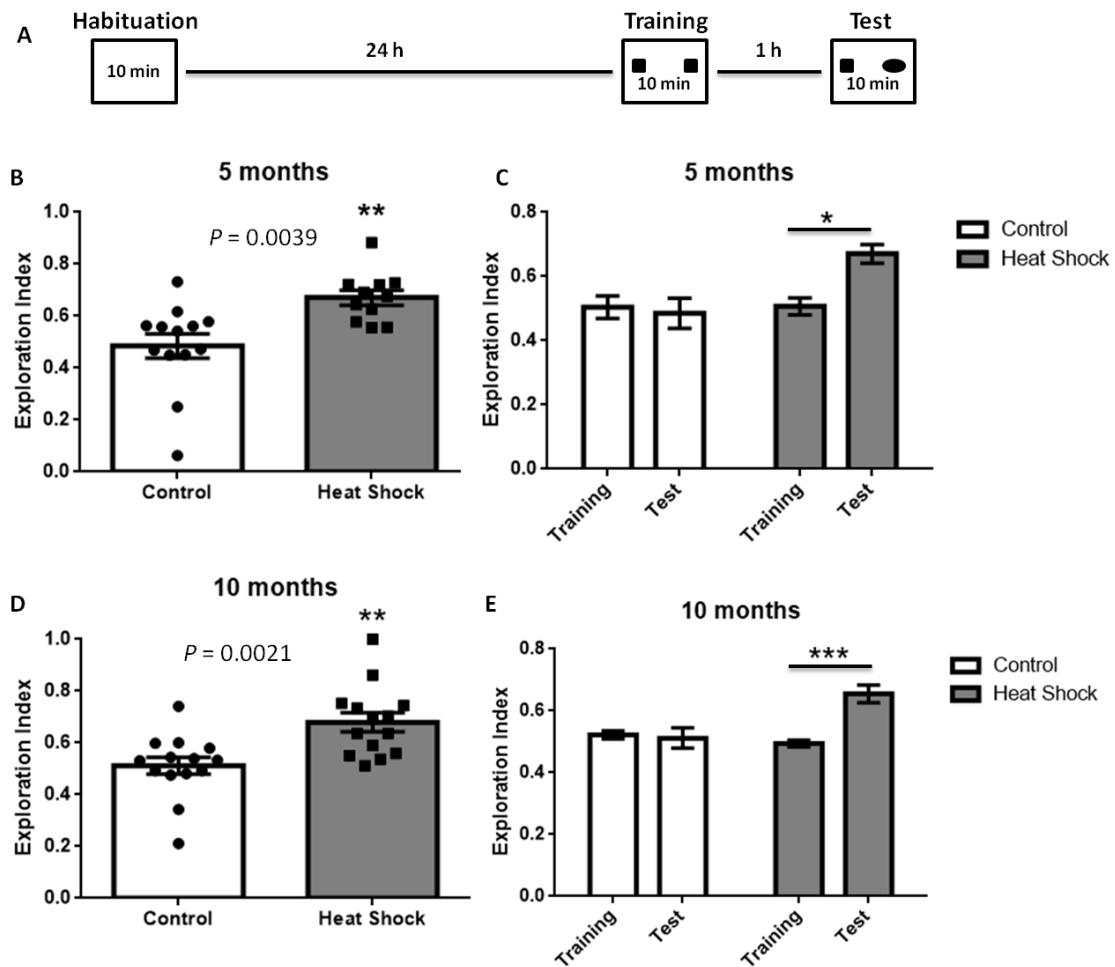


Figure 5. Heat Shock treatment improves memory recognition in 5XFAD mice. Exploration index in the test session after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (**B**) or 10 (**D**) months of age. Student's *t* test (** $P < 0.01$). Exploration index during the training and test session in the control and heat shocked group at 5 (**C**) or 10 (**E**) months of age. Two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Data are the means \pm S.E.M.

The treatment was also effective in improving the hippocampus-dependent fear memory, enhancing freezing levels in the treated animals at 5 (Figure 6A; $t_{(19)} = 3.118$, $P = 0.0057$) and 10 (Figure 6B; $t_{(24)} = 3.295$, $P = 0.0031$) months of age in the test session one day after the contextual fear conditioning training. Separated analysis of male and female is available in the supplementary material (Suppl 5 and 6).

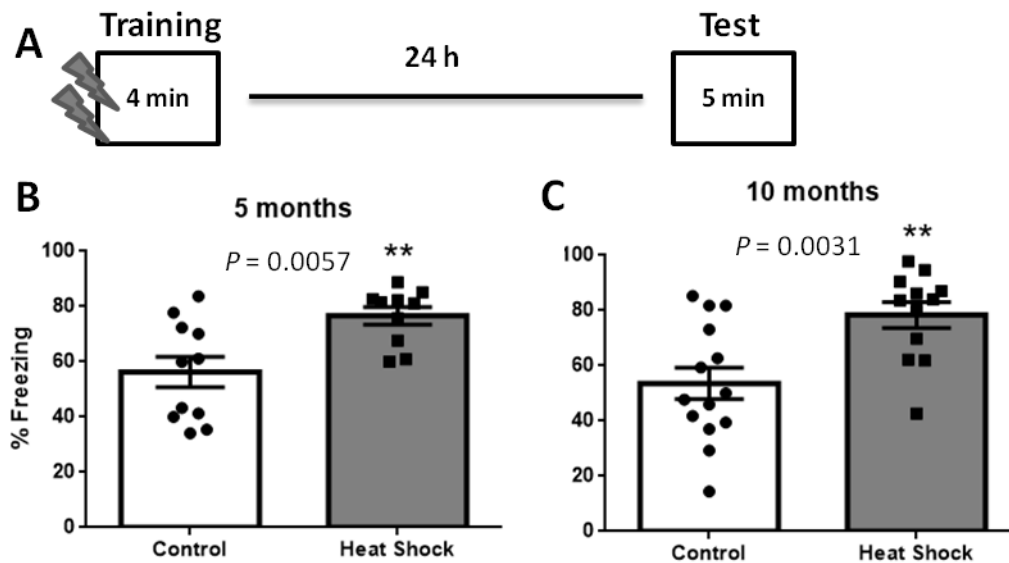


Figure 6. Heat Shock treatment improves long-term memory in 5XFAD mice. **A.** Experimental design of the fear conditioning test. Percentage of freezing in the test session after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (**B**) or 10 (**D**) months of age. Student's *t* test (** $P < 0.01$). Data are the means \pm S.E.M.

2.3 Heat shock treatment enhances HSP70 in brain regions associated with learning and memory

Since one of the greatest benefits of the heat shock treatment is the elevation of HSP70 protein content, we evaluated HSP70 by western blot in the dorsal hippocampus and prefrontal cortex 48 hours after the last behaviour test. HSP70 was enhanced by heat shock treatment in the hippocampus at 5 (Figure 7B; $t_{(8)} = 2.393$, $P = 0.0437$) and 10 (Figure 7C; $t_{(6)} = 3.939$, $P = 0.0076$) months of age and in the prefrontal cortex only at 10 months (Figure 7E; $t_{(6)} = 5.067$, $P = 0.0023$). Those results indicate that heat shock treatment is able to enhance HSP70 basal levels in the brain areas most affected by AD and there are crucial for memory formation.

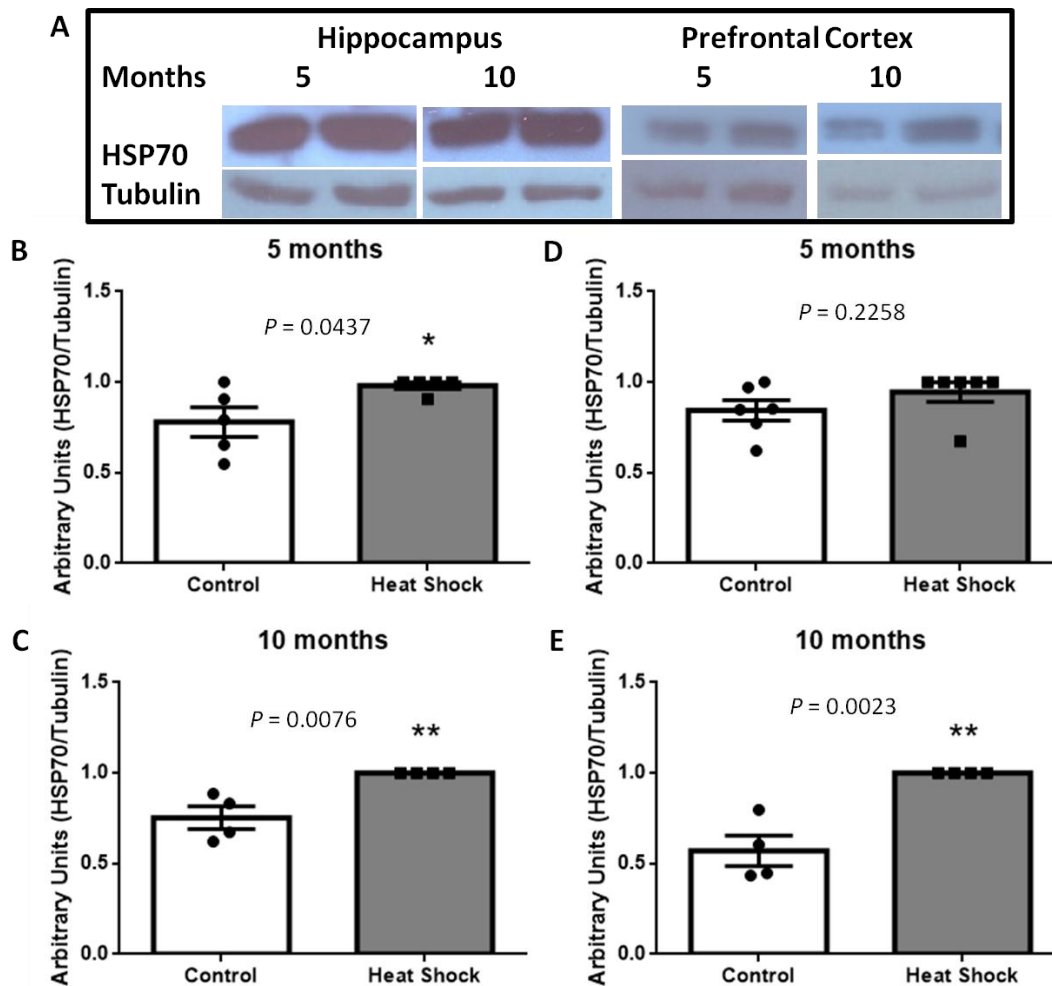
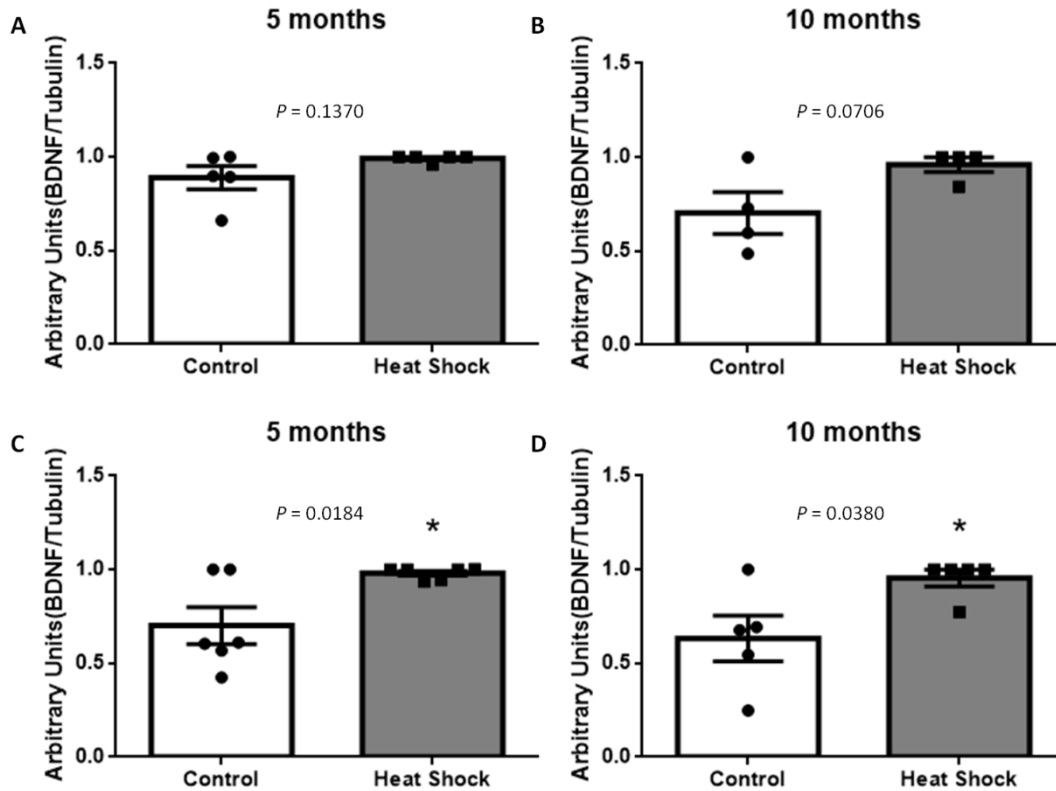


Figure 7. Heat Shock treatment enhances HSP70 content in 5XFAD mice. **A.** Representative bands of HSP70 and Tubulin. HSP70 immunocontent in the dorsal hippocampus of mice at 5 (**B**) or 10 (**C**) months of age after two months of heat shock treatment or control. HSP70 immunocontent in the Prefrontal cortex of mice at 5 (**D**) or 10 (**E**) months of age after two months of heat shock treatment or control. Student's *t* test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Data are the means \pm S.E.M.

2.4 Heat shock treatment enhances plasticity related proteins in the brain

For the formation of a long term memory, it is necessary the activation of CREB, which in turn mediates the induction of several gene transcriptions, including BDNF (Johansen et al., 2011). We evaluated BDNF protein content by western blot in the dorsal hippocampus and prefrontal cortex 48 hours after the last behaviour test. There was no difference at 5 (Figure 8A; $t_{(8)} = 1.652$, $P = 0.1370$) or 10 months of age (Figure 8B; $t_{(6)} = 2.195$, $P = 0.0706$) in the hippocampus, however, BDNF was enhanced in the prefrontal cortex both at 5 (Figure 8C; $t_{(10)} = 2.813$, $P = 0.0184$) and 10 months

(Figure 8D; $t_{(8)} = 2.483$, $P = 0.0380$) in the group that received heat shock treatment. Although BDNF was not elevated in the hippocampus, there was a positive correlation between BDNF and HSP70 content at 5 (Suppl.7A; $R^2 = 0.8382$, $P = 0.0002$) and 10 months (Suppl.7B; $R^2 = 0.5364$, $P = 0.0068$). We also evaluated CREB phosphorylation in the hippocampus and it was enhanced by heat shock treatment at 10 months (Figure 8F; $t_{(8)} = 5.642$, $P = 0.0005$).



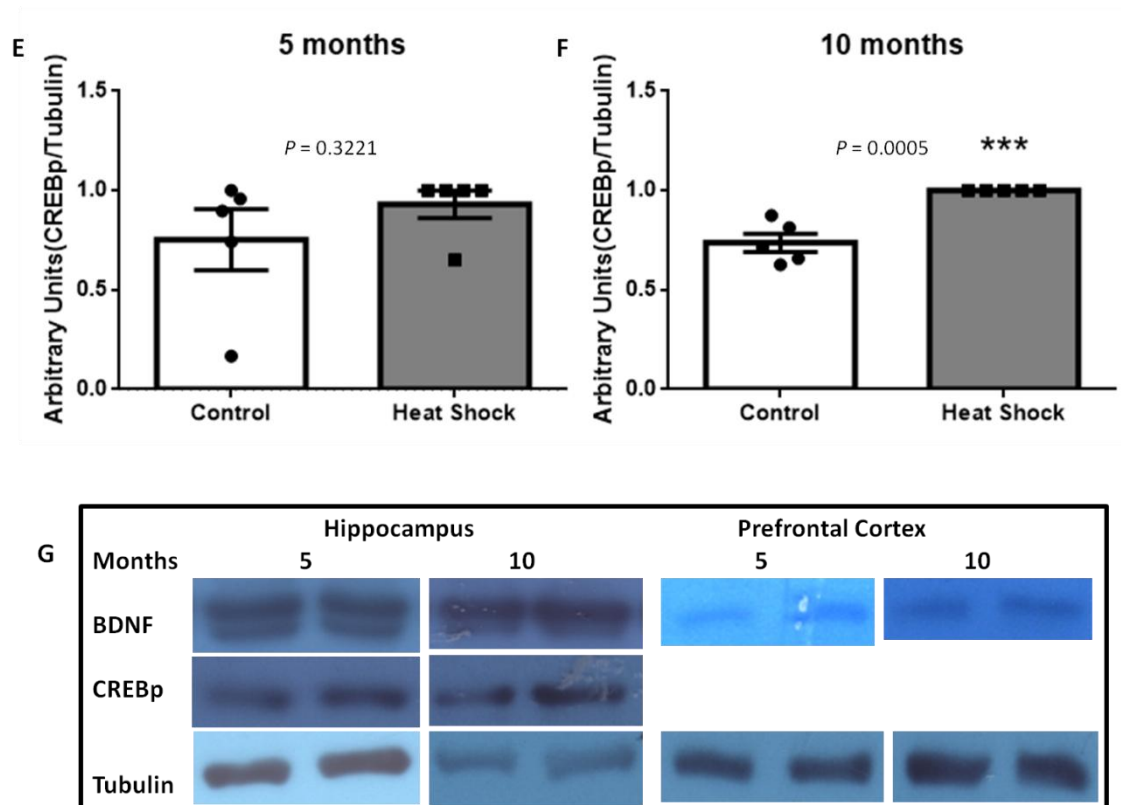
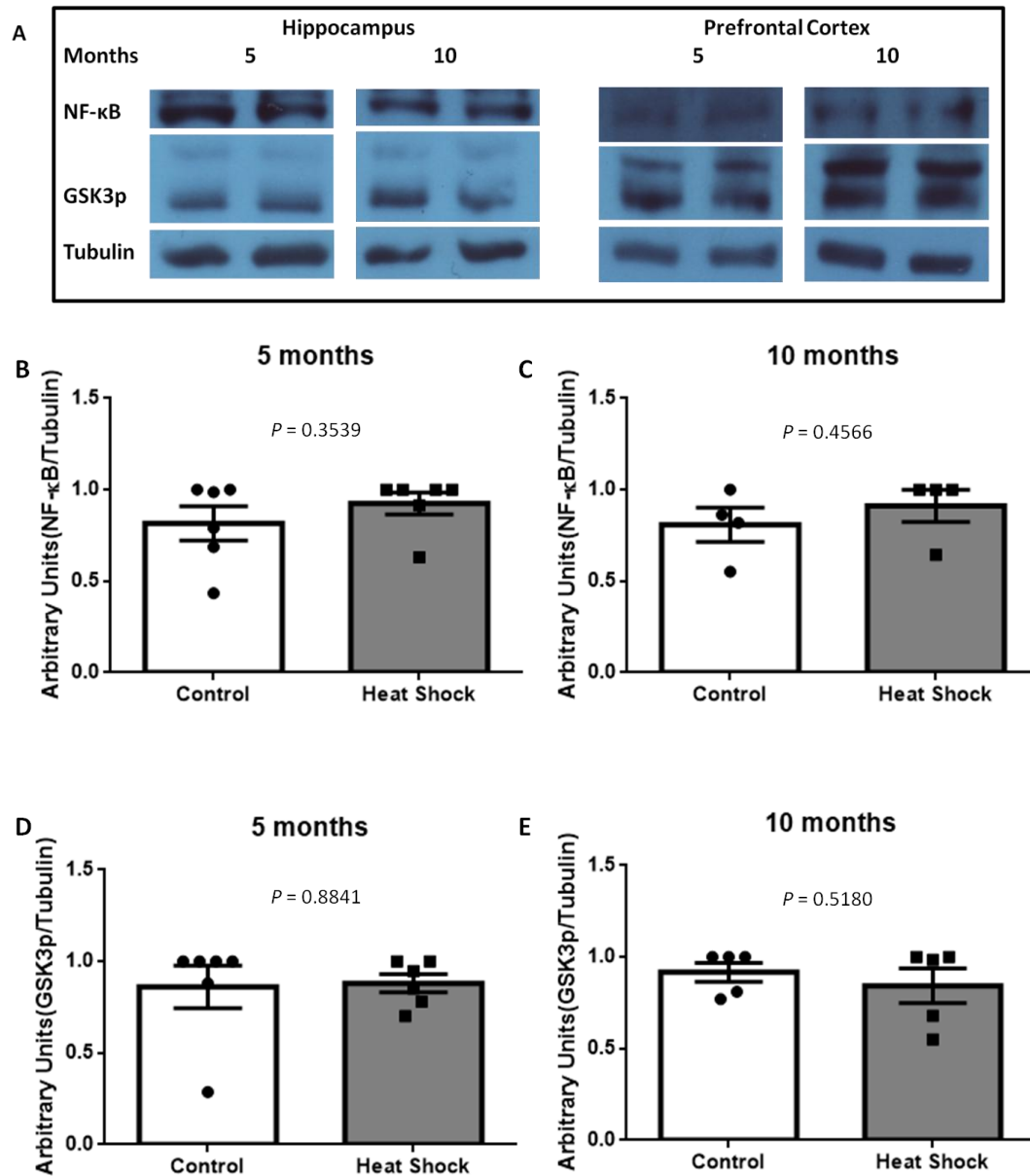


Figure 8. Heat Shock treatment enhances BDNF and CREBp in 5XFAD mice. BDNF immunocontent in the dorsal hippocampus of mice at 5 (**A**) or 10 (**B**) months of age and in the Prefrontal cortex of mice at 5 (**C**) or 10 (**D**) months of age after two months of heat shock treatment or control. CREBp immunocontent in the dorsal hippocampus of mice at 5 (**E**) or 10 (**F**) months of age after two months of heat shock treatment or control. **G.** Representative bands of BDNF, CREBp and Tubulin. Student's *t* test (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$). Data are the means \pm S.E.M.

2.5 Heat shock treatment does not alter pGSK3 and NF- κ B content in the brain

Given the molecular role of GSK3 in destabilizing microtubules and NF- κ B activation in inflammation in AD, we evaluated total NF- κ B and pGSK3 protein content by western blot in the dorsal hippocampus and prefrontal cortex 48 hours after the last behaviour test. There was no difference in NF- κ B content in the hippocampus at 5 (Figure 9B; $t_{(10)} = 0.9721$, $P = 0.3539$) or 10 (Figure 9C; $t_{(6)} = 0.7955$, $P = 0.4566$) months of age, neither in the prefrontal cortex at 5 (Figure 9F; $t_{(10)} = 0.2121$, $P = 0.8363$) or 10 months (Figure 9G; $t_{(6)} = 1.188$, $P = 0.2797$). We also didn't see statistical difference in GSK3 activation in the prefrontal cortex at 5 (Figure 9H; $t_{(10)} = 0.3293$, $P = 0.7487$) or 10 months (Figure 9I; $t_{(8)} = 0.4075$, $P = 0.6943$). Although there was no change in the

hippocampus pGSK3 at 5 (Figure 9D; $t_{(10)} = 0.1494$, $P = 0.8841$) or 10 months (Figure 9E; $t_{(8)} = 0.6742$, $P = 0.5180$), there was a negative correlation with HSP70 content at 10 months (Suppl.7D; $R^2 = 0.5132$, $P = 0.0088$). The more HSP70 content in the hippocampus, lesser was the GSK3 activation in the same region.



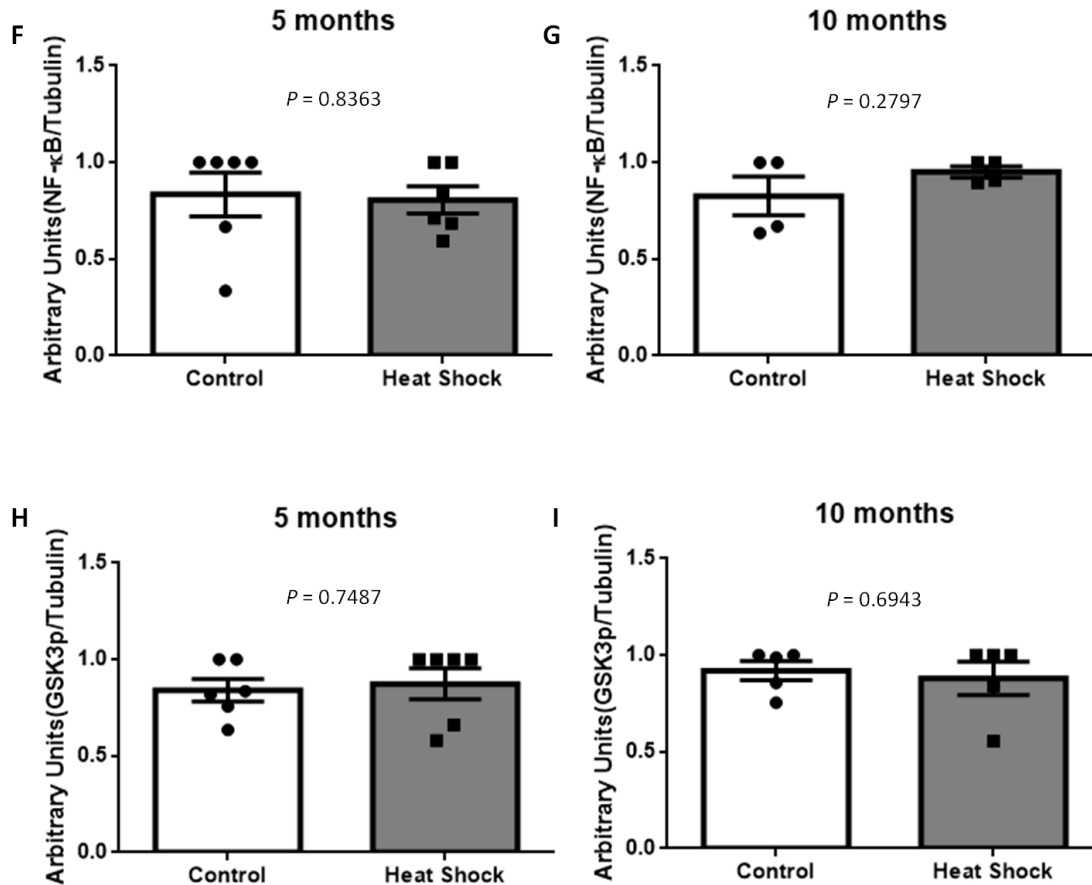


Figure 9. Heat Shock treatment does not change NF-κB and GSK3 levels in 5XFAD mice. **A.** Representative bands of NF-κB, GSK3 and Tubulin. NF-κB immunocontent in the dorsal hippocampus of mice at 5 (**B**) or 10 (**C**) months of age after two months of heat shock treatment or control. GSK3 immunocontent in the dorsal hippocampus of mice at 5 (**D**) or 10 (**E**) months of age after two months of heat shock treatment or control. NF-κB immunocontent in the Prefrontal cortex of mice at 5 (**F**) or 10 (**G**) months of age after two months of heat shock treatment or control. GSK3 immunocontent in the Prefrontal cortex of mice at 5 (**H**) or 10 (**I**) months of age after two months of heat shock treatment or control. Student's *t* test ($P > 0.05$). Data are the means \pm S.E.M.

4. DISCUSSION

Alzheimer's disease is the most common and severe age-associated neurodegenerative disorder for which there is currently no effective therapeutic intervention. Even modest advances strategies that lead to small delays in the onset and progression of AD can significantly reduce the global burden of this disease, and for that reason, all efforts to find an effective disease-modifying treatment are important (Brookmeyer et al., 2007).

In this study, we used far-infrared heat therapy as a non-pharmacological candidate for the treatment of behavior related phenotypes in mice model of AD. Traditional saunas use heaters to heat the air to approximately 80-100°C, which then heats the occupant, mainly via convection, which can cause some discomfort. In contrast, infrared light penetrates more deeply than warmed air, where users develop a more vigorous sweat at a lower temperature (approximately 60°C) than they would in traditional saunas, providing a more comfortable and relaxing experience (Beever, 2009).

Our aim was to increase body temperature to 41°C, since it has been shown that such treatment induces heat shock proteins of 70 kDa synthesis (Bechtold et al., 2000; Chen & Brown, 2007b). Two months of heat treatment was able to increase HP70 protein levels in the hippocampus of 5XFAD mice when started at 3 or 8 months of age, and in the prefrontal cortex at 10 months of age. Both structures are highly affected in AD, with high levels of A β deposition and hyperphosphorylated tau, which impairs cognitive function since they are crucial for memory formation (Bakkour et al., 2013; Salat et al., 2001). It is well known that the increase of HSP70 expression inhibits tau aggregation, promote clearance of A β oligomers, and improve the corresponding disease symptoms (Hoshino et al., 2011; Magrané et al., 2004). Induction of HSP70 levels by heat shock protects against AD like hyperphosphorylation of tau in PC12 cells (Kirby et al., 1994) and significantly reduces A β oligomers in a heat shock time dependent manner *in vivo* (Wu et al., 2010). HSP70 can also act modulating both Apaf-1 caspase-dependent and AIF caspase-independent pathways, resulting in attenuation of apoptosis and ultimately inhibition of neuronal cell death (Sabirzhanov et al., 2012).

AD is usually diagnosed by cognitive impairments, which is the mainly reason why patients seek for medical help. It is characterized by progressive impairment in episodic memory, as well as problems with recognition and working memory,

manifesting as forgetting (Gallagher & Koh, 2011; Jahn, 2013). 5XFAD mice present similar cognitive deficits. They show impairments in work memory, with reduced alternation percentage in the Y maze with 5 months, which became more pronounced at 12 months (Jawhar et al., 2012; Oakley et al., 2006). In our study, heat shock treatment was not able to improve alternation in the Y maze either starting at 5 or 10 months when comparing to control. One thing that should be taken into account is that our animals may not represent other studies and they may not have developed impairments in that task at the age we analyzed. Unfortunately, we didn't have a wild type group to compare, but an indication of this is that there was no worsening in control animals from 5 to 10 months of age.

Memory dysfunctions in spatial memory and object recognition memory were apparently detected at 4 months old 5XFAD (Joyashiki et al., 2011) while (Ohno et al., 2007) reported reduced levels of contextual learning together with LTP reduction in 5XFAD mice at 6 months of age. Due to that, we analyzed hippocampus-dependent memory to test whether heat shock treatment would be able to improve the previous deficits found in 5XFAD mice. Heat shock ameliorated short and long term memory consolidation, measured by novel object recognition and contextual fear conditioning tests, respectively, at both 5 and 10 months of age. Consistent with our results, a study with transgenic mice expressing APP^{sw} showed less cognitive deficit when they were crossed with transgenic mice overexpressing HSP70. Although it didn't affect the production of A β , the mice displayed lower levels of A β plaque deposition and reduced synaptic and neuronal loss. HSP70 overexpression also upregulated the expression of A β -degrading enzyme and TGF1 both *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that overexpression of HSP70 in mice suppresses not only the pathological but also the functional phenotypes of AD (Hoshino et al., 2011). In another study, using intranasally-administered HSP70 in mouse models of AD for one month, the authors found that it could rapidly enter the afflicted brain regions and mitigates multiple AD-like morphological and cognitive abnormalities, enhancing spatial memory (Bobkova et al., 2014).

We also found that heat shock treatment was also able to increase plasticity related proteins in the brain. BDNF levels were increased at 5 and 10 months in the prefrontal cortex when compared to the respective controls. In the hippocampus, although there were no differences between groups, the BDNF content was positively correlated with HSP70 levels in this same structure (suppl.7). BDNF is one of the target

genes induced in the formation of long-term memory and is necessary for it to be consolidated (Bekinschtein et al., 2008; Bekinschtein et al., 2008; Bekinschtein et al., 2014). A study using geldamycin, which is an inducer of heat shock proteins, including HSP70, showed a direct relationship of this protein with elevations in BDNF levels, since it was able to elevate its values in the hippocampus, preventing the depressive-like behavior in mice (Hashikawa et al., 2017). We also found pronounced activation of CREB in the hippocampus of treated animals at 10 months of age. As we know, CREB phosphorylation is essential for the transcription of several genes involved in memory consolidation (Alberini, 2009; Johansen et al., 2011; Kandel, 2012; Roberson et al., 1999) and that HSP70 is a potential target gene due to the presence of a CRE motif in its promoter region (Choi et al., 1991; Murshid et al., 2010). There is an interaction between the them, and in our work we found that thermal shock also induces CREB activation. We have already demonstrated in a previous study that HSP70 is enhanced following a learning task and that infusion of recombinant HSP70 (rHSP70) in the dorsal hippocampus immediately after CFC is able to enhance memory consolidation through MAPK pathway (Porto et al., 2018). MAPKs are divided into three different subfamilies, including the extracellular signal-regulated kinases (ERK), which is essential for CREB phosphorylation and the initiation of transcription of several genes necessary for the formation of a long term memory (Alberini, 2009; Johansen et al., 2011; Kandel, 2012; Roberson et al., 1999). Infusion of rHSP70 after CFC was able to increase activation and ERK protein levels in the hippocampus (Porto et. al., 2018).

Although NF- κ B is highly activated during inflammation and HSP70 is capable of blocking its translocation to the nucleus (Chen et al., 2005), in our study, heat shock didn't show any influence on total NF- κ B content in the hippocampus or prefrontal cortex, however, we didn't measure its activation. There was also no treatment effect in GSK3 activation either in the hippocampus or prefrontal cortex, which is another protein that is known to be involved in AD pathology, increasing tau phosphorylation and consequently aggregation and toxicity (Kremer et al., 2011). Avrahami et al. (2013) didn't find any change in the expression of HSP70 upon treatment that inhibits GSK3 in 5XFAD mice. Since it is well known that GSK3 inactivates HSF-1 (Neef et al., 2011), we did a correlation analysis and we found that the higher the HSP70 content in the hippocampus, the lesser GSK3 was activated at 10 months of age (suppl.7).

Psychological alterations such as disinhibition may be present in 20–35% of patients, which is manifested by socially unacceptable behavior and inappropriate euphoria (Chung & Cummings, 2000). In 5XFAD female mice this characteristic is present by reduced anxiety behavior, reflected by more time spent in the open arms in the plus maze starting from an early age (6 mo old) which further increase in an age-dependent manner. At 12 months old they also spend more time in the center of the open field (Jawhar et al., 2012). In our experiments, we found heat treatment effects on anxiety levels only in females, at 10 months of age. They spent more time and had more entries in the open arms of the plus maze, improving their anxiety levels when compared to controls. In contrast, locomotor behavior did not seem to be affected since there was no difference detected in the traveled distance in the open field. A study (Bhattacharya et al., 2014) showed that females consistently displayed higher plaque density in comparison to males of the same age. In agreement with that, Devi et al. (2010) showed that female 5XFAD mice are more vulnerable and prone to develop amyloid deposits in the hippocampus in response to adverse behavioral stressors than male. They argue that higher prevalence of sporadic AD in women may be, at least in part, attributable to that vulnerability of female brain to stress mechanisms that favor β -amyloidogenic processing of APP. Effects of FIR sauna on psychological factors have already been reported in humans. They used 20 sessions of 15 minutes in a 60°C temperature exposure over a four-week period, and they found significant improvements in somatic complaints, hunger, and ability to relax (Masuda et al., 2005).

Weight loss is listed as a symptom consistent with the diagnosis of AD. A study by Gillette-Guyonnet et al. (2000) showed that more than 40% of AD patients show significant weight loss. Similarly, 5XFAD mice have reduced body weight in comparison with their wild type littermates at 9 months of age (Jawhar et al., 2012). Accordingly, we found a reduction in the Lee Index in the control group from 8 to 10 months of age, difference that was rescued by heat shock treatment, since this group was able to maintain their Lee index when they were 10 months old compared to the beginning of the treatment (suppl.8). The risk of weight loss tends to increase with severity and progression of AD and is a predictor of mortality in humans, whereas weight gain appears to have a protective effect (White, 1998). The fact that the treatment was able to maintain the Lee Index stable at 10 months of age shows a great valuable tool for the use of heat therapy as a treatment, with clinical impact.

The heat shock treatment effect in our study was more pronounced at 10 months of age, when the pathological and cognitive impairments are stronger in 5XFAD mice. Aging in the central nervous system may involve time-dependent loss of protein quality control, a deficit that is permissive for aggregation and inclusion body formation (Calderwood et al., 2009). The failure in the chaperone capacity of HSP70 in the older mice may be one of the reasons why the disease is more aggressive and the treatment had such a better effect at 10 months of age. It suggests that the treatment is more effective when the progression of the disease is actually more advanced and for that reason it is a perfect candidate to be used in the clinic, being capable of modifying behaviour related phenotypes, which are currently not treatable in that stage. Besides that, far-infrared sauna is a heat shock treatment extremely cheap and assessable, easily applicable for patients with Alzheimer's disease.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest and no competing interests such as consultancies, financial involvement, patent ownership, etc. in relation to the work described.

Acknowledgements

This work was supported by grants received from the CNPq program Science Without Borders, process 202118/2015-0, CAPES and PROPESQ (UFRGS). RRP designed the study. RRP completed all the experiments described in this manuscript. RRP, TB, PIHBJ, LOA and RMDH were involved in analyzing the results. TB, PIHBJ, LOA, and RMDH provided experimental advice. RRP and TB wrote the manuscript. TB, PIHBJ, LOA and RMDH provided writing assistance and proof reading. TB and RMDH provided language help. TB, PIHBJ, LOA and RMDH provided the necessary equipment and material for the execution of experiments. All the authors had final approval of the submitted and published versions.

5. REFERENCES

- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., & Ikeda, K. (2000). Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord, 14 Suppl 1*, S47-53.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., . . . Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging, 21*(3), 383-421.
- Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev, 89*(1), 121-145. doi:10.1152/physrev.00017.2008
- Alzheimer Association (2017). Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement* 2017;13:325-373.
- Avrahami, L., Farfara, D., Shaham-Kol, M., Vassar, R., Frenkel, D., & Eldar-Finkelman, H. (2013). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 ameliorates β -amyloid pathology and restores lysosomal acidification and mammalian target of rapamycin activity in the Alzheimer disease mouse model: in vivo and in vitro studies. *J Biol Chem, 288*(2), 1295-1306. doi:10.1074/jbc.M112.409250
- Bakkour, A., Morris, J. C., Wolk, D. A., & Dickerson, B. C. (2013). The effects of aging and Alzheimer's disease on cerebral cortical anatomy: specificity and differential relationships with cognition. *Neuroimage, 76*, 332-344. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.02.059
- Bechtold, D. A., & Brown, I. R. (2000). Heat shock proteins Hsp27 and Hsp32 localize to synaptic sites in the rat cerebellum following hyperthermia. *Brain Res Mol Brain Res, 75*(2), 309-320.
- Bechtold, D. A., Rush, S. J., & Brown, I. R. (2000). Localization of the heat-shock protein Hsp70 to the synapse following hyperthermic stress in the brain. *J Neurochem, 74*(2), 641-646.
- Beever, R. (2009). Far-infrared saunas for treatment of cardiovascular risk factors: summary of published evidence. *Can Fam Physician, 55*(7), 691-696.
- Beever, R. (2010). The effects of repeated thermal therapy on quality of life in patients with type II diabetes mellitus. *J Altern Complement Med, 16*(6), 677-681. doi:10.1089/acm.2009.0358
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2008). BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist, 14*(2), 147-156. doi:10.1177/1073858407305850
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., . . . Medina, J. H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A, 105*(7), 2711-2716. doi:10.1073/pnas.0711863105
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2014). BDNF and memory processing. *Neuropharmacology, 76 Pt C*, 677-683. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.024
- Bhattacharya, S., Haertel, C., Maelicke, A., & Montag, D. (2014). Galantamine slows down plaque formation and behavioral decline in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One, 9*(2), e89454. doi:10.1371/journal.pone.0089454
- Bobkova, N. V., Garbuz, D. G., Nesterova, I., Medvinskaya, N., Samokhin, A., Alexandrova, I., . . . Evgen'ev, M. (2014). Therapeutic effect of exogenous

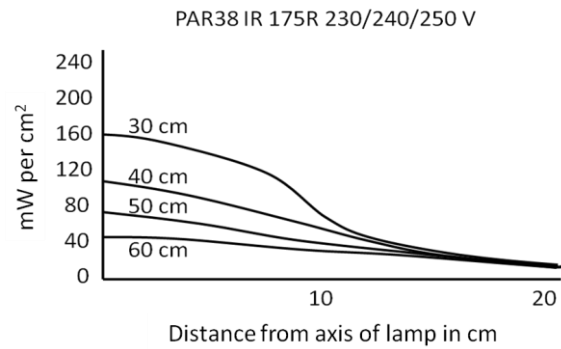
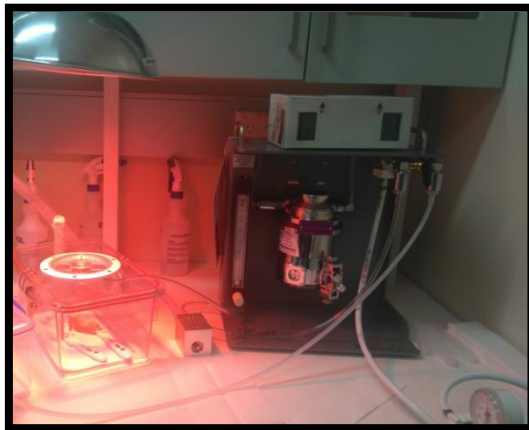
- hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 38(2), 425-435. doi:10.3233/JAD-130779
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., & Arrighi, H. M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 3(3), 186-191. doi:10.1016/j.jalz.2007.04.381
- Buzzard, K. A., Giaccia, A. J., Killender, M., & Anderson, R. L. (1998). Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 273(27), 17147-17153.
- Calderwood, S. K., Murshid, A., & Prince, T. (2009). The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology*, 55(5), 550-558. doi:10.1159/000225957
- Chen, H. W., Kuo, H. T., Wang, S. J., Lu, T. S., & Yang, R. C. (2005). In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity. *Shock*, 24(3), 232-238.
- Chen, S., & Brown, I. R. (2007a). Neuronal expression of constitutive heat shock proteins: implications for neurodegenerative diseases. *Cell Stress Chaperones*, 12(1), 51-58.
- Chen, S., & Brown, I. R. (2007b). Translocation of constitutively expressed heat shock protein Hsc70 to synapse-enriched areas of the cerebral cortex after hyperthermic stress. *J Neurosci Res*, 85(2), 402-409. doi:10.1002/jnr.21124
- Chen, Z. C., Wu, W. S., Lin, M. T., & Hsu, C. C. (2009). Protective effect of transgenic expression of porcine heat shock protein 70 on hypothalamic ischemic and oxidative damage in a mouse model of heatstroke. *BMC Neurosci*, 10, 111. doi:10.1186/1471-2202-10-111
- Choi, H. S., Li, B., Lin, Z., Huang, E., & Liu, A. Y. (1991). cAMP and cAMP-dependent protein kinase regulate the human heat shock protein 70 gene promoter activity. *J Biol Chem*, 266(18), 11858-11865.
- Chung, J., Nguyen, A. K., Henstridge, D. C., Holmes, A. G., Chan, M. H., Mesa, J. L., . . . Febbraio, M. A. (2008). HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(5), 1739-1744. doi:10.1073/pnas.0705799105
- Chung, J. A., & Cummings, J. L. (2000). Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. *Neurol Clin*, 18(4), 829-846.
- Crinnion, W. J. (2011). Sauna as a valuable clinical tool for cardiovascular, autoimmune, toxicant- induced and other chronic health problems. *Altern Med Rev*, 16(3), 215-225.
- Devi, L., Alldred, M. J., Ginsberg, S. D., & Ohno, M. (2010). Sex- and brain region-specific acceleration of β -amyloidogenesis following behavioral stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Brain*, 3, 34. doi:10.1186/1756-6606-3-34
- Gallagher, M., & Koh, M. T. (2011). Episodic memory on the path to Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 21(6), 929-934. doi:10.1016/j.conb.2011.10.021
- Gillette-Guyonnet, S., Nourhashemi, F., Andrieu, S., de Glisezinski, I., Ousset, P. J., Riviere, D., . . . Vellas, B. (2000). Weight loss in Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*, 71(2), 637S-642S. doi:10.1093/ajcn/71.2.637s
- Girard, S. D., Jacquet, M., Baranger, K., Migliorati, M., Escoffier, G., Bernard, A., . . . Marchetti, E. (2014). Onset of hippocampus-dependent memory impairments in 5XFAD transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 24(7), 762-772. doi:10.1002/hipo.22267

- Grillo, S. L., Duggett, N. A., Ennaceur, A., & Chazot, P. L. (2013). Non-invasive infrared therapy (1072 nm) reduces β -amyloid protein levels in the brain of an Alzheimer's disease mouse model, TASTPM. *J Photochem Photobiol B*, *123*, 13-22. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.02.015
- Gupte, A. A., Bomhoff, G. L., Swerdlow, R. H., & Geiger, P. C. (2009). Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*, *58*(3), 567-578. doi:10.2337/db08-1070
- Guzhova, I., Kislyakova, K., Moskaliova, O., Fridlanskaya, I., Tytell, M., Cheetham, M., & Margulis, B. (2001). In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res*, *914*(1-2), 66-73.
- Hamblin, M. R. (2016). Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders. *BBA Clin*, *6*, 113-124. doi:10.1016/j.bbacli.2016.09.002
- Hamblin, M. R. (2018). Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol*, *94*(2), 199-212. doi:10.1111/php.12864
- Hardy, J. (2009). The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem*, *110*(4), 1129-1134. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06181.x
- Hashikawa, N., Utaka, Y., Ogawa, T., Tanoue, R., Morita, Y., Yamamoto, S., . . . Hashikawa-Hobara, N. (2017). HSP105 prevents depression-like behavior by increasing hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels in mice. *Sci Adv*, *3*(5), e1603014. doi:10.1126/sciadv.1603014
- Hooper, P. L. (1999). Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, *341*(12), 924-925. doi:10.1056/NEJM199909163411216
- Hoshino, T., Murao, N., Namba, T., Takehara, M., Adachi, H., Katsuno, M., . . . Mizushima, T. (2011). Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J Neurosci*, *31*(14), 5225-5234. doi:10.1523/JNEUROSCI.5478-10.2011
- Jahn, H. (2013). Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*, *15*(4), 445-454.
- Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T. A., & Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *33*(1), 196.e129-140. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027
- Jinwal, U. K., Koren, J., O'Leary, J. C., Jones, J. R., Abisambra, J. F., & Dickey, C. A. (2010). Hsp70 ATPase Modulators as Therapeutics for Alzheimer's and other Neurodegenerative Diseases. *Mol Cell Pharmacol*, *2*(2), 43-46.
- Jinwal, U. K., O'Leary, J. C., Borysov, S. I., Jones, J. R., Li, Q., Koren, J., . . . Dickey, C. A. (2010). Hsc70 rapidly engages tau after microtubule destabilization. *J Biol Chem*, *285*(22), 16798-16805. doi:10.1074/jbc.M110.113753
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, *147*(3), 509-524. doi:10.1016/j.cell.2011.10.009
- Joyashiki, E., Matsuya, Y., & Tohda, C. (2011). Somnifone improves memory impairments and increases axonal density in Alzheimer's disease model mice, 5XFAD. *Int J Neurosci*, *121*(4), 181-190. doi:10.3109/00207454.2010.541571
- Kandel, E. R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain*, *5*, 14. doi:10.1186/1756-6606-5-14

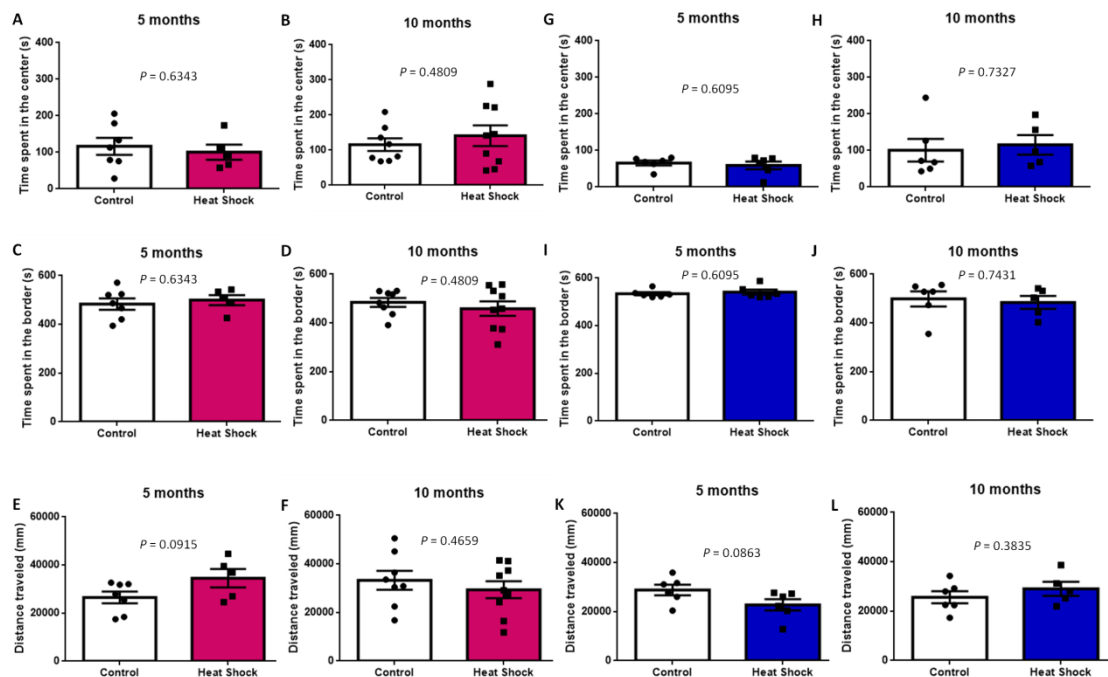
- Karpe, P. A., & Tikoo, K. (2014). Heat shock prevents insulin resistance-induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling. *Diabetes*, *63*(3), 1124-1139. doi:10.2337/db13-1267
- Karunanithi, S., Barclay, J. W., Brown, I. R., Robertson, R. M., & Atwood, H. L. (2002). Enhancement of presynaptic performance in transgenic *Drosophila* overexpressing heat shock protein Hsp70. *Synapse*, *44*(1), 8-14. doi:10.1002/syn.10048
- Kimura, R., & Ohno, M. (2009). Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol Dis*, *33*(2), 229-235. doi:10.1016/j.nbd.2008.10.006
- Kirby, B. A., Merril, C. R., Ghanbari, H., & Wallace, W. C. (1994). Heat shock proteins protect against stress-related phosphorylation of tau in neuronal PC12 cells that have acquired thermotolerance. *J Neurosci*, *14*(9), 5687-5693.
- Kremer, A., Louis, J. V., Jaworski, T., & Van Leuven, F. (2011). GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction.... *Front Mol Neurosci*, *4*, 17. doi:10.3389/fnmol.2011.00017
- Laukkanen, T., Kunutsor, S., Kauhanen, J., & Laukkanen, J. A. (2017). Sauna bathing is inversely associated with dementia and Alzheimer's disease in middle-aged Finnish men. *Age Ageing*, *46*(2), 245-249. doi:10.1093/ageing/afw212
- Lee, J. E., Yenari, M. A., Sun, G. H., Xu, L., Emond, M. R., Cheng, D., . . . Giffard, R. G. (2001). Differential neuroprotection from human heat shock protein 70 overexpression in in vitro and in vivo models of ischemia and ischemia-like conditions. *Exp Neurol*, *170*(1), 129-139. doi:10.1006/exnr.2000.7614
- Maarouf, C. L., Kokjohn, T. A., Whiteside, C. M., Macias, M. P., Kalback, W. M., Sabbagh, M. N., . . . Roher, A. E. (2013). Molecular Differences and Similarities Between Alzheimer's Disease and the 5XFAD Transgenic Mouse Model of Amyloidosis. *Biochem Insights*, *6*, 1-10. doi:10.4137/BCI.S13025
- Magrané, J., Smith, R. C., Walsh, K., & Querfurth, H. W. (2004). Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J Neurosci*, *24*(7), 1700-1706. doi:10.1523/JNEUROSCI.4330-03.2004
- Manzerra, P., Rush, S. J., & Brown, I. R. (1997). Tissue-specific differences in heat shock protein hsc70 and hsp70 in the control and hyperthermic rabbit. *J Cell Physiol*, *170*(2), 130-137. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199702)170:2<130::AID-JCP4>3.0.CO;2-P
- Masuda, A., Nakazato, M., Kihara, T., Minagoe, S., & Tei, C. (2005). Repeated thermal therapy diminishes appetite loss and subjective complaints in mildly depressed patients. *Psychosom Med*, *67*(4), 643-647. doi:10.1097/01.psy.0000171812.67767.8f
- Michalikova, S., Ennaceur, A., van Rensburg, R., & Chazot, P. L. (2008). Emotional responses and memory performance of middle-aged CD1 mice in a 3D maze: effects of low infrared light. *Neurobiol Learn Mem*, *89*(4), 480-488. doi:10.1016/j.nlm.2007.07.014
- Murshid, A., Chou, S. D., Prince, T., Zhang, Y., Bharti, A., & Calderwood, S. K. (2010). Protein kinase A binds and activates heat shock factor 1. *PLoS One*, *5*(11), e13830. doi:10.1371/journal.pone.0013830
- Neef, D. W., Jaeger, A. M., & Thiele, D. J. (2011). Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov*, *10*(12), 930-944. doi:10.1038/nrd3453

- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., . . . Vassar, R. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, *26*(40), 10129-10140. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
- Ohno, M., Cole, S. L., Yasvoina, M., Zhao, J., Citron, M., Berry, R., . . . Vassar, R. (2007). BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis*, *26*(1), 134-145. doi:10.1016/j.nbd.2006.12.008
- Pini, L., Pievani, M., Bocchetta, M., Altomare, D., Bosco, P., Cavedo, E., . . . Frisoni, G. B. (2016). Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Res Rev*, *30*, 25-48. doi:10.1016/j.arr.2016.01.002
- Porto, R. R., Dutra, F. D., Crestani, A. P., Holsinger, R. M. D., Quillfeldt, J. A., Homem de Bittencourt, P. I., & de Oliveira Alvares, L. (2018). HSP70 Facilitates Memory Consolidation of Fear Conditioning through MAPK Pathway in the Hippocampus. *Neuroscience*, *375*, 108-118. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.01.028
- Purushothuman, S., Johnstone, D. M., Nandasena, C., Eersel, J., Ittner, L. M., Mitrofanis, J., & Stone, J. (2015). Near infrared light mitigates cerebellar pathology in transgenic mouse models of dementia. *Neurosci Lett*, *591*, 155-159. doi:10.1016/j.neulet.2015.02.037
- Purushothuman, S., Johnstone, D. M., Nandasena, C., Mitrofanis, J., & Stone, J. (2014). Photobiomodulation with near infrared light mitigates Alzheimer's disease-related pathology in cerebral cortex - evidence from two transgenic mouse models. *Alzheimers Res Ther*, *6*(1), 2. doi:10.1186/alzrt232
- Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratick, C., & Sweatt, J. D. (1999). The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci*, *19*(11), 4337-4348.
- Sabirzhanov, B., Stoica, B. A., Hanscom, M., Piao, C. S., & Faden, A. I. (2012). Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *J Neurochem*, *123*(4), 542-554. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07927.x
- Salat, D. H., Kaye, J. A., & Janowsky, J. S. (2001). Selective preservation and degeneration within the prefrontal cortex in aging and Alzheimer disease. *Arch Neurol*, *58*(9), 1403-1408.
- White, H. (1998). Weight change in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging*, *2*(2), 110-112.
- Wu, Y., Cao, Z., Klein, W. L., & Luo, Y. (2010). Heat shock treatment reduces beta amyloid toxicity in vivo by diminishing oligomers. *Neurobiol Aging*, *31*(6), 1055-1058. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.013

6. SUPPLEMENTARY DATA

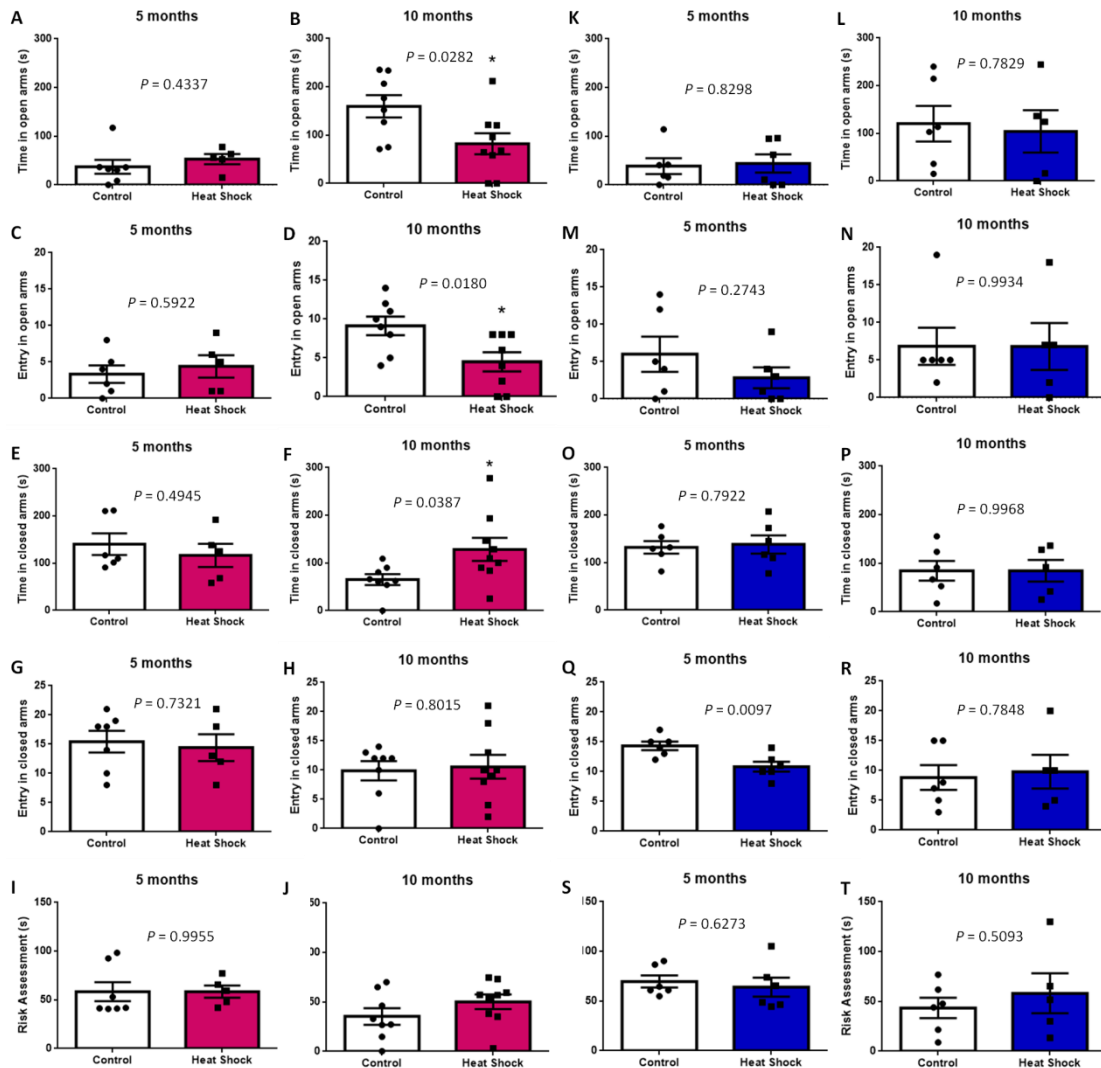


Suppl 1. Heat shock equipment set up and radiation intensity at 30, 60, 40 and 60 cm from the lamp used in this study (source: <http://www.infraphil.info>).

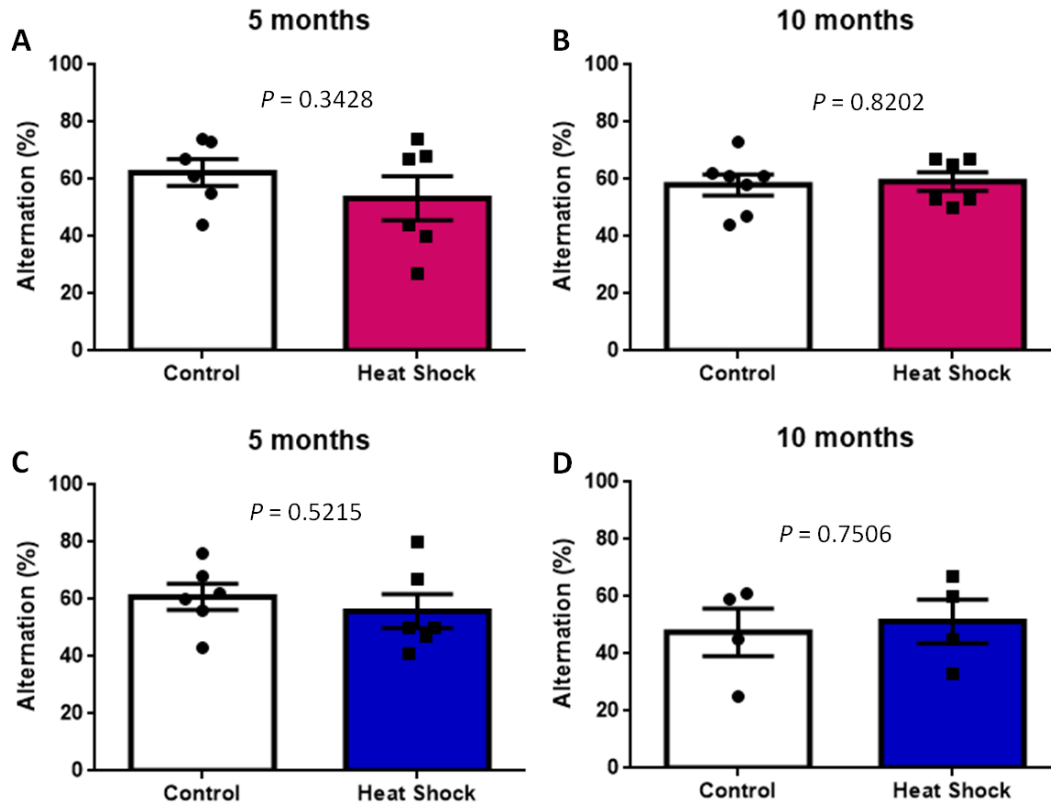


Suppl 2. Heat Shock treatment does not influence behavior and locomotion of 5XFAD female (pink) and male (blue) mice in the open field. Time spent in the center of the open field after two months of heat shock treatment or control at 5 (A, G) or 10 (B, H) months of age. Time spent in the border of the open field after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (C, I) or 10 (D, J) months of age. Total distance traveled in the open field after two months of heat shock treatment or control mice at 5

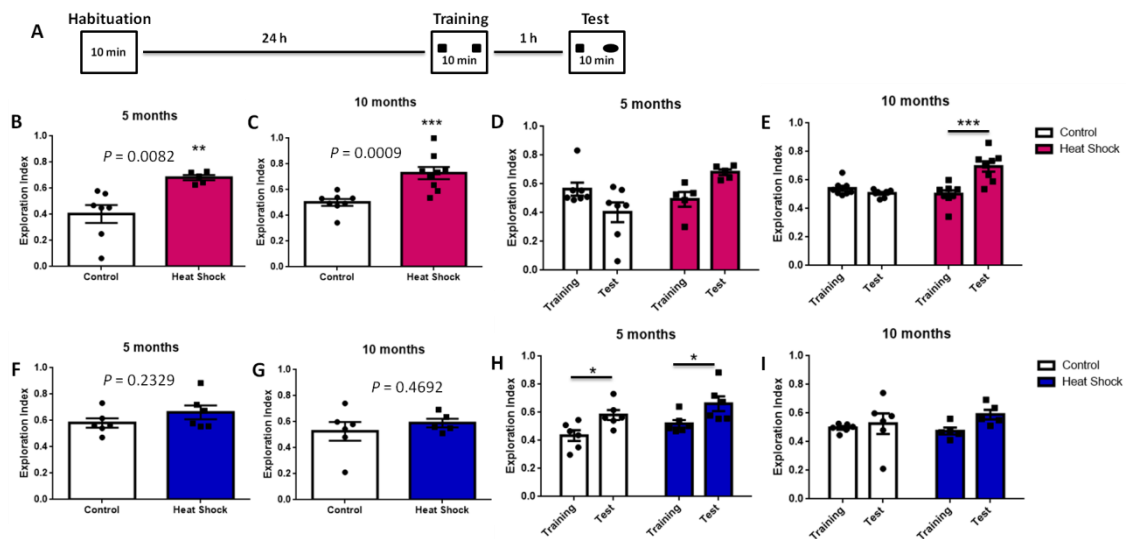
(E, K) or 10 (F, L) months of age. Student's *t* test ($P>0.05$). Data are the means \pm S.E.M.



Suppl 3. Heat Shock treatment effect on anxiety-like behavior in 5XFAD mice is sex depended. Female (pink) and male (blue) mice. Entries (C, D, M, N) and time (A, B, K, L) spent in the open arms of the plus maze after two months of heat shock treatment or control mice at 5 or 10 months of age. Number of entries (G, H, Q, R) and time (E, F, O, P) spent in the closed arms of the plus maze after two months of heat shock treatment or control mice at 5 or 10 months of age. Risk assessment time (I, J, S, T) in the plus maze after two months of heat shock treatment or control mice at 5 or 10 months. Student's *t* test ($*P < 0.05$). Data are the means \pm S.E.M.

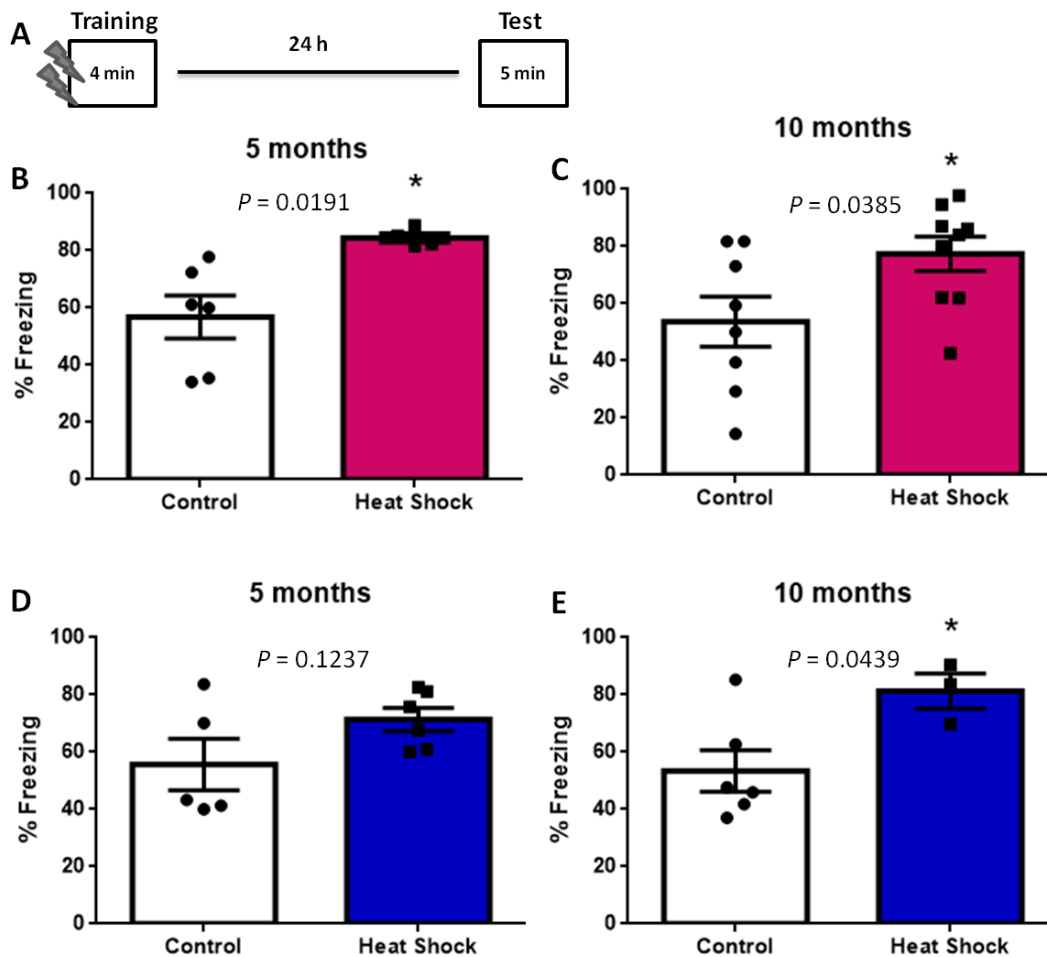


Suppl 4. Heat Shock treatment does not influence spontaneous alternation in the Y maze in 5XFAD female (pink) and male (blue). Percentage of alternation in the Y maze after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (A, C) or 10 (B, D) months of age. Student's *t* test ($P > 0.05$). Data are the means \pm S.E.M.

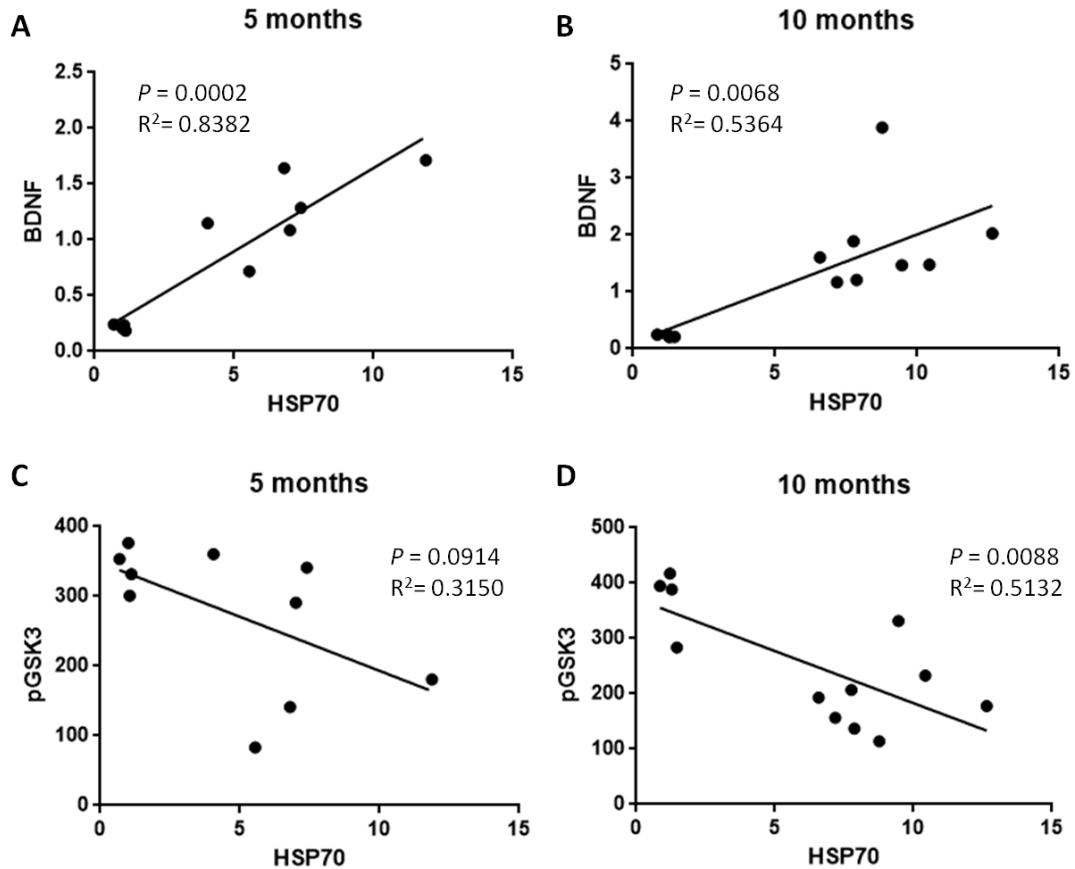


Suppl 5. Heat Shock treatment improves memory recognition in 5XFAD female (pink) mice. Exploration index in the test session after two months of heat shock treatment or

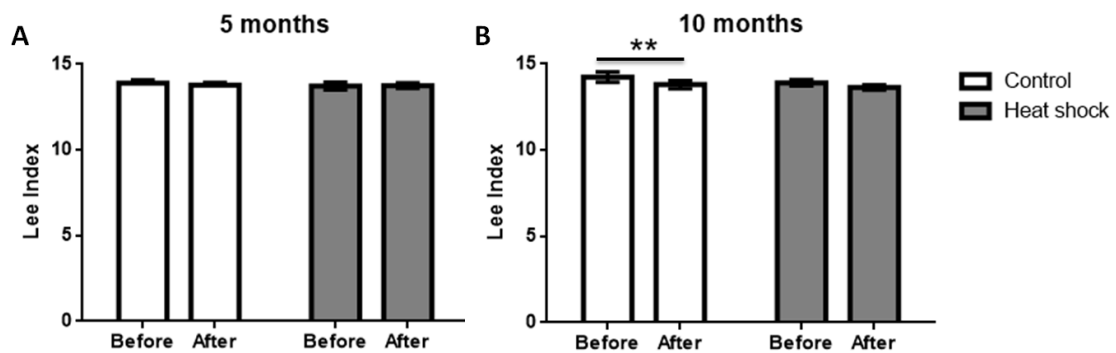
control mice at 5 (**B, F**) or 10 (**C, G**) months of age. Student's *t* test (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Exploration index during the training and test session in the control and heat shocked group at 5 (**D, H**) or 10 (**E, I**) months of age. Two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$). Data are the means \pm S.E.M.



Suppl 6. Heat Shock treatment improves long term memory consolidation in 5XFAD mice female (pink) and male (blue). **A.** Experimental design of the fear conditioning test. Percentage of freezing in the test session after two months of heat shock treatment or control mice at 5 (**B, D**) or 10 (**C, E**) months of age. Student's *t* test (* $P < 0.05$). Data are the means \pm S.E.M.



Suppl 7. BDNF and GSK3 correlation with HSP70 in the hippocampus at 5 or 10 months of age in controls and treated animals.



Suppl 8. Heat shock treatment prevents lowering of Lee Index in 5XFAD old mice. Lee index before and after two months of heat shock treated or control mice at 5 (A) or 10 (B) months. Two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc (** $P < 0.01$). Data are the means \pm S.E.M.

6. DISCUSSÃO GERAL

Estima-se que as proteínas de choque térmico tenham surgido há cerca de 1,5 bilhão de anos (Boorstein et al., 1994), além disso, o gene que codifica a HSP70 nos mamíferos possui uma homologia de 50% com o da *Escherichia coli*. Sua conservação ao longo da evolução é a prova de que esta proteína é essencial para sobrevivência celular, sendo expressa em todos os tipos de células, inclusive no sistema nervoso central, principalmente neurônios, que são extremamente sensíveis a qualquer tipo de estresse, necessitando de mecanismos citoprotetores mais complexos (Ohtsuka & Suzuki, 2000).

A sua principal função é de chaperona molecular, auxiliando no dobramento correto de proteínas e também na translocação destas para organelas alvo e ao longo da membrana celular, além de mecanismos de degradação (Kiang & Tsokos, 1998). Entretanto, ela também tem funções diretas em cascatas moleculares, como bloqueio da via apoptótica e da inflamação, importantes fatores que conferem proteção contra diversos tipos de estresse.

Neste trabalho, focamos na importância desta proteína nos processos relacionados à memória e como a superexpressão de HSP70 induzida por terapia de choque térmico pode ser usada como tratamento não farmacológico da doença de Alzheimer. Para tanto, dividimos este trabalho em 3 partes: primeiro verificamos o efeito da HSP70 sobre a consolidação da memória, depois sobre os processos gerados pela reativação, e então, em modelos animais da doença de Alzheimer, avaliamos o efeito terapêutico do choque térmico com sauna infravermelha sobre parâmetros comportamentais.

Estudos anteriores já haviam mostrado elevações na expressão gênica e também do conteúdo proteico da HSP70 induzido por tarefas de aprendizagem. Alguns deles utilizaram tarefas que requerem mais de uma sessão de treinamento para formar uma memória de longo prazo, como o labirinto aquático (Pizarro et al., 2003) ou labirinto radial de 8 braços (Ambrosini et al., 2005). Ao longo dos dias de treino, Pizarro e colaboradores (2003) encontraram um pico no mRNA da HSP70 no hipocampo de ratos no segundo dia e da proteína no terceiro, o que sugeriram se correlacionar com o índice de aprendizagem dos animais. Em nosso trabalho, utilizamos o condicionamento aversivo contextual como medida de aprendizagem associativa e verificamos o

conteúdo de HSP70 em uma curva de tempo após o treino. Encontramos um pico de elevação desta proteína em 1 h, que foi rápido e transitório, já que em 3 h os valores já estavam normalizados. Esta tarefa foi escolhida por ser capaz de formar uma memória forte e de longa duração com apenas um treino, facilitando a análise da janela de consolidação. Em acordo com nossos resultados, estudos com memória aversiva, onde se utilizou apenas um treino capaz de formar uma memória de longa duração, as elevações na expressão de HSP70 também eram mais rápidas. Na tarefa de esQUIVA inibitória, o mRNA da HSP70 no hipocampo aumentou 3 h após o treino (Igaz et al., 2004). Já na esQUIVA ativa de duas vias, houve elevações dos níveis proteicos de HSP72 no hipocampo e no cerebelo, em todos tempos avaliados, e de forma crescente, em 4 h, 8 h e com valores de pico em 20 h (Ambrosini et al., 1999). Cabe salientar que ambos estudos não avaliaram tempos intermediários ou anteriores.

Astrócitos são capazes de induzir a HSP70 rapidamente e exportá-los para o espaço extracelular, onde podem ser captadas pelos neurônios (Guzhova et al., 2001). A fim de se verificar se esse aumento de HSP70 encontrado em 1 h estava sendo induzido pelos astrócitos, realizamos imunofluorescência de dupla marcação com HSP72 e GFAP. Primeiro, replicamos o aumento da HSP70 já encontrado após treino de CAC, agora avaliando apenas a forma induzível da proteína, e mostramos que ela foi altamente induzida apenas nos animais que foram treinados. O baixo coeficiente de correlação de Pearson encontrado demonstrou que não houve colocalização entre essas proteínas, portanto podemos afirmar que os astrócitos não eram responsáveis pela HSP70 induzida pelo treinamento de condicionamento aversivo contextual. Além disso, a imunofluorescência de marcação dupla com calbindina e HSP72 revelou que a localização da HSP72 era principalmente em sinapses entre os axônios colaterais de Schaffer e as células piramidais da região de CA1 do hipocampo, local responsável pela formação de memórias associativas.

Elevações rápidas e transitórias do mRNA de HSP70 já foram relatadas no SNC após a administração de quinolinato, um agonista de NMDA (Walker & Carlock, 1993), bem como pela atividade sináptica induzida por eletrochoque (Kaneko et al., 1993). Esta via de indução de HSP70 pelos receptores de glutamato e atividade sináptica também pode estar envolvida na indução de HSP70 em neurônios, observada em nossos experimentos após o treino de condicionamento aversivo. A entrada de Ca^{2+} na célula pós sináptica ativa proteínas quinases como CAMKII / IV, PKC e PKA (Murshid et al., 2010; Schafe et al., 2001), que são ativadores conhecidos da transcrição do gene da

HSP70 (Price & Calderwood, 1991). PKA e CREB podem ativar diretamente a transcrição gênica de HSP70 e seu conteúdo proteico (Choi et al., 1991). De fato, as atividades de PKA e CREB são elevadas imediatamente após o treinamento (Izquierdo et al., 2006) e poderiam explicar a elevação de HSP70 no hipocampo observada em nossos experimentos, o que está atualmente sob investigação.

Pode-se também levantar a dúvida de que o estresse do choque poderia ter causado esta elevação da HSP70 e não a aprendizagem em si. Experimentos conduzidos por Ambrosini e colaboradores (1999) encontraram valores ínfimos de HSP72 no hipocampo dos animais controle que receberam apenas o choque. Em um estudo posterior, indicaram que a expressão de HSP72 no hipocampo de duas linhagens diferentes de camundongos (C57 e DBA) varia em função do desempenho de aprendizagem, independentemente da exposição ao estresse acústico crônico (Ambrosini et al., 2005). Assim, a HSP72 é baixa na condição em que cada cepa apresenta o maior desempenho e alta na condição em que cada cepa apresenta o menor desempenho. A elevação da HSP70 parece estar relacionada à aprendizagem, uma vez que a HSP70 foi expressa ao máximo quando ratos estão começando a dominar uma tarefa, mas menor quando a memória é totalmente consolidada (Ambrosini et al., 2005; Pizarro et al., 2003). Portanto, é plausível que tanto o curso temporal da elevação da HSP70 quanto sua relação com o desempenho possam ser fatores críticos para elucidar o papel desempenhado por essas proteínas nas mudanças celulares associadas à aprendizagem. Um pico no conteúdo HSP70 que ocorre durante a consolidação no hipocampo pode ser uma indicação de que a tarefa está sendo dominada e novas conexões neurais estão sendo estabelecidas. Isso explicaria porque o aumento de HSP70 foi rápido e transitório, sendo importante nas primeiras horas em que o processo de consolidação de memória no CAC é necessário (janela de consolidação). Essa janela pode variar de acordo com a importância desta memória (Casagrande et al., 2018), e neste sentido, a HSP70 poderia ser utilizada de forma similar ao cFos, que é o gene mais utilizado para verificar ativação neuronal induzida pela aprendizagem, e ambos possuem a mesma janela temporal de ativação (Bertaina-Anglade et al., 2000).

Mas o que acontece quando reativamos esta memória? dependendo do tempo de reativação, esta memória aversiva pode tomar dois caminhos: ser reconsolidada ou extinta. Para verificar se a HSP70 também pode ser induzida pela reativação da memória, realizamos uma curva de tempo após reativação de 4 ou 15 min e avaliamos o conteúdo de HSP70 no hipocampo por *western blot*. Assim como na curva de

consolidação, a reativação da memória causou um aumento rápido e transiente desta proteína, seja por processo de reconsolidação ou de extinção. Interessantemente, o pico agora foi ainda mais rápido, em apenas 30 min. Em concordância com esses resultados, Frenkel e colaboradores (2012) também verificaram aumentos de HSP70 induzidos tanto pelo aprendizado quanto pelo processo de reconsolidação. Eles utilizaram memória aversiva e avaliaram o conteúdo proteico no bulbo olfatório de carangueijos. Esses resultados indicam que essa proteína parece ser induzida por qualquer processo relacionado à memória. Uma observação interessante que deve ser ressaltada aqui, é que o pico de HSP70 parece variar um pouco entre os animais, indicando mais uma vez que a sua indução depende do momento específico necessário de atuação desta proteína, variando de acordo com o domínio da tarefa, o que é dependente do desempenho de cada animal.

A reativação é um processo ativo, momento em que a memória já consolidada anteriormente se torna lábil novamente e pode ser alterada, de forma a ser prejudicada, fortalecida ou mesmo modificada. Nos perguntamos então, se reativando a memória com objetivos diferentes, poderíamos gerar uma resposta diferenciada da HSP70. Primeiramente, replicamos o resultado anterior, onde a reexposição ao contexto foi capaz de induzir aumento da HSP70. Mas o resultado mais interessante foi que os níveis de HSP70 no hipocampo eram ainda mais elevados quando havia uma novidade na reexposição, onde o choque era diferente do esperado (0.3 mA no treino e 0.7 mA na reativação). Além disso, também comprovamos que não é o choque que causa esse aumento, pois o grupo que recebeu o choque de 0.7 mA na reativação (igual ao do seu treino), não teve valores diferentes de HSP70 quando comparado com o grupo que foi apenas reexposto ao contexto. Esses resultados nos levam à acreditar que a HSP70 é principalmente necessária nos processos iniciais da formação de uma memória e que ao torná-la labil novamente, esta volta a ser requerida, sendo induzida em maiores quantidades quando há uma informação nova para ser codificada e armazenada.

Se aumentarmos o conteúdo desta proteína ainda acima dos valores encontrados, teremos então efeitos sobre a expressão da memória? Para responder a este questionamento, utilizamos a infusão de HSP72 recombinante bilateralmente no hipocampo dorsal dos animais, imediatamente após o treino de CAC e avaliamos a resposta de medo dois dias depois, quando reexpostos ao contexto. Os resultados apresentaram um formato de U invertido, onde a dose média foi capaz de causar uma facilitação na memória, representada pelos maiores valores de freezing em resposta ao

contexto. Os efeitos observados reforçam ainda mais seu papel na aprendizagem neste paradigma. Estudos anteriores (Ekimova et al., 2010; Guzhova et al., 1998) demonstraram que a HSP70 exógena é capaz de penetrar nas células, avaliado tanto "*in vitro*" como "*in vivo*". Quando aplicada ao meio de cultura das células U-937, rHSP70 é capaz de se ligar à superfície celular 40 min após a incubação, com um pico aos 60 min (Guzhova et al., 1998), um ponto de tempo semelhante à indução endógena de HSP70 observado em nosso estudo. Comprovando isso, quando comparamos o conteúdo de HSP70 1 h após infusão de rHSP70 imediatamente após treino de CAC, vimos que há uma somação, com valores ainda mais elevados do que aqueles simplesmente induzidos pelo treino. Após 3 h, esses valores já não diferem mais. Hsp70 / Hsc70 marcada quando injetada no terceiro ventrículo de ratos, é capaz de penetrar em muitas estruturas encefálicas, incluindo o hipocampo, e é encontrada em grandes quantidades no citosol dos neurônios (Ekimova et al., 2010). Curiosamente, a proteína marcada também foi encontrada em terminais neuronais, sugerindo que ela pode ser necessária para a função neuronal (Ekimova et al., 2010). No presente estudo, a infusão de 0.5 µg / µL da rHSP70 imediatamente após o treinamento facilitou a consolidação da memória, enquanto concentrações mais baixas e mais altas não produziram efeito na memória. É possível que níveis de rHSP70 superiores aos usados neste estudo possam ser citotóxicos e ativar diferentes alvos moleculares, como receptores tipo Toll (TLR) na microglia, ativando assim as vias pró-inflamatórias (Calderwood, 2007; De Maio, 2011). Infusão de rHSP70 6 h depois do treino de CAC já não teve mais efeito, mostrando que é necessário que esta proteína esteja elevada durante os momentos iniciais da janela de consolidação para causar uma facilitação da memória.

Por esta proteína ter sido induzida tão rapidamente após o treino, nos perguntamos se ela poderia estar sendo captada do meio extracelular ao invés de ser induzida nas células neuronais. Portanto bloqueamos a HSP70 extracelular com um anticorpo específico, infundindo no hipocampo dorsal imediatamente após o treino do CAC, este não afetou a consolidação da memória, sugerindo, portanto, que ela está de fato atuando intracelularmente.

Camundongos transgênicos que superexpressam a HSP70 humana possuem déficits de aprendizagem (Ammon-Treiber et al., 2008). Os autores sugerem que o baixo desempenho foi uma consequência do excesso de LTP encontrado nesses animais, correspondendo à chamada hipótese de saturação, sugerindo o prejuízo da aprendizagem espacial em animais sem LTP residual (Moser et al., 1998). Essa

elevação crônica da HSP70 causou mudanças sustentadas na plasticidade sináptica, o que é completamente diferente da resposta aguda desta proteína após o aprendizado demonstrado em nosso trabalho.

Em seguida nos perguntamos qual função esta proteína poderia estar exercendo a ponto de causar facilitação da memória. Como citado anteriormente, a via da MAPK pode influenciar a indução de HSP70 tanto como esta pode influenciar a ativação da via da MAPK. Por este motivo, avaliamos o conteúdo total das proteínas desta via, assim como sua ativação, 1 e 3 h após infusão de rHSP70 imediatamente depois do treino de CAC. A infusão foi capaz de modular a via da MAPK, aumentando a ERK e diminuindo a atividade da p38 e da JNK. Essas quinases podem contribuir para o controle bidirecional da força sináptica complementando ou se opondo umas às outras durante a despotenciação sináptica, LTD e LTP (Zhu et al., 2002; Zhu et al., 2005). O rápido aumento inicial na fosforilação de CREB em resposta à atividade neuronal é mediado por CaMKIV. No entanto, a fosforilação prolongada de CREB, que é essencial para a transcrição dependente de CRE, parece ser dependente da atividade da ERK, já que esta é bloqueada por inibidores de MEK, indicando a necessidade da sinalização de ERK na manutenção da fosforilação da Ser133 (Thomas & Huganir, 2004). A atividade da ERK também é necessária para a inserção da subunidade GluA1 do GluR (receptor de glutamato) na membrana pós-sináptica; uma ação realizada pela CAMKII. Conseqüentemente, a atividade da ERK também é importante para LTP e consolidação de memória. Por outro lado, a ativação da JNK bloqueia a LTP do hipocampo (Wang et al., 2004) e está envolvida na LTD dependente de estimulação de baixa frequência no giro denteado (Curran et al., 2003). As JNKs também estão envolvidas no tráfego de receptores AMPA (Thomas et al., 2008; Y. Zhu et al., 2005) e LTD dependente do receptor metabotrópico de glutamato no hipocampo dorsal (Li et al., 2007). O aumento da atividade do JNK1 após o CAC parece ser um mecanismo de proteção contra a super-consolidação de uma memória associativa de medo, já que essa quinase regula negativamente a aprendizagem (Sherrin et al., 2010). Semelhante à JNK, a atividade da p38 também é aumentada pela ativação do receptor de glutamato metabotrópico através da fosforilação de MKK3 / 6, que leva à internalização de GluAR e, conseqüentemente, LTD (Eales et al., 2014; Xiong et al., 2006). Sabe-se também que a plasticidade sináptica dependente de BDNF pode ser suprimida pela IL-1 β através da ativação da p38 (Tong et al., 2012). O bloqueio da atividade da p38 imediatamente após a esquivas inibitória prejudica a memória, que não foi observada quando o bloqueio ocorreu 30 a

180 minutos após a sessão de treinamento (Alonso et al., 2003), sugerindo que essa atividade só pode ser necessária imediatamente após aprendizagem. HSP70 já foi demonstrada ser capaz de bloquear JNK e p38 em outros estudos (Gabai et al., 1997; Gabai et al., 1998). É possível que a HSP70 facilite a consolidação da memória através do bloqueio da atividade da p38 e da JNK, que por sua vez pode aumentar a atividade da ERK e, conseqüentemente, aumentar a manutenção da fosforilação do CREB e transcrição gênica.

A infusão de rHSP70 imediatamente após reativação de 4 min não causou nenhuma modificação na memória quando avaliada dois dias depois. Do mesmo modo, a infusão após 15 min de reativação não teve efeito sobre o teste dois dias depois. Porém, a escolha deste tempo intermediário foi intencional, no sentido de que gostaríamos de avaliar se a infusão de rHSP70 poderia facilitar a direção do processo induzido pela reativação, facilitando uma reconsolidação ou uma extinção. Apesar de não identificarmos diferenças dois dias depois, quando testamos os animais novamente, após duas semanas, vemos que o grupo controle teve um enfraquecimento desta memória, demonstrado pela redução dos níveis de freezing quando comparado com a reativação, enquanto que o grupo que recebeu rHSP70 manteve níveis iguais aos da reativação. Uma interpretação possível para esse achado é que a HSP70 passa estar envolvida nos processos de reconsolidação, mas não de extinção. Portanto, quando os animais são reativados num período intermediário entre a reconsolidação e a extinção, a infusão de HSP 70 no hipocampo favorece o sistema a entrar no modo reconsolidação. Dessa forma, a memória é fortalecida. Por outro lado, o grupo controle começa a extinguir, o que fica claro no re-teste, onde os níveis de freezing estão bastante baixos. Estes resultados estão ainda sob investigação, para que possamos ter alguma conclusão mais concreta a respeito destes efeitos.

Existe também a possibilidade de que a infusão de HSP70 extracelular possa ser internalizada, agindo da mesma forma que a proteína endógena, possivelmente através de uma interação de receptor ou com a própria membrana, como é sabido que a HSP70 se liga a receptores de membrana e lectinas do tipo C, sendo posteriormente transportado para o meio intracelular, onde preserva sua função biológica (Thériault et al., 2006). Essas possibilidades estão atualmente sob investigação em nosso laboratório.

Alguns estudos também verificaram este efeito facilitador da HSP70 sobre a memória, utilizando o caracol *Lymnaea stagnalis*. Os autores observaram que o choque térmico (conhecido indutor de HSP70) era capaz de prolongar uma memória de curto

prazo para até 48 h. O efeito foi observado quando o choque era feito 4 h antes ou 1 h após o treino (Teskey et al., 2012). Posteriormente, os mesmos autores mostraram que o choque térmico ainda tinha efeito na manutenção da memória mesmo sendo aplicado de 1 até 3 dias antes do treino. Provaram também que a indução de HSP70 era necessário para este aumento da memória de longa duração (Sunada et al., 2016; Teskey et al., 2012)

Visto que a HSP70 mostrou-se importante nos processos de memória, passamos a pesquisar sua capacidade em modificar parâmetros comportamentais, por meio da indução com terapia térmica, a fim de minimizar os prejuízos encontrados na doença de Alzheimer, problema para o qual até hoje não existe tratamento eficaz. Considerando que o custo total mundial estimado para tratamento de demência é de US\$ 818 bilhões (Associação de Alzheimer, 2017), a terapia de choque térmico pode ser uma intervenção valiosa, pois é um tratamento não farmacológico de baixo custo, que pode ser facilmente aplicado na clínica. Com isso em mente, padronizamos um protocolo de sauna infra vermelha em camundongos 5XFAD, um modelo bem agressivo da doença de Alzheimer. Esta escolha foi devido ao fato de que as saunas tradicionais usam aquecedores para aquecer o ar a aproximadamente 80-100 °C, que então aquece o ocupante, principalmente por convecção, e pode acabar causando algum desconforto. Em contraste, a luz infravermelha penetra mais profundamente que o ar aquecido, onde os usuários desenvolvem um suor mais vigoroso a uma temperatura mais baixa (aproximadamente 60 °C) do que nas saunas tradicionais, proporcionando uma experiência mais confortável e relaxante (Beever, 2009).

O principal objetivo deste tratamento é elevar a temperatura corporal até 41 °C, uma vez que já foi demonstrado que tal tratamento induz a expressão de proteínas de choque térmico de 70 kDa (Bechtold et al., 2000; Chen & Brown, 2007). Como esperado, dois meses de tratamento, realizado duas vezes por semana, foram capazes de aumentar os níveis de HSP70 no hipocampo de camundongos 5XFAD quando este foi iniciado aos 3 ou 8 meses de idade. No córtex pré-frontal, houve aumento de HSP70 somente aos 10 meses de idade. Ambas estruturas são cruciais para a formação da memória, sendo altamente afetados na DA (Bakkour et al., 2013; Salat et al., 2001). Já é bem estabelecido que o aumento de HSP70 inibe a agregação da proteína tau, promove a eliminação de oligômeros de β -amiloide e melhora os sintomas relacionados à doença (Hoshino et al., 2011; Magrané et al., 2004). A indução dos níveis de HSP70 durante o choque térmico reduziu a hiperfosforilação da tau em células

PC12 (Kirby et al., 1994) e de oligômeros de β -amiloide de um modo dependente do choque térmico *in vivo* (Wu et al., 2010). A HSP70 também pode atuar modulando tanto as vias apoptóticas Apaf-1, dependentes de caspases, quanto AIF, independentes de caspases, resultando na atenuação da apoptose e, em última instância, na inibição da morte celular neuronal (Sabirzhanov et al., 2012).

Um fator que é listado como um sintoma consistente com o diagnóstico de DA é a perda de peso. Um estudo de (Gillette-Guyonnet et al., 2000) mostrou que mais de 40% dos pacientes com DA apresentam significativa perda de peso. Da mesma forma, já foi mostrado que os camundongos 5XFAD apresentam valores mais baixos de peso corporal em comparação com os camundongos selvagens, aos 9 meses de idade (Jawhar et al., 2012). Em nossos experimentos, encontramos uma redução no Índice de Lee no grupo controle aos 10 meses, quando comparado aos seus 8 meses de idade. Essa diferença foi resgatada pelo tratamento com choque térmico, uma vez que esse grupo conseguiu manter seu índice de Lee aos 10 meses de idade quando comparado aos 8, antes do início do tratamento. O risco de perda de peso tende a aumentar com a gravidade e a progressão da DA e é um preditor de mortalidade em humanos, enquanto o ganho de peso parece ter um efeito protetor (White, 1998). Apesar do peso não diferir quando avaliado isoladamente, o Índice de Lee nos mostra uma relação do crescimento com seu peso relativo. Sendo assim, o fato de o tratamento ter sido capaz de manter o índice de Lee estável aos 10 meses de idade mostra uma ferramenta valiosa para o uso da terapia de choque térmico.

A DA resulta em grande comprometimento cognitivo, sendo inclusive o principal fator diagnóstico da doença e o maior motivo da busca por ajuda médica. Há um prejuízo progressivo da memória episódica, memória de trabalho e de reconhecimento, manifestando-se como esquecimento (Gallagher & Koh, 2011; Jahn, 2013). Os camundongos 5XFAD apresentam déficits cognitivos similares. Aos 5 meses de idade mostram reduzida porcentagem de alternância no labirinto em Y, valores que se tornam mais significativos em 12 meses (Jawhar et al., 2012; Oakley et al., 2006). Utilizando a mesma tarefa comportamental, não encontramos alterações de alternância nos animais controles, tanto em 5 quanto em 10 meses de idade, quando comparados com os animais tratados. Esse resultado pode ser devido ao fato de nossos animais ainda não terem desenvolvido prejuízos nos momentos analisados e por este motivo o tratamento não também não teve efeito. Uma indicação disto é que não houve piora nos animais controle de 5 para 10 meses.

Também aos 5 meses de idade, (Joyashiki et al., 2011) encontraram disfunções na memória espacial e na memória de reconhecimento de objetos, enquanto Ohno (2007) relatou níveis reduzidos de aprendizado contextual junto com a redução de LTP em camundongos 5XFAD aos 6 meses de idade. Portanto, analisamos a memória dependente do hipocampo para testar se o tratamento com choque térmico seria capaz de melhorar os déficits relatados. Utilizando a tarefa de reconhecimento de objetos, encontramos um efeito positivo do tratamento, onde este foi capaz de melhorar o índice de exploração dos animais tratados, quando comparados com os controles, começando aos 3 ou 8 meses de idade. Além disso, quando comparamos os índices do treino com o do teste, dentro do mesmo grupo, podemos ver que os controles não aprenderam, pois mostraram valores iguais de exploração entre os objetos. Do contrário, os animais que foram tratados, tiveram valores mais elevados no teste quando comparado com o treino, confirmando assim que estes foram capazes de aprender a tarefa. Na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto, o tratamento também foi eficaz em melhorar a consolidação da memória, agora avaliada um dia depois do treino, tanto aos 5 como aos 10 meses de idade, quando comparado com o grupo não tratado.

Consistente com nossos resultados, um estudo com camundongos transgênicos expressando APPsw mostrou menor déficit cognitivo quando eles foram cruzados com camundongos transgênicos superexpressando HSP70. Embora não tenha afetado a produção de proteína β -amiloide, os camundongos apresentaram níveis mais baixos de deposição de placas e reduziram o dano sináptico e morte neuronal. A superexpressão de HSP70 também regulou positivamente a expressão da enzima de degradação da β -amiloide e TGF1 tanto *in vivo* como *in vitro*. Esses resultados sugerem que a superexpressão de HSP70 em camundongos suprime não apenas os fenótipos patológicos, mas também funcionais da DA (Hoshino et al., 2011). Em outro estudo, rHSP70 foi administrada por via intranasal por um mês, em camundongos de dois diferentes modelos da DA. Os autores mostraram que ela entrava rapidamente nas regiões encefálicas afetadas, atenuando múltiplas anormalidades morfológicas e cognitivas relacionadas à DA, inclusive protegendo a memória espacial (Bobkova et al., 2014).

O tratamento com choque térmico também foi capaz de aumentar as proteínas relacionadas à plasticidade, sugerindo alguns mecanismos pelos quais este poderia estar beneficiando os animais tratados nas tarefas de memória. Os níveis de BDNF se encontravam aumentados aos 5 e 10 meses no córtex pré-frontal quando comparado aos

respectivos controles. No hipocampo, apesar de não ter diferenças entre os grupos, o conteúdo de BDNF foi positivamente correlacionado com os níveis de HSP70 nesta mesma estrutura. O BDNF, como já descrito na introdução, é um dos genes alvo induzidos na formação da memória de longa duração e é necessário para que esta seja consolidada (Bekinschtein et al., 2008; Bekinschtein et al., 2008). Um estudo utilizando geldamicina, que é um indutor de proteínas de choque térmico, incluindo a HSP70, mostrou uma relação direta desta com elevações nos níveis de BDNF, pois foi capaz de elevar seus valores no hipocampo, prevenindo o comportamento tipo depressivo em camundongos (Hashikawa et al., 2017). Nós também encontramos pronunciada ativação de CREB no hipocampo de animais tratados, aos 10 meses de idade. Como sabemos, a fosforilação de CREB é essencial para a transcrição de vários genes envolvidos na consolidação da memória (Alberini, 2009; Johansen et al., 2011; Kandel, 2012; Roberson et al., 1999) e que a HSP70 é um gene alvo potencial devido à presença de um motivo CRE em sua região promotora (Choi et al., 1991; Murshid et al., 2010). Existe uma interrelação entre os dois e no nosso trabalho encontramos que o choque térmico também é capaz de induzir a ativação de CREB.

Embora o NF- κ B seja altamente ativado durante a inflamação e HSP70 é capaz de bloquear sua translocação para o núcleo (Chen et al., 2005), em nosso estudo, o tratamento de choque térmico não mostrou qualquer influência no conteúdo total de NF- κ B no hipocampo ou no córtex pré-frontal, no entanto, não medimos sua ativação. Também não houve efeito do tratamento na ativação da GSK3 no hipocampo nem no córtex pré-frontal, que é outra proteína que está envolvida na patologia da DA, aumentando a fosforilação da proteína tau e consequentemente sua agregação e toxicidade (Kremer et al., 2011). Avrahami e colaboradores (2013) não encontraram nenhuma mudança na expressão da HSP70 após o tratamento que inibe a GSK3 em camundongos 5XFAD. Como é bem conhecido que a GSK3 inativa o HSF-1 (Neef et al., 2011), fizemos uma análise de correlação e descobrimos que quanto maior são os níveis de HSP70 no hipocampo, menor a ativação da GSK3 aos 10 meses de idade.

Outro fator importante no quadro clínico desta doença são as alterações psicológicas, como a desinibição, que podem estar presentes em 20 a 35% dos pacientes, manifestado por comportamento socialmente inaceitável e euforia inapropriada (Chung & Cummings, 2000). Em fêmeas 5XFAD também foi encontrado uma característica similar, presente por um comportamento de ansiedade reduzido, refletido por mais tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz. Esse déficit

aparece aos 6 meses e aumenta de uma maneira dependente da idade. Aos 12 meses de idade elas também passam mais tempo no centro do campo aberto (Jawhar et al., 2012). Em nossos experimentos, encontramos efeitos do tratamento térmico nos níveis de ansiedade apenas em fêmeas, aos 10 meses de idade. Elas passaram mais tempo e tiveram mais entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, melhorando seus níveis de ansiedade quando comparadas aos seus controles. Em contraste, o comportamento locomotor não pareceu ser afetado, uma vez que não foi detectada diferença na distância nem na velocidade percorrida no campo aberto. Um estudo de (Bhattacharya et al., 2014) mostrou que as fêmeas exibiam densidade de placas da proteína β -amiloide consistentemente maior em comparação aos machos da mesma idade. De acordo com isso, (Devi et al., 2010) mostraram que fêmeas 5XFAD são mais vulneráveis e propensas a desenvolver depósitos de β -amiloide no hipocampo em resposta a estressores comportamentais adversos quando comparada aos machos. Eles argumentam que a maior prevalência de DA esporádica em mulheres pode ser, pelo menos em parte, atribuível a essa vulnerabilidade do encéfalo feminino a mecanismos de estresse, que favorecem o processamento amiloidogênico da proteína precursora da amiloide. Os efeitos da sauna infravermelha de longa distância sobre fatores psicológicos já foram relatados em seres humanos. Utilizando 20 sessões de 15 minutos, em uma temperatura de 60°C, durante um período de quatro semanas, (Masuda et al., 2005) encontraram melhorias significativas nas queixas somáticas, na fome e capacidade de relaxar.

Os efeitos do tratamento empregado em nosso estudo foi mais pronunciado aos 10 meses de idade, quando os déficits cognitivos e morfológicos são mais proeminentes em camundongos 5XFAD. O envelhecimento no sistema nervoso central pode envolver perda do controle de qualidade de proteínas, processo dependente do tempo e da atividade de chaperonas moleculares (Calderwood et al., 2009). Essa falha na capacidade de chaperona da HSP70 com o envelhecimento pode facilitar a formação de agregados proteicos, neste caso o de β -amiloide, e de emaranhados neurofibrilares constituídos de tau hiperfosforilada. Essa pode ser uma das razões pelas quais a doença é mais agressiva nos animais envelhecidos, e motivo do qual o tratamento mostrou maiores benefícios aos 10 meses de idade. Esses resultados sugerem que o tratamento é mais efetivo quando a progressão da doença é, na verdade, mais avançada e, por isso, é um candidato perfeito para ser usado na clínica, sendo capaz de modificar fenótipos relacionados ao comportamento, que atualmente não são tratáveis nesse estágio.

Nossos resultados lançam luz sobre um papel crítico da HSP70 nos mecanismos relacionados à memória, sendo capaz de atuar não somente como uma chaperona molecular, mas também através das vias de sinalização como a da MAPK. A HSP70 pode ser rapidamente induzida no hipocampo após aprendizado e também após reativação desta memória. A indução de HSP70 parece ser proporcional ao nível de informação a ser codificada. Esta proteína só está elevada no momento em que a memória ainda não está consolidada, e quando a tarefa é dominada, os níveis de HSP70 são reduzidos, podendo ser uma boa ferramenta para ser usada como um índice de aprendizagem. Quando aplicamos estas descobertas em ensaios com potencial clínico, obtivemos resultados extremamente benéficos a nível cognitivo em modelo severo da DA. O uso de tratamento de choque térmico, através da utilização de sauna infravermelha, mostrou que a indução de HSP70 é capaz de melhorar parâmetros que atualmente não possuem tratamento efetivo. Além disso, o tratamento é extremamente barato e facilmente aplicável em pacientes com a doença de Alzheimer.

7. CONCLUSÕES

A elevação de HSP70 no sistema nervoso central não resulta apenas em citoproteção, mas ela também participa de processos mnemônicos, podendo alterar parâmetros a nível comportamental, principalmente quando estes estão prejudicados por consequência de uma doença degenerativa. Portanto, métodos capazes de induzi-la se tornam um grande alvo não farmacológico com grande potencial terapêutico. Ressaltamos os seguintes achados:

- A HSP70 é rapidamente induzida no hipocampo de ratos após tarefa de aprendizagem.
- A sua indução foi localizada principalmente em sinapses entre os axônios colaterais de Schaffer e as células piramidais da região de CA1 do hipocampo, cruciais na formação de uma memória associativa.
- A HSP70 é induzida ainda mais rapidamente após reativação da memória, tanto de curta como de longa duração.
- A indução de HSP70 pelo processo de reconsolidação é maior onde há uma novidade e não é influenciada pelo estresse do choque.
- Infusão de rHSP70 no hipocampo imediatamente após aprendizado causa facilitação da memória, modulando a via da MAPK.
- Infusão de rHSP70 imediatamente após reativação de 4 ou 15 min não causou alterações a curto prazo, porém preveniu o esquecimento quando avaliado duas semanas depois.
- Tratamento de choque térmico por dois meses em camundongos 5XFAD, modelo da doença de Alzheimer, foi capaz de melhorar parâmetros cognitivos como ansiedade, memória de reconhecimento e memória aversiva condicionada ao contexto.
- O tratamento também elevou os valores de HSP70 no hipocampo e córtex pré-frontal, além de elevar proteínas relacionadas à plasticidade, BDNF e CREBp. Entretanto, não causou modificações nos níveis proteicos de NFκ-B e na ativação de GSK3.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, *11*(2), 180-187.
- Akerfelt, M., Morimoto, R. I., & Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(8), 545-555. doi:10.1038/nrm2938
- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., & Ikeda, K. (2000). Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, *14 Suppl 1*, S47-53.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., . . . Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *21*(3), 383-421.
- Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev*, *89*(1), 121-145. doi:10.1152/physrev.00017.2008
- Alberini, C. M., Milekic, M. H., & Tronel, S. (2006). Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. *Cell Mol Life Sci*, *63*(9), 999-1008. doi:10.1007/s00018-006-6025-7
- Alonso, M., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2003). Memory formation requires p38MAPK activity in the rat hippocampus. *Neuroreport*, *14*(15), 1989-1992. doi:10.1097/01.wnr.0000091129.97039.f6
- Alzheimer Association (2017). Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement* 2017;13:325-373.
- Ambrosini, M. V., Mariucci, G., Tantucci, M., Bruscellini, G., & Giuditta, A. (1999). Induction of cerebellar hsp72 in rats learning a two-way active avoidance task. *Brain Res Mol Brain Res*, *70*(1), 164-166.
- Ambrosini, M. V., Mariucci, G., Tantucci, M., Van Hooijdonk, L., & Ammassari-Teule, M. (2005). Hippocampal 72-kDa heat shock protein expression varies according to mice learning performance independently from chronic exposure to stress. *Hippocampus*, *15*(4), 413-417. doi:10.1002/hipo.20069
- Ammon-Treiber, S., Grecksch, G., Angelidis, C., Vezyraki, P., Höllt, V., & Becker, A. (2008). Emotional and learning behaviour in mice overexpressing heat shock protein 70. *Neurobiol Learn Mem*, *90*(2), 358-364. doi:10.1016/j.nlm.2008.04.006
- Asea, A. (2005). Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. *Exerc Immunol Rev*, *11*, 34-45.
- Avrahami, L., Farfara, D., Shaham-Kol, M., Vassar, R., Frenkel, D., & Eldar-Finkelman, H. (2013). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 ameliorates β -amyloid pathology and restores lysosomal acidification and mammalian target of rapamycin activity in the Alzheimer disease mouse model: in vivo and in vitro studies. *J Biol Chem*, *288*(2), 1295-1306. doi:10.1074/jbc.M112.409250
- Bakkour, A., Morris, J. C., Wolk, D. A., & Dickerson, B. C. (2013). The effects of aging and Alzheimer's disease on cerebral cortical anatomy: specificity and differential relationships with cognition. *Neuroimage*, *76*, 332-344. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.02.059
- Bechtold, D. A., Rush, S. J., & Brown, I. R. (2000). Localization of the heat-shock protein Hsp70 to the synapse following hyperthermic stress in the brain. *J Neurochem*, *74*(2), 641-646.

- Beever, R. (2009). Far-infrared saunas for treatment of cardiovascular risk factors: summary of published evidence. *Can Fam Physician*, *55*(7), 691-696.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2008). BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist*, *14*(2), 147-156. doi:10.1177/1073858407305850
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., . . . Medina, J. H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(7), 2711-2716. doi:10.1073/pnas.0711863105
- Belay, H. T., & Brown, I. R. (2006). Cell death and expression of heat-shock protein Hsc70 in the hyperthermic rat brain. *J Neurochem*, *97 Suppl 1*, 116-119. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03591.x
- Bertaina-Anglade, V., Tramu, G., & Destrade, C. (2000). Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *Eur J Neurosci*, *12*(10), 3803-3812.
- Bhattacharya, S., Haertel, C., Maelicke, A., & Montag, D. (2014). Galantamine slows down plaque formation and behavioral decline in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, *9*(2), e89454. doi:10.1371/journal.pone.0089454
- Bobkova, N. V., Garbuz, D. G., Nesterova, I., Medvinskaya, N., Samokhin, A., Alexandrova, I., . . . Evgen'ev, M. (2014). Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, *38*(2), 425-435. doi:10.3233/JAD-130779
- Boorstein, W. R., Ziegelhoffer, T., & Craig, E. A. (1994). Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol*, *38*(1), 1-17.
- Calderwood, S. K. (2007). Heat shock proteins in extracellular signaling. *Methods*, *43*(3), 167. doi:10.1016/j.ymeth.2007.09.004
- Calderwood, S. K., Murshid, A., & Prince, T. (2009). The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology*, *55*(5), 550-558. doi:10.1159/000225957
- Casagrande, M. A., Haubrich, J., Pedraza, L. K., Popik, B., Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2018). Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course. *Neurobiol Learn Mem*, *150*, 42-47. doi:10.1016/j.nlm.2018.03.002
- Chen, H. W., Kuo, H. T., Wang, S. J., Lu, T. S., & Yang, R. C. (2005). In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity. *Shock*, *24*(3), 232-238.
- Chen, S., & Brown, I. R. (2007). Translocation of constitutively expressed heat shock protein Hsc70 to synapse-enriched areas of the cerebral cortex after hyperthermic stress. *J Neurosci Res*, *85*(2), 402-409. doi:10.1002/jnr.21124
- Chen, Y., Wang, B., Liu, D., Li, J. J., Xue, Y., Sakata, K., . . . Liao, F. F. (2014). Hsp90 chaperone inhibitor 17-AAG attenuates A β -induced synaptic toxicity and memory impairment. *J Neurosci*, *34*(7), 2464-2470. doi:10.1523/JNEUROSCI.0151-13.2014
- Chen, Z. C., Wu, W. S., Lin, M. T., & Hsu, C. C. (2009). Protective effect of transgenic expression of porcine heat shock protein 70 on hypothalamic ischemic and oxidative damage in a mouse model of heatstroke. *BMC Neurosci*, *10*, 111. doi:10.1186/1471-2202-10-111

- Choi, H. S., Li, B., Lin, Z., Huang, E., & Liu, A. Y. (1991). cAMP and cAMP-dependent protein kinase regulate the human heat shock protein 70 gene promoter activity. *J Biol Chem*, *266*(18), 11858-11865.
- Chow, A. M., & Brown, I. R. (2007). Induction of heat shock proteins in differentiated human and rodent neurons by celastrol. *Cell Stress Chaperones*, *12*(3), 237-244.
- Chung, J. A., & Cummings, J. L. (2000). Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. *Neurol Clin*, *18*(4), 829-846.
- Curran, B. P., Murray, H. J., & O'Connor, J. J. (2003). A role for c-Jun N-terminal kinase in the inhibition of long-term potentiation by interleukin-1beta and long-term depression in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience*, *118*(2), 347-357.
- De Maio, A. (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, *11*(1), 1-12.
- De Maio, A. (2011). Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*, *16*(3), 235-249. doi:10.1007/s12192-010-0236-4
- Devi, L., Alldred, M. J., Ginsberg, S. D., & Ohno, M. (2010). Sex- and brain region-specific acceleration of β -amyloidogenesis following behavioral stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Brain*, *3*, 34. doi:10.1186/1756-6606-3-34
- Dudai, Y., & Morris, R. G. (2013). Memorable trends. *Neuron*, *80*(3), 742-750. doi:10.1016/j.neuron.2013.09.039
- Eales, K. L., Palygin, O., O'Loughlin, T., Rasooli-Nejad, S., Gaestel, M., Müller, J., . . . Corrêa, S. A. (2014). The MK2/3 cascade regulates AMPAR trafficking and cognitive flexibility. *Nat Commun*, *5*, 4701. doi:10.1038/ncomms5701
- Ekimova, I. V., Nitsinskaya, L. E., Romanova, I. V., Pastukhov, Y. F., Margulis, B. A., & Guzhova, I. V. (2010). Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. *J Neurochem*, *115*(4), 1035-1044. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06989.x
- Frenkel, L., Dimant, B., Suárez, L. D., Portiansky, E. L., & Delorenzi, A. (2012). Food odor, visual danger stimulus, and retrieval of an aversive memory trigger heat shock protein HSP70 expression in the olfactory lobe of the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Neuroscience*, *201*, 239-251. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.10.052
- Gabai, V. L., Meriin, A. B., Mosser, D. D., Caron, A. W., Rits, S., Shifrin, V. I., & Sherman, M. Y. (1997). Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem*, *272*(29), 18033-18037.
- Gabai, V. L., Meriin, A. B., Yaglom, J. A., Volloch, V. Z., & Sherman, M. Y. (1998). Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett*, *438*(1-2), 1-4.
- Gallagher, M., & Koh, M. T. (2011). Episodic memory on the path to Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*, *21*(6), 929-934. doi:10.1016/j.conb.2011.10.021
- Gillette-Guyonnet, S., Nourhashemi, F., Andrieu, S., de Glisezinski, I., Ousset, P. J., Riviere, D., . . . Vellas, B. (2000). Weight loss in Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*, *71*(2), 637S-642S. doi:10.1093/ajcn/71.2.637s
- Guzhova, I., Kislyakova, K., Moskaliova, O., Fridlanskaya, I., Tytell, M., Cheetham, M., & Margulis, B. (2001). In vitro studies show that Hsp70 can be released by

- glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res*, 914(1-2), 66-73.
- Guzhova, I. V., Arnholdt, A. C., Darieva, Z. A., Kinev, A. V., Lasunskaja, E. B., Nilsson, K., . . . Margulis, B. A. (1998). Effects of exogenous stress protein 70 on the functional properties of human promonocytes through binding to cell surface and internalization. *Cell Stress Chaperones*, 3(1), 67-77.
- Hardy, J. (2009). The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem*, 110(4), 1129-1134. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06181.x
- Hashikawa, N., Utaka, Y., Ogawa, T., Tanoue, R., Morita, Y., Yamamoto, S., . . . Hashikawa-Hobara, N. (2017). HSP105 prevents depression-like behavior by increasing hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels in mice. *Sci Adv*, 3(5), e1603014. doi:10.1126/sciadv.1603014
- Hoshino, T., Murao, N., Namba, T., Takehara, M., Adachi, H., Katsuno, M., . . . Mizushima, T. (2011). Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J Neurosci*, 31(14), 5225-5234. doi:10.1523/JNEUROSCI.5478-10.2011
- Hung, C. H., Lin, M. T., Liao, J. F., & Wang, J. J. (2004). Scopolamine-induced amnesia can be prevented by heat shock pretreatment in rats. *Neurosci Lett*, 364(2), 63-66. doi:10.1016/j.neulet.2004.02.074
- Igaz, L. M., Bekinschtein, P., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2004). One-trial aversive learning induces late changes in hippocampal CaMKIIalpha, Homer 1a, Syntaxin 1a and ERK2 protein levels. *Brain Res Mol Brain Res*, 132(1), 1-12. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.08.016
- Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*, 29(9), 496-505. doi:10.1016/j.tins.2006.07.005
- Jahn, H. (2013). Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*, 15(4), 445-454.
- Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T. A., & Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 33(1), 196.e129-140. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027
- Jinwal, U. K., O'Leary, J. C., Borysov, S. I., Jones, J. R., Li, Q., Koren, J., . . . Dickey, C. A. (2010). Hsc70 rapidly engages tau after microtubule destabilization. *J Biol Chem*, 285(22), 16798-16805. doi:10.1074/jbc.M110.113753
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147(3), 509-524. doi:10.1016/j.cell.2011.10.009
- Josselyn, S. A., Köhler, S., & Frankland, P. W. (2015). Finding the engram. *Nat Rev Neurosci*, 16(9), 521-534. doi:10.1038/nrn4000
- Joyashiki, E., Matsuya, Y., & Tohda, C. (2011). Somnifone improves memory impairments and increases axonal density in Alzheimer's disease model mice, 5XFAD. *Int J Neurosci*, 121(4), 181-190. doi:10.3109/00207454.2010.541571
- Kandel, E. R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain*, 5, 14. doi:10.1186/1756-6606-5-14
- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163-186. doi:10.1016/j.cell.2014.03.001

- Kaneko, M., Abe, K., Kogure, K., Saito, H., & Matsuki, N. (1993). Correlation between electroconvulsive seizure and HSC70 mRNA induction in mice brain. *Neurosci Lett*, *157*(2), 195-198.
- Karunanithi, S., Barclay, J. W., Brown, I. R., Robertson, R. M., & Atwood, H. L. (2002). Enhancement of presynaptic performance in transgenic *Drosophila* overexpressing heat shock protein Hsp70. *Synapse*, *44*(1), 8-14. doi:10.1002/syn.10048
- Katche, C., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2013). Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. *Neurobiol Learn Mem*, *106*, 40-47. doi:10.1016/j.nlm.2013.06.018
- Kiang, J. G., & Tsokos, G. C. (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther*, *80*(2), 183-201.
- Kirby, B. A., Merril, C. R., Ghanbari, H., & Wallace, W. C. (1994). Heat shock proteins protect against stress-related phosphorylation of tau in neuronal PC12 cells that have acquired thermotolerance. *J Neurosci*, *14*(9), 5687-5693.
- Kremer, A., Louis, J. V., Jaworski, T., & Van Leuven, F. (2011). GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction.... *Front Mol Neurosci*, *4*, 17. doi:10.3389/fnmol.2011.00017
- Lee, J. E., Yenari, M. A., Sun, G. H., Xu, L., Emond, M. R., Cheng, D., . . . Giffard, R. G. (2001). Differential neuroprotection from human heat shock protein 70 overexpression in in vitro and in vivo models of ischemia and ischemia-like conditions. *Exp Neurol*, *170*(1), 129-139. doi:10.1006/exnr.2000.7614
- Lee, J. L., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, *304*(5672), 839-843. doi:10.1126/science.1095760
- Li, X. M., Li, C. C., Yu, S. S., Chen, J. T., Sabapathy, K., & Ruan, D. Y. (2007). JNK1 contributes to metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression and short-term synaptic plasticity in the mice area hippocampal CA1. *Eur J Neurosci*, *25*(2), 391-396. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05300.x
- Lin, Y. W., Yang, H. W., Min, M. Y., & Chiu, T. H. (2004). Heat-shock pretreatment prevents suppression of long-term potentiation induced by scopolamine in rat hippocampal CA1 synapses. *Brain Res*, *999*(2), 222-226. doi:10.1016/j.brainres.2003.11.057
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, *22*, 631-677. doi:10.1146/annurev.ge.22.120188.003215
- Loones, M. T., Chang, Y., & Morange, M. (2000). The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation. *Cell Stress Chaperones*, *5*(4), 291-305.
- Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R., & Nader, K. (2015). Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *J Neurosci*, *35*(6), 2465-2475. doi:10.1523/JNEUROSCI.0735-14.2015
- Lu, R. C., Tan, M. S., Wang, H., Xie, A. M., Yu, J. T., & Tan, L. (2014). Heat shock protein 70 in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*, *2014*, 435203. doi:10.1155/2014/435203
- Lu, T. Z., Quan, Y., & Feng, Z. P. (2010). Multifaceted role of heat shock protein 70 in neurons. *Mol Neurobiol*, *42*(2), 114-123. doi:10.1007/s12035-010-8116-6
- Magrané, J., Smith, R. C., Walsh, K., & Querfurth, H. W. (2004). Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-

- amyloid in neurons. *J Neurosci*, 24(7), 1700-1706. doi:10.1523/JNEUROSCI.4330-03.2004
- Masuda, A., Nakazato, M., Kihara, T., Minagoe, S., & Tei, C. (2005). Repeated thermal therapy diminishes appetite loss and subjective complaints in mildly depressed patients. *Psychosom Med*, 67(4), 643-647. doi:10.1097/01.psy.0000171812.67767.8f
- Matsumori, Y., Northington, F. J., Hong, S. M., Kayama, T., Sheldon, R. A., Vexler, Z. S., . . . Liu, J. (2006). Reduction of caspase-8 and -9 cleavage is associated with increased c-FLIP and increased binding of Apaf-1 and Hsp70 after neonatal hypoxic/ischemic injury in mice overexpressing Hsp70. *Stroke*, 37(2), 507-512. doi:10.1161/01.STR.0000199057.00365.20
- Mayer, M. P. (2013). Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci*, 38(10), 507-514. doi:10.1016/j.tibs.2013.08.001
- Mayer, M. P., Schröder, H., Rüdiger, S., Paal, K., Laufen, T., & Bukau, B. (2000). Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol*, 7(7), 586-593. doi:10.1038/76819
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251.
- Mokrushin, A. A., Pavlinova, L. I., & Plekhanov, A. Y. (2005). Heat shock protein HSP70 increases the resistance of cortical cells to glutamate excitotoxicity. *Bull Exp Biol Med*, 140(1), 1-5.
- Morrison-Bogorad, M., Pardue, S., McIntire, D. D., & Miller, E. K. (1994). Cell size and the heat-shock response in rat brain. *J Neurochem*, 63(3), 857-867.
- Moser, E. I., Krobot, K. A., Moser, M. B., & Morris, R. G. (1998). Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science*, 281(5385), 2038-2042.
- Moult, P. R., Corrêa, S. A., Collingridge, G. L., Fitzjohn, S. M., & Bashir, Z. I. (2008). Co-activation of p38 mitogen-activated protein kinase and protein tyrosine phosphatase underlies metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Physiol*, 586(10), 2499-2510. doi:10.1113/jphysiol.2008.153122
- Muchowski, P. J., & Wacker, J. L. (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci*, 6(1), 11-22. doi:10.1038/nrn1587
- Murshid, A., Chou, S. D., Prince, T., Zhang, Y., Bharti, A., & Calderwood, S. K. (2010). Protein kinase A binds and activates heat shock factor 1. *PLoS One*, 5(11), e13830. doi:10.1371/journal.pone.0013830
- Nadel, L., Hupbach, A., Gomez, R., & Newman-Smith, K. (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neurosci Biobehav Rev*, 36(7), 1640-1645. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.03.001
- Neef, D. W., Jaeger, A. M., & Thiele, D. J. (2011). Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 10(12), 930-944. doi:10.1038/nrd3453
- Nishimura, R. N., & Dwyer, B. E. (1996). Evidence for different mechanisms of induction of HSP70i: a comparison of cultured rat cortical neurons with astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*, 36(2), 227-239.
- O'Dell, T. J., Kandel, E. R., & Grant, S. G. (1991). Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature*, 353(6344), 558-560. doi:10.1038/353558a0
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., . . . Vassar, R. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential

- factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 26(40), 10129-10140. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
- Ohtsuka, K., & Suzuki, T. (2000). Roles of molecular chaperones in the nervous system. *Brain Res Bull*, 53(2), 141-146.
- Orosz, A., Wisniewski, J., & Wu, C. (1996). Regulation of Drosophila heat shock factor trimerization: global sequence requirements and independence of nuclear localization. *Mol Cell Biol*, 16(12), 7018-7030.
- Ortega, L., Calvillo, M., Luna, F., Pérez-Severiano, F., Rubio-Osornio, M., Guevara, J., & Limón, I. D. (2014). 17-AAG improves cognitive process and increases heat shock protein response in a model lesion with A β 25-35. *Neuropeptides*, 48(4), 221-232. doi:10.1016/j.npep.2014.04.006
- Pavlik, A., Aneja, I. S., Lexa, J., & Al-Zoabi, B. A. (2003). Identification of cerebral neurons and glial cell types inducing heat shock protein Hsp70 following heat stress in the rat. *Brain Res*, 973(2), 179-189.
- PENFIELD, W. (1958). Functional localization in temporal and deep sylvian areas. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 36, 210-226.
- Pini, L., Pievani, M., Bocchetta, M., Altomare, D., Bosco, P., Cavedo, E., . . . Frisoni, G. B. (2016). Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Res Rev*, 30, 25-48. doi:10.1016/j.arr.2016.01.002
- Pizarro, J. M., Haro, L. S., & Barea-Rodriguez, E. J. (2003). Learning associated increase in heat shock cognate 70 mRNA and protein expression. *Neurobiol Learn Mem*, 79(2), 142-151.
- Piñeyro, M. E., Ferrer Monti, R. I., Alfei, J. M., Bueno, A. M., & Urcelay, G. P. (2013). Memory destabilization is critical for the success of the reactivation-extinction procedure. *Learn Mem*, 21(1), 46-54. doi:10.1101/lm.032714.113
- Porto, R. R., Dutra, F. D., Crestani, A. P., Holsinger, R. M. D., Quillfeldt, J. A., Homem de Bittencourt, P. I., & de Oliveira Alvares, L. (2018). HSP70 Facilitates Memory Consolidation of Fear Conditioning through MAPK Pathway in the Hippocampus. *Neuroscience*, 375, 108-118. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.01.028
- Price, B. D., & Calderwood, S. K. (1991). Ca²⁺ is essential for multistep activation of the heat shock factor in permeabilized cells. *Mol Cell Biol*, 11(6), 3365-3368.
- Rao, A., & Steward, O. (1991). Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes. *J Neurosci*, 11(9), 2881-2895.
- Rescorla, R. A. (2004). Spontaneous recovery. *Learn Mem*, 11(5), 501-509. doi:10.1101/lm.77504
- Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. *Experientia*.18: 571-573. 1962.
- Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratieck, C., & Sweatt, J. D. (1999). The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci*, 19(11), 4337-4348.
- Sabirzhanov, B., Stoica, B. A., Hanscom, M., Piao, C. S., & Faden, A. I. (2012). Overexpression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *J Neurochem*, 123(4), 542-554. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07927.x
- Salat, D. H., Kaye, J. A., & Janowsky, J. S. (2001). Selective preservation and degeneration within the prefrontal cortex in aging and Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 58(9), 1403-1408.

- Schafe, G. E., Nader, K., Blair, H. T., & LeDoux, J. E. (2001). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci*, *24*(9), 540-546.
- SCOVILLE, W. B., & MILNER, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *20*(1), 11-21.
- Seger, R., & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, *9*(9), 726-735.
- Semon, R. (1921) *The Mneme* (G. Allen & Unwin).
- Sheller, R. A., Smyers, M. E., Grossfeld, R. M., Ballinger, M. L., & Bittner, G. D. (1998). Heat-shock proteins in axoplasm: high constitutive levels and transfer of inducible isoforms from glia. *J Comp Neurol*, *396*(1), 1-11.
- Sherrin, T., Blank, T., Hippel, C., Rayner, M., Davis, R. J., & Todorovic, C. (2010). Hippocampal c-Jun-N-terminal kinases serve as negative regulators of associative learning. *J Neurosci*, *30*(40), 13348-13361. doi:10.1523/JNEUROSCI.3492-10.2010
- Sherrin, T., Blank, T., & Todorovic, C. (2011). c-Jun N-terminal kinases in memory and synaptic plasticity. *Rev Neurosci*, *22*(4), 403-410. doi:10.1515/RNS.2011.032
- Song, I., Kamboj, S., Xia, J., Dong, H., Liao, D., & Huganir, R. L. (1998). Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron*, *21*(2), 393-400.
- Sousa, R., & Lafer, E. M. (2015). The role of molecular chaperones in clathrin mediated vesicular trafficking. *Front Mol Biosci*, *2*, 26. doi:10.3389/fmolb.2015.00026
- Sousa, R., Liao, H. S., Cuéllar, J., Jin, S., Valpuesta, J. M., Jin, A. J., & Lafer, E. M. (2016). Clathrin-coat disassembly illuminates the mechanisms of Hsp70 force generation. *Nat Struct Mol Biol*, *23*(9), 821-829. doi:10.1038/nsmb.3272
- Sunada, H., Riaz, H., de Freitas, E., Lukowiak, K., Swinton, C., Swinton, E., . . . Komatsuzaki, Y. (2016). Heat stress enhances LTM formation in *Lymnaea*: role of HSPs and DNA methylation. *J Exp Biol*, *219*(Pt 9), 1337-1345. doi:10.1242/jeb.134296
- Suzuki, A., Fukushima, H., Mukawa, T., Toyoda, H., Wu, L. J., Zhao, M. G., . . . Kida, S. (2011). Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *J Neurosci*, *31*(24), 8786-8802. doi:10.1523/JNEUROSCI.3257-10.2011
- Swayne, L. A., Beck, K. E., & Braun, J. E. (2006). The cysteine string protein multimeric complex. *Biochem Biophys Res Commun*, *348*(1), 83-91. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.033
- Taylor, A. R., Robinson, M. B., Gifondorwa, D. J., Tytell, M., & Milligan, C. E. (2007). Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev Neurobiol*, *67*(13), 1815-1829. doi:10.1002/dneu.20559
- Taylor, D. M., De Koninck, P., Minotti, S., & Durham, H. D. (2007). Manipulation of protein kinases reveals different mechanisms for upregulation of heat shock proteins in motor neurons and non-neuronal cells. *Mol Cell Neurosci*, *34*(1), 20-33. doi:10.1016/j.mcn.2006.09.007
- Teskey, M. L., Lukowiak, K. S., Riaz, H., Dalesman, S., & Lukowiak, K. (2012). What's hot: the enhancing effects of thermal stress on long-term memory formation in *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol*, *215*(Pt 24), 4322-4329. doi:10.1242/jeb.075960
- Thomas, G. M., & Huganir, R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, *5*(3), 173-183. doi:10.1038/nrn1346

- Thomas, G. M., Lin, D. T., Nuriya, M., & Huganir, R. L. (2008). Rapid and bi-directional regulation of AMPA receptor phosphorylation and trafficking by JNK. *EMBO J*, 27(2), 361-372. doi:10.1038/sj.emboj.7601969
- Thériault, J. R., Adachi, H., & Calderwood, S. K. (2006). Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *J Immunol*, 177(12), 8604-8611.
- Tong, L., Prieto, G. A., Kramár, E. A., Smith, E. D., Cribbs, D. H., Lynch, G., & Cotman, C. W. (2012). Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 β via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci*, 32(49), 17714-17724. doi:10.1523/JNEUROSCI.1253-12.2012
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S. E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., . . . Eisenberg, E. (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*, 378(6557), 632-635. doi:10.1038/378632a0
- Walker, P. D., & Carlock, L. R. (1993). Timing the excitotoxic induction of heat shock protein 70 transcription. *Neuroreport*, 4(6), 699-702.
- Wang, Q., Walsh, D. M., Rowan, M. J., Selkoe, D. J., & Anwyl, R. (2004). Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci*, 24(13), 3370-3378. doi:10.1523/JNEUROSCI.1633-03.2004
- White, H. (1998). Weight change in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging*, 2(2), 110-112.
- Winters, B. D., Tucci, M. C., & DaCosta-Furtado, M. (2009). Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learn Mem*, 16(9), 545-553. doi:10.1101/lm.1509909
- Wu, Y., Cao, Z., Klein, W. L., & Luo, Y. (2010). Heat shock treatment reduces beta amyloid toxicity in vivo by diminishing oligomers. *Neurobiol Aging*, 31(6), 1055-1058. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.013
- Xiong, W., Kojic, L. Z., Zhang, L., Prasad, S. S., Douglas, R., Wang, Y., & Cynader, M. S. (2006). Anisomycin activates p38 MAP kinase to induce LTD in mouse primary visual cortex. *Brain Res*, 1085(1), 68-76. doi:10.1016/j.brainres.2006.02.015
- Xu, L., & Giffard, R. G. (1997). HSP70 protects murine astrocytes from glucose deprivation injury. *Neurosci Lett*, 224(1), 9-12.
- Yang, Y., Janich, S., Cohn, J. A., & Wilson, J. M. (1993). The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(20), 9480-9484.
- Yao, S., Peng, M., Zhu, X., Cheng, M., & Qi, X. (2007). Heat shock protein72 protects hippocampal neurons from apoptosis induced by chronic psychological stress. *Int J Neurosci*, 117(11), 1551-1564. doi:10.1080/00207450701239285
- Young, J. C. (2014). The role of the cytosolic HSP70 chaperone system in diseases caused by misfolding and aberrant trafficking of ion channels. *Dis Model Mech*, 7(3), 319-329. doi:10.1242/dmm.014001
- Zheng, Z., Kim, J. Y., Ma, H., Lee, J. E., & Yenari, M. A. (2008). Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(1), 53-63. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600502

- Zhu, J. J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., & Malinow, R. (2002). Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell*, *110*(4), 443-455.
- Zhu, Y., Pak, D., Qin, Y., McCormack, S. G., Kim, M. J., Baumgart, J. P., . . . Zhu, J. J. (2005). Rap2-JNK removes synaptic AMPA receptors during depotentiation. *Neuron*, *46*(6), 905-916. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.037

APÊNDICE

Resultados com infusão do inibidor da função ATPase da HSP70 no hipocampo dorsal. Dados não incorporados no corpo da tese por problemas metodológicos nos testes comportamentais utilizados, assim optamos por deixá-los de fora da discussão.

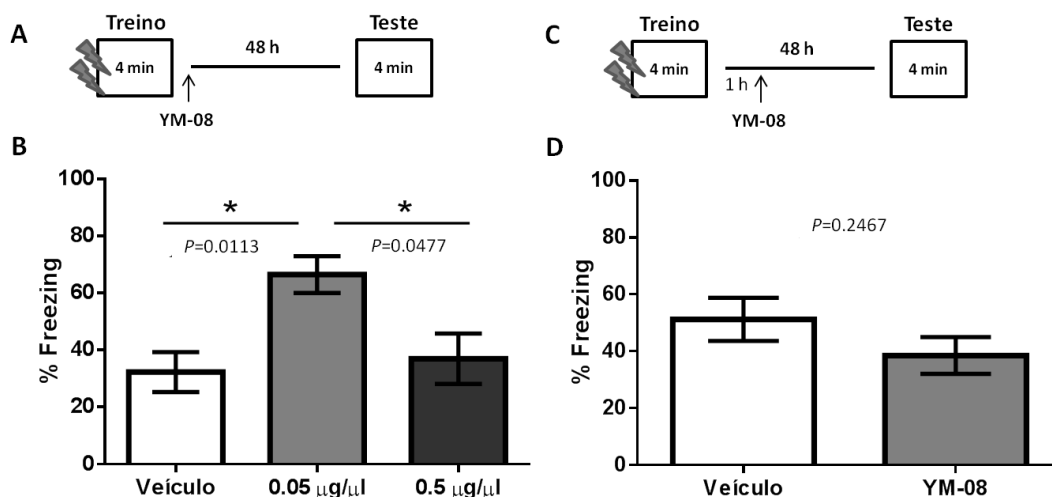


Figura 1. Bloqueio da atividade ATPase da HSP70 facilita consolidação da memória. (A e C) Desenho experimental. (B) YM-08 foi infundido bilateralmente no hipocampo dorsal imediatamente após treino de CAC nas concentrações de 0.05 e 0.5 µg/µl ($n=6-9$) e os animais foram testados 48 h depois. ANOVA de uma via ($P=0.0115$) seguido de post hoc de Tukey ($*P<0.05$). (D) YM-08 (0.05 µg/µl) foi infundido bilateralmente no hipocampo dorsal 1 h após treino de CAC ($n=6-8$) e os animais foram testados 48 h depois. Teste t de Student ($P=0.2467$). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM.

Protocolo de choque imediato (reconsolidação): Os animais são somente expostos ao contexto por 3 min. No dia seguinte, eles são colocados novamente no aparato por 15 s e então recebem 2 ou 4 choques de 0.7 mA, com duração de 2 s cada, e voltam para suas caixas de habitação.

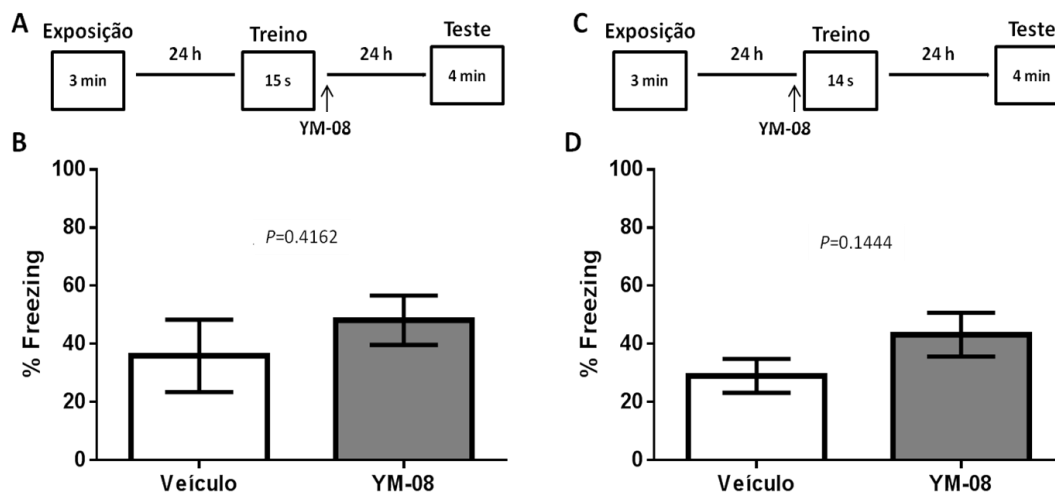


Figura 2. Bloqueio da atividade ATPase da HSP70 antes ou depois da reativação de choque imediato. **(A e C)** Desenho experimental. **(B)** YM-08 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) foi infundido bilateralmente no hipocampo dorsal imediatamente após reativação com choque imediato (dois de 0.7 mA) no CAC ($n=5-8$) e os animais foram testados 24 h depois. Teste t de Student ($P=0.4162$). **(D)** YM-08 (0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) foi infundido bilateralmente no hipocampo dorsal 20 min antes da reativação com choque imediato (um de 0.7 mA) no CAC ($n=5-6$) e os animais foram testados 24 h depois. Teste t de Student ($P=0.1444$). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM.

Labirinto aquático de Morris: Os animais foram submetidos à tarefa por sete dias consecutivos, sendo que nos cinco primeiros dias a plataforma permaneceu sempre no mesmo lugar e os animais foram largados de quatro pontos cardeais randomicamente a cada tentativa, com a cabeça virada para a parede do WM (sendo realizado 6 trials consecutivos por dia). Eles tem 60 segundos para achar a plataforma (tempo de uma tentativa) e, se isso não ocorrer, eles são gentilmente conduzidos até ela pelo experimentador e permanecem 20 segundos sobre ela para que possam se localizar e localizar a plataforma no contexto (se ele encontrar antes, também permanece 20 segundos). O tempo que ele levou para encontrar a plataforma em cada tentativa é anotado. No sexto dia do protocolo, a plataforma é deslocada para o quadrante oposto, e os animais são “retreinados” com 8 trials consecutivos (treino chamado de “aprendizado reverso”), cada tentativa sendo realizado de maneira idêntica à descrita acima. No dia seguinte é realizado o teste, em que não há plataforma. O animal é posto sempre no

quadrante equidistante às duas plataformas e pode explorar a piscina por 2 minutos. No teste é contabilizado o tempo que o animal permaneceu no quadrante alvo (do aprendizado reverso) e no quadrante oposto (do treino).

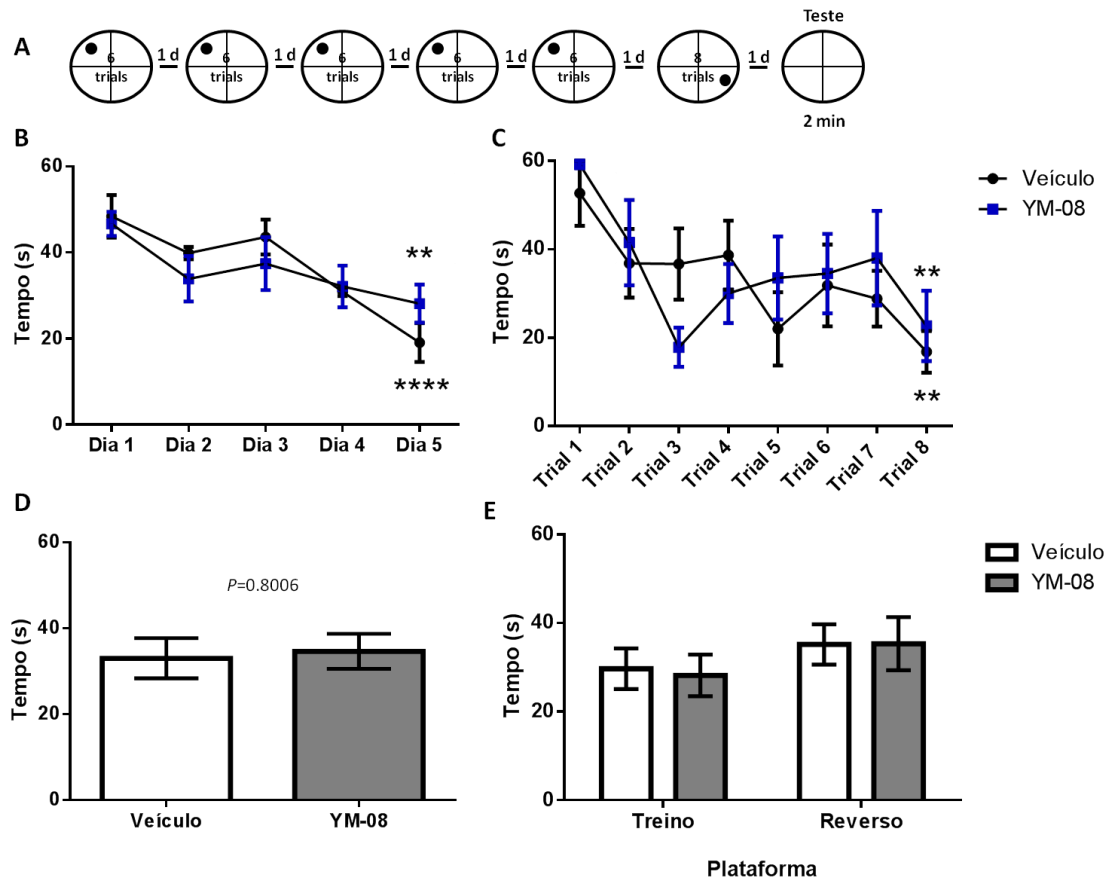


Figura 3. Bloqueio da atividade ATPase da HSP70 na reconsolidação de memória espacial. **(A)** Desenho experimental. **(B)** Curva de aprendizagem ao longo dos dias no labirinto aquático ($n=6$). ANOVA de duas vias de medidas repetidas (Interação $P=0.1783$; Dia $P<0.0001$; Tratamento $P=0.8642$) seguido de post hoc de Tukey (** $P<0.01$; (**** $P<0.0001$). **(C)** YM-08 ($0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) foi infundido bilateralmente no hipocampo dorsal 20 min antes do aprendizado reverso. Curva de aprendizagem entre os trials do treino reverso. ANOVA de duas vias de medidas repetidas (Interação $P=0.3588$; Dia $P<0.0002$; Tratamento $P=0.8006$) **(D)** Média de tempo para encontrar a plataforma no treino reverso no grupo veículo e YM-08. Teste t de Student ($P=0.8006$). **(E)** Teste onde foi avaliado o tempo em que cada grupo permaneceu no quadrante onde estava a plataforma do treino nos primeiros 5 dias e no aprendizado reverso. ANOVA de duas vias (Interação $P=0.9045$; Dia $P=0.3718$; Tratamento $P=0.7498$). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM.



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 27791

Título: INFLUÊNCIA DA HSP70 NA CONSOLIDAÇÃO, RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

Lucas de Oliveira Alvares - coordenador desde 01/09/2014
PAULO IVO HOMEM DE BITTENCOURT JUNIOR - pesquisador desde 01/09/2014
Ana Paula Crestani - Aluno de Doutorado desde 01/09/2014
Fabrício Diniz Dutra - Aluno de Doutorado desde 01/09/2014
Rossana Rosa Porto - Aluno de Doutorado desde 01/09/2014
ANDRÉ SIZER - Aluno de Mestrado desde 01/09/2014
Lizeth Katherine Pedraza Correa - Aluno de Mestrado desde 01/09/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 08/12/2014 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus do Centro - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 796 ratos Wistar machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 17 de Dezembro de 2014

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética