

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO

ISABELA CAVALHEIRO LAVICH

**Efeitos do Sulforafano sobre a disfunção cognitiva induzida pelo acúmulo
de ferro cerebral**

Prof^a. Dr^a. Nadja Schröder
Orientadora

Porto Alegre, RS
2015

ISABELA CAVALHEIRO LAVICH

**Efeitos do Sulforafano sobre a disfunção cognitiva induzida pelo acúmulo
de ferro cerebral**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociência da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nadja Schröder

Porto Alegre, RS

2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor, apoio, incentivo e compreensão durante essa trajetória. Obrigada por entenderem os meus momentos de dúvida, insegurança e fazerem de tudo para que eu nunca perdesse o foco nos meus objetivos. Com certeza, sem esse amparo eu não estaria concluindo mais essa etapa.

A minha orientadora, Nadja Schröder, pelos seus conhecimentos, compreensão, simplicidade e acima de tudo pela sua dedicação. Obrigada por ter apostado em mim e me concedido à oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Aos colegas de laboratório por todos os ensinamentos e ajuda proporcionada durante o desenvolvimento dos experimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) pelo apoio científico e financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma auxiliaram e contribuíram com esse trabalho.

RESUMO

O ferro é essencial no cérebro neonatal para o desenvolvimento neurológico normal e para o estabelecimento da concentração de ferro no cérebro adulto, já que a absorção de ferro é máxima durante o período neonatal. Acredita-se que a sobrecarga de ferro contribua para o desenvolvimento da neurodegeneração, na exacerbação das taxas normais de apoptose, em grande parte devido à sua participação na reação de Fenton e produção de espécies reativas de oxigênio. Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que o tratamento com ferro no período neonatal piora a memória, bem como aumento em parâmetros de estresse oxidativo e em níveis de proteínas apoptóticas. Recentemente, também demonstramos que esse tratamento reduz os níveis de sinaptofisina (um marcador sináptico) em hipocampo de ratos. As mitocôndrias estão envolvidas neste processo por serem consideradas a fonte intracelular principal do ânion superóxido bem como o alvo principal de ataque de radicais livres. São organelas altamente dinâmicas que se unem (fusão) e se dividem (fissão) em resposta a estímulos ambientais, status de desenvolvimento, e as necessidades energéticas das células. As mitocôndrias são amplamente distribuídas por todos os neurônios, porém subpopulações de mitocôndrias são enriquecidas pré-sinápticamente nos terminais nervosos e pós-sinápticamente nos dendritos. Além disso, estas têm sido implicadas na patogênese de uma ampla variedade de doenças neurodegenerativas, onde sinapses são conhecidas por serem o alvo principal. O Sulforafano é um composto natural que vem sendo estudado desde a década de 1980 e considerado por possuir propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. O presente trabalho visa investigar os efeitos do tratamento com Sulforafano na idade adulta sobre os déficits de memória e sobre alterações em marcadores da função mitocondrial, DNML1 e OPA1, e marcador sináptico sinaptofisina, induzidos pelo tratamento neonatal com ferro. Os ratos Wistar machos receberam, por via oral, veículo ou ferro carbonila (30mg/kg) do 12º ao 14º dia pós-natal. Na idade adulta, para a avaliação dos efeitos do tratamento agudo com Sulforafano sobre a memória, os animais foram treinados na tarefa de reconhecimento de objeto e receberam uma única injeção, por via intraperitoneal, de veículo ou Sulforafano (0,5 ou 5 mg/kg) imediatamente após o treino. Para a avaliação dos efeitos do tratamento crônico com Sulforafano sobre a memória, os animais foram tratados com veículo ou Sulforafano (0,5 ou 5 mg/kg) durante 14 dias, em dias intercalados e treinados na tarefa de reconhecimento de objeto 24 horas após a última injeção. A análise de memória foi realizada através do índice de reconhecimento, expresso pela razão entre a quantidade de tempo gasto na exploração do objeto novo sobre o tempo total gasto explorando ambos os objetos. Os níveis proteicos de DNML1, OPA1 e sinaptofisina no hipocampo foram quantificados através de Western blotting. A quantificação das proteínas foi realizada através da medida das densidades das bandas individuais, normalizadas pela densidade de β -actina. Os dados foram analisados através das comparações entre as médias por análise de variância de uma via (ANOVA), sendo o $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. Nossos resultados mostraram que o tratamento agudo com Sulforafano (0,5 mg / kg) não melhora a memória mas na dose de 5 mg/kg foi capaz de restaurar a memória e no tratamento crônico com Sulforafano, ambas as doses recuperam a memória em ratos tratados com ferro no período neonatal. O Sulforafano na dose de 5 mg/kg também recupera os danos mitocondriais causados na DNML1 e sinaptofisina no hipocampo, corroborando com um possível papel neuroprotetor para esse composto.

Palavras-chaves: ferro, memória de reconhecimento, mitocôndria, sinapse, sulforafano, doenças neurodegenerativas.

ABSTRACT

Iron is essential in the neonatal brain for normal neurological development and for establishment of the concentration of iron in the adult brain, as iron absorption is greatest during the neonatal period. It is believed that iron overload contributes to the development of neurodegeneration, the exacerbation of the normal apoptosis rates, largely due to its participation in the Fenton reaction and production of reactive oxygen species. Previous studies in our laboratory have shown that treatment with iron in the neonatal period worsens the memory, as well as an increase in oxidative stress parameters and levels of apoptotic proteins. Recently, we have also demonstrated that this treatment reduces synaptophysin levels (a synaptic marker) in the rats hippocampus. Mitochondria are involved in this process because they are considered the main intracellular source of superoxide anion and the main target of attack by free radicals. They are highly dynamic organelles that bind (fusion) and divide (fission) in response to environmental stimuli, developmental status and energy needs of the cells. Mitochondria are widely distributed in all neurons, but mitochondria subpopulations are enriched pre-synaptically in nerve terminals and post-synaptically in dendrites. In addition, they have been implicated in the pathogenesis of a wide variety of neurodegenerative diseases where synapses are known to be the main target. Sulforaphane is a natural compound that has been studied since the 1980s and considered to possess antioxidant and anti-inflammatory properties. This study aims to investigate the effects of treatment with Sulforaphane in adulthood on memory deficits and changes in markers of mitochondrial function, DNML1 and OPA1, and synaptic marker synaptophysin induced by neonatal iron treatment. Male Wistar rats received, orally, vehicle or carbonyl iron (30mg / kg) from the 12th to the 14th postnatal day. In order to evaluate the effects of acute Sulforaphane treatment on memory, rats were trained in the object recognition task and received one single intraperitoneal injection of Vehicle or Sulforaphane (0.5 or 5 mg/kg) immediately after training. To evaluate the effects of Sulforaphane chronic treatment on memory, rats received vehicle or Sulforaphane (0.5 or 5 mg / kg) for 14 days every other day, and were trained in the object recognition task 24 h after the last injection. The memory analysis was performed using the recognition index, expressed as the ratio between the amount of time spent in exploring the new object on the total time spent exploring both objects. DNML1, OPA1, and synaptophysin levels in the hippocampus were quantified by Western blotting. The quantification of protein was performed by measuring the density of the individual bands, normalized by β -actin density. Data were analyzed by comparing the averages for analysis of variance (ANOVA), with $p < 0.05$ considered statistically significant. Our results showed that acute treatment with Sulforaphane (0.5 mg / kg) did not improve memory but at a dose of 5 mg / kg it was able to restore the memory deficits induced by iron. Chronic treatment with Sulforaphane, at both doses, also recovers the memory in rats treated with iron in the neonatal period. Sulforaphane at the dose of 5 mg/kg also recovers DNML1 mitochondrial alteration and synaptophysin in the hippocampus, confirming a possible neuroprotective role for this compound.

Keywords: iron, mitochondria, recognition memory, synapse, sulforaphane, neurodegenerative diseases.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β - Beta amilóide (sigla do inglês *Amyloid beta*)

AChE - Acetilcolinesterase (sigla do termo em inglês, *Acetylcholinesterase*)

ATP - Trifosfato de adenosina (sigla do termo em inglês, *Adenosine triphosphate*)

BBB - Barreira hemato-encefálica (sigla do termo em inglês, *Blood-Brain Barrier*)

CAT - Catalase

Cp – Ceruloplasmina

CTE - Cadeia de transporte de elétrons

DA - Doença de Alzheimer

DH - Doença de Huntington

DNA - Ácido desoxirribonucléico (sigla do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

DNAmt – DNA mitocondrial

DNM1L – Proteína como dinamina-1 (sigla do inglês *Dynamin 1-like*), também conhecida como DLP1 ou DRP1

DP - Doença de Parkinson

EEM - Espaço entre membranas

ERA - Elemento de resposta antioxidante

Fis1 – Proteína de Fissão 1 (sigla do inglês *Fission-1*)

Fpn - Ferroportina exportadora de ferro

GFAP- Proteína glial fibrilar ácida (sigla do termo em inglês, *Glial fibrillary acidic protein*)

GPx - Glutaciona peroxidase

GR - Glutaciona redutase

GSH - Glutaciona-S-hidroxilase

GST - Glutathiona-S-transferase

GTPase - Hidrolase de trifosfato de guanosina (sigla do inglês *Guanosine triphosphate hydrolase*)

HO-1 - Heme oxigenase-1

ICDH - Isocitrato desidrogenase

LTP - Potenciação de longa duração (sigla do termo em inglês, *long-term potentiation*)

MDH - Malato desidrogenase

Mfn1 - Mitofusina 1 (sigla do inglês *Mitofusin 1*)

Mfn2 - Mitofusina 2 (sigla do inglês *Mitofusin 2*)

MMI - Membrana mitocondrial interna

MME - Membrana mitocondrial externa

Nrf2 - Fator 2 relacionado ao fator nuclear E2

6-OHDA - 6-hidroxidopamina

OPA1 - Proteína atrofia óptica 1 (sigla do inglês *Optic atrophy 1*)

PAR-4 – Resposta de apoptose prostática - 4 (sigla do termo em inglês, *Prostate apoptosis response 4*)

ROS - Espécies reativas de oxigênio (sigla do termo em inglês, *reactive oxygen species*)

α -KGDH - α -ketoglutarato desidrogenase

SFN – Sulforafano

SDH - Succinato desidrogenase

Sip- Sinaptofisina

SOD - Superóxido dismutase

TH – Tirosina hidroxilase

Vs - Vesículas sinápticas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1.1 INTRODUÇÃO	2
1.1.1 Acúmulo de ferro no cérebro associado à neurodegeneração	2
1.1.1.1 Modelo de disfunção cognitiva induzida pelo tratamento com ferro....	4
1.1.2 Estrutura e dinâmica mitocondrial.....	6
1.1.2.1 Mecanismos de fissão e fusão mitocondrial	8
1.1.3 Sinapse e neurodegeneração	11
1.1.4 Sulforafano	13
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo Geral	18
1.2.2 Objetivos Específicos	18
CAPÍTULO 2	19
2.1 ARTIGO CIENTÍFICO	20
CAPÍTULO 3	56
3.1 CONCLUSÕES	57
3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	60
ANEXO – Comprovante de submissão do artigo	70

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 O acúmulo de ferro no cérebro associado à Neurodegeneração

O ferro é o metal de transição mais abundante no cérebro e está envolvido em processos metabólicos como a fosforilação oxidativa; síntese de DNA, RNA e proteínas; atua como cofator para várias enzimas (por exemplo, a monoamina oxidase e outras enzimas degradativas), no metabolismo de óxido nítrico, no transporte de oxigênio (Janetzky et al., 1997; Youdim et al., 1991; Crichton et al., 2008). E desempenha também um papel na biossíntese de colesterol e lipídios (precursores necessários na formação de membrana neuronal e mielina) e na produção de vários neurotransmissores como dopamina, norepinefrina, serotonina e GABA (Todorich & Connor, 2004; Lee et al., 2006; Fernandez et al. 2007).

O cérebro é único entre todos os órgãos do corpo por ser protegido por uma barreira vascular relativamente pouco permeável, o que limita o acesso aos nutrientes do plasma, tais como o ferro. A barreira hemato-encefálica (BBB, sigla do termo em inglês, *Blood-Brain Barrier*) é constituída essencialmente pelas células endoteliais dos capilares cerebrais, unidas por junções ocludentes ou fechadas, uma lâmina basal, pericitos e astrócitos (Abbott et al., 2009). O transporte de ferro no cérebro, a partir do plasma, envolve principalmente o ciclo celular da transferrina, utilizando a endocitose mediada por receptores de transferrina pelas células epiteliais que revestem a BBB, embora o mecanismo exato de transferência de ferro ainda seja incerto (Abbott et al., 2009; Andrews e Schmidt, 2006). Em seguida, as células endoteliais do capilar cerebral absorvem o ferro ligado à transferrina. Isto é seguido pela liberação de ferro do endossomo no fluido intersticial cerebral pela ferroportina exportadora de ferro (fpn) que medeia a liberação do ferro em conjunto com ceruloplasmina (Cp) e que deve oxidar o Fe^{2+} transportado pela fpn para Fe^{3+} antes da liberação para o meio extracelular (Wu et al., 2004; Harris et al., 1999). Uma vez no interstício do cérebro, o ferro pode se ligar a moléculas grandes tais como a transferrina ou lactoferrina. Além disso, a transferrina oriunda dos oligodendrócitos desempenha um papel vital na ligação e transporte do ferro no interstício do cérebro (Sian-Hulsmann et al., 2011).

Está amplamente aceito que o ferro é essencial no cérebro neonatal para o desenvolvimento neurológico normal e para o estabelecimento da concentração de ferro no cérebro adulto, já que a absorção do ferro no cérebro é máxima durante o período neonatal (Moos, 2002; Connor et al., 2005). Investigações mostraram que uma vez que o ferro é absorvido pelo cérebro durante este período de desenvolvimento, é retido no cérebro sem retornar para o plasma (Dwork et al., 1990).

A deficiência de ferro em uma idade precoce em humanos, durante o período inicial de desenvolvimento do cérebro, pode causar alterações no comportamento como a deficiência de aprendizagem e memória na vida adulta (Youdim et al., 1991). Já o acúmulo de ferro em regiões seletivas do cérebro (córtex, hipocampo e substância nigra), pode estar implicado na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP), devido a sua capacidade de catalisar reações de oxidação, que resultam na formação de radicais livres citotóxicos (Dexter et al., 1991; Sengstock et al., 1993; Kienzl et al., 1995).

Os radicais livres podem danificar proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, causando dano irreversível para as células e induzindo morte celular por apoptose ou necrose (Zecca et al., 2004; Riederer, 2004; Quintana et al., 2006; Quintana, 2007). O sistema nervoso é vulnerável a este dano por várias razões: o cérebro é pobre em antioxidantes endógenos, consome grande quantidade de oxigênio e contém uma grande quantidade de lipídios e ferro que estão envolvidos na formação de radicais livres (Halliwell, 1989 e Lee et al., 1999). O estresse oxidativo também pode aumentar o risco de dano celular, a partir do desequilíbrio na síntese de proteínas de armazenamento de ferro (ferritina, hemosiderina, neuromelanina) e de ferro livre. Estas disfunções de proteínas de armazenamento de ferro podem ser um evento normal no envelhecimento que explicaria a predisposição de doenças neurodegenerativas em idosos (Zecca et al., 2004; Riederer, 2004; Quintana et al., 2006; Quintana, 2007).

Verificou-se que em doenças neurológicas, tais como DA, DP, demência com corpos de Lewy, e doença de Huntington (DH), o acúmulo de ferro ocorre em regiões mais suscetíveis à degeneração neuronal. A razão do ferro de se acumular no cérebro é ainda uma questão de controvérsia. Alguns autores levantaram a hipótese de que tanto fatores genéticos como não genéticos podem estar envolvidos. Embora se saiba que a absorção de ferro pelo cérebro é mais elevada durante o desenvolvimento do sistema nervoso, há uma absorção de ferro contínua resultando no acúmulo de ferro durante o processo de envelhecimento. Assim,

é possível que o ferro da dieta possa representar um fator de risco modificável para distúrbios neurodegenerativos associada à idade (Quintana et al., 2006; Bartzokis et al., 2007).

Durante as duas últimas décadas, tem havido um crescente interesse em avaliar as concentrações de ferro no cérebro humano *in vivo*. As mudanças na compartimentalização de ferro celular e distribuição regional, bem como no estado de oxidação, podem ocorrer durante o período de armazenamento. Através do uso da técnica de imagem por ressonância magnética, muitos estudos recentes relataram que o ferro pode se depositar em várias regiões cerebrais, tais como: hipocampo, *globus pallidus*, gânglios da base, e córtices parietal e temporal. Estes estudos também confirmaram que o acúmulo de ferro está correlacionado com os déficits cognitivos que incluem: memória, aprendizagem, habilidades motoras e verbais, a partir de testes comportamentais. Assim, é possível que a disfunção cognitiva possa ser um marcador precoce não invasivo para a avaliação de potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, tais como DA. Embora sejam necessários mais estudos que determinem a utilidade de medidas de ferro periférico como marcadores de deficiências cognitivas ou estado de demência, estudos de imagem cerebral parecem apresentar resultados consistentes e promissores (Schröder et al., 2013).

1.1.1.1 Modelo de disfunção cognitiva induzida pelo tratamento com ferro

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa sobre os efeitos do acúmulo de ferro no cérebro serão abordados brevemente a seguir.

Um estudo inicial investigou déficits de memória induzidos pela administração pós-natal de diferentes doses de ferro. Os resultados deste estudo foram: a) no labirinto radial, déficits significativos de aprendizagem foram obtidos para todos os grupos que receberam ferro nas doses de 2.5, 7.5, 15.0 e 30.0 mg/kg no período pós-natal. A análise de quocientes de retenção comparando o desempenho nos dias de teste de 1 e 5 confirmou os efeitos prejudiciais de cada dose de ferro; b) déficits significantes na tarefa de esquiva inibitória foram vistos nos grupos tratados com 7.5 e 22.5 mg/kg de ferro, na verdade estes grupos mostraram bloqueio completo de retenção de memória, isto é, não houve diferença entre latências de treinamento e de teste; c) foi encontrado que a dose mais elevada administrada, 30 mg/kg, reduziu significativamente o comportamento ambulatorio de ratos durante o

período de teste de 15 minutos em campo aberto; d) análises de teor de ferro total ($\mu\text{g}/\text{kg}$) na substância nigra indicaram um aumento significativo nos grupos tratados com doses de 7.5, 15.0 e 30.0 mg/kg (Schröder et al., 2001).

Outro estudo demonstrou que um tratamento pós-natal de ferro induz déficits de memória de reconhecimento e dano oxidativo no cérebro de ratos adultos. Os ratos que receberam ferro por via oral nos dias pós-natais 5-7, 12-14, 19-21 ou 30-32 mostraram deficiências na tarefa de reconhecimento de objeto, uma tarefa não espacial e que não envolve recompensa. Mas os que receberam durante o período de absorção máxima (12-14) apresentaram perturbação comportamental mais acentuada (De Lima et al., 2005a).

Acredita-se que esta sobrecarga de ferro contribua para o desenvolvimento da neurodegeneração, na exacerbação das taxas normais de apoptose, em grande parte devido à sua participação na reação de Fenton e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla do termo em inglês, *reactive oxygen species*) que resultam em danos às células (estresse oxidativo) (Lee et al., 2006). A apoptose neuronal pode ser iniciada por meio de sinais, tais como privação de fatores de crescimento, neurotransmissão excitatória glutamatérgica excessiva e estresse oxidativo que ativam cascatas de eventos intracelulares que podem incluir a produção de Par-4 (Resposta de apoptose prostática – 4, sigla do termo em inglês, *Prostate apoptosis response 4*) e clivagem de procaspase-3 e ativação de caspase-3 (Mattson, 2000). Em outros estudos verificou-se que ratos adultos tratados com ferro no período neonatal apresentam maior dano oxidativo no hipocampo e no córtex, áreas em que se observa aumento da apoptose resultando em déficit de memória (De Lima et al., 2005a; Dal-Pizzol et al., 2001; Miwa et al., 2011). Além disso, também tiveram um aumento na imunorreatividade GFAP (Proteína glial fibrilar ácida (sigla do termo em inglês *Glial fibrillary acidic protein*) (marcador astrocitário) em áreas equivalentes do cérebro (Fernandez et al., 2011), sugerindo uma gliose astrocítica ativa que está ocupando espaços deixados pela morte neuronal (Miwa et al., 2011).

A memória de reconhecimento de objetos pode depender, pelo menos em parte, da integridade do circuito do estriado, o que é consistente com o resultado do estudo anterior de que a deficiência da memória de reconhecimento induzida pelo ferro foi associada com a atividade alterada de acetilcolinesterase (AChE) no corpo estriado. Apesar de anos de investigação, ainda não se sabe por que os níveis de ferro são anormalmente elevados em algumas regiões do cérebro em doenças neurodegenerativas. Além disso, não está claro se o

acúmulo de ferro no cérebro desempenha um papel causal na neurodegeneração ou se é uma consequência do processo da doença. O estudo sugeriu que o acúmulo de ferro no cérebro prejudica a transmissão colinérgica o que pode ter implicações para a perda de memória observada em ratos que receberam sobrecarga de ferro neonatal. Com base nisso, o modelo animal pode ser considerado uma ferramenta para a investigação de mecanismos multifatoriais que interagem para produzir o declínio da memória observada em pacientes com doenças neurodegenerativas (Perez et al., 2010).

1.1.2 Estrutura e dinâmica mitocondrial

O envelhecimento é um processo biológico caracterizado por um declínio progressivo na manutenção funcional da homeostase tecidual e uma tendência aumentada para doenças neurodegenerativas e morte celular (Hayflick, 1998). As mitocôndrias estão envolvidas neste processo por serem consideradas a fonte intracelular principal do ânion superóxido (O_2^-) e outros ROS bem como o alvo principal de ataque de radicais livres (Harman, 1972; Miquel et al., 1980). O ROS ataca constituintes da mitocôndria como proteínas, lipídios e DNAm (DNA mitocondrial) (Pak et al., 2003), e pode causar mutações com subsequente comprometimento da atividade dos complexos da cadeia respiratória (aumentado pela produção de ROS), estresse oxidativo, acúmulo de mais mutações no DNA (Larsson, 2010), alterações nas vias de sinalização celular que induz um declínio progressivo da função celular e tecidual, e conseqüentemente a um fornecimento insuficiente de energia e/ou aumento de susceptibilidade à apoptose (Seo et al., 2006; Seo et al., 2008).

Embora as mitocôndrias sejam organelas críticas para todas as células de um organismo, os neurônios também são extremamente dependentes da função mitocondrial normal. Nos neurônios, as mitocôndrias não só se distribuem no corpo celular, mas também migram para os longos processos neuronais, incluindo os terminais dendrítico e axonal. Além disso, estes processos neuronais são altamente ativos na transdução da sinalização intracelular pela liberação de neurotransmissores a partir de sinapses, requerendo grandes quantidades de energia (Chen & Chan, 2006). Além disso, as mitocôndrias têm sido implicadas na patogênese de uma ampla variedade de doenças mentais, onde sinapses são conhecidas por serem o alvo principal, incluindo a DH (Reddy & Shirendeb, 2012), a DP (Ferrer et al., 2012), a DA (Lee et

al., 2012), a doença de Batten (Luiro et al., 2006) e várias desordens psiquiátricas (Manji et al., 2012). A interdependência da atividade sináptica e distribuição mitocondrial têm sido descrita tanto nos elementos pré-sinápticos (Stowers et al., 2002) quanto pós-sinápticos de espinhas dendríticas de neurônios do hipocampo (Li et al., 2004). Várias doenças neurodegenerativas nas quais existe acúmulo de proteínas mal-dobradas, por exemplo, a DA e DP, (Trimmer et al., 2000; Dawson & Dawson, 2003) estão associadas com mal funcionamento de mitocôndrias e compartimentos sinápticos. O mau funcionamento do metabolismo mitocondrial leva à redução da produção de ATP, tamponamento dos níveis de Ca^{+2} prejudicado e geração de ROS que podem contribuir tanto para o envelhecimento quanto para as doenças neurodegenerativas (Beal, 2005).

A mitocôndria é o compartimento essencial para as células eucarióticas por fornecer ATP através do ciclo de Krebs, cadeia de transporte de elétrons (fosforilação oxidativa), síntese de moléculas-chaves (metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos e esteróides) e homeostase de cálcio (Chan, 2006; Campello e Scorrano, 2010; DiMauro & Schon, 2003).

Estruturalmente, a mitocôndria contém quatro compartimentos: a membrana mitocondrial externa (MME), a membrana mitocondrial interna (MMI), o espaço entre membranas (EEM) e a matriz. A MMI, em que é localizada a cadeia de transporte de elétrons (CTE), é altamente dobrada e se projeta para dentro da matriz por invaginações chamadas de cristas mitocondriais, que aumentam significativamente a área de superfície da MMI e assim a eficiência da CTE. As alterações estruturais da MMI, em numerosas cristas dilatadas ou inchadas foram consistentemente implicadas em processos associados à apoptose e como resposta ao estresse oxidativo, em várias doenças neurodegenerativas (Trimmer et al., 2000; Mannella, 2008). A mitocôndria é a única organela da célula, além do núcleo, que contém seu próprio DNA (DNAm) e sua própria maquinaria para sintetizar RNA e proteínas. Cada mitocôndria contém várias cópias do DNA circular na matriz, que codifica 13 proteínas que são componentes do sistema de fosforilação oxidativa (Larsson, 2010).

Para garantir a eficiência de operação e subsequente saúde da célula, a mitocôndria deve ser mantida em ótimas condições. Como parte deste processo, a mitocôndria pode ser uma organela altamente dinâmica que se une (fusão) e se divide (fissão) em resposta a estímulos ambientais, status de desenvolvimento, e o requerimento de energia das células (Chan, 2006; Campello e Scorrano, 2010). Na maioria das células, a mitocôndria forma uma rede, criando um sistema interconectado que fornece à célula metabólitos e energia essencial

(Liesa et al., 2009; Westermann, 2010). Alguns estudos elucidaram o papel da homeostase mitocondrial na saúde celular e na neurodegeneração, evidenciando que o estado bioenergético é também interligado com a dinâmica mitocondrial. A interação da bioenergética com a dinâmica mitocondrial provavelmente tem particular relevância para os neurônios, uma vez que os neurônios são os únicos na dependência bioenergética de fosforilação oxidativa mitocondrial para a produção de ATP. E os mecanismos de fissão e fusão são críticos para a formação e função adequada de sinapses, já que os defeitos na regulação das propriedades dinâmicas da mitocôndria podem estar envolvidos nas doenças neurodegenerativas (Van Laar & Berman, 2013).

1.1.2.1 Mecanismos de fissão e fusão mitocondrial

As mitocôndrias são organelas dinâmicas que se dividem ativamente e se unem para misturar metabólitos e cópias de DNAm para se adequar às mudanças constantes nas demandas de energia da célula. Um grande grupo de GTPases conservadas relacionadas à dinamina mantém o equilíbrio fundamental entre fissão e fusão mitocondrial (Labrousse et al., 1999; Smirnova et al., 2001).

A fissão mitocondrial é um evento regular durante a divisão celular, permitindo que as organelas se dividam para manter o fornecimento adequado de energia produzida pela mitocôndria (McBride et al., 2006). Também é necessária para remover as mitocôndrias velhas ou danificadas da célula através de um processo autofágico referido como mitofagia (Kim et al., 2007). A fissão mitocondrial aumentada ou não regulada pode levar a uma população heterogênea de organelas com distribuição não-uniforme de DNAm, capacidade variada de gerar ATP, geração aumentada de ROS e susceptibilidade aumentada das células sofrerem apoptose (James et al., 2003; Parone et al., 2008). A divisão mitocondrial é regulada e mantida por dois genes de GTPases: fissão mitocondrial 1 (Fis1) e proteína 1 relacionada à dinamina (Drp1 ou DNML1). A Fis1 está localizada principalmente na MME e participa na divisão. Em estados de doenças, foi encontrado que os radicais livres gerados pela mitocôndria ativam a Fis1, que leva a um aumento na fragmentação mitocondrial (Chen & Chan, 2005). A Drp1 apresenta atividade de fissão específica sobre as membranas

mitocondrial e peroxisomal através da sua translocação do citosol para os sítios de cisão (sítios Fis1) na membrana externa para iniciar o evento, conforme pode ser observado na Figura 1 (Koch et al., 2003; Pitts et al., 2004; Yoon et al., 2003). Também possui vários domínios funcionais, incluindo um domínio N-terminal GTPase, que proporciona força mecânica, um domínio médio semelhante a dinamina, um domínio de inserção B e um domínio efetor de GTPase (GED), que está localizado na região C-terminal (Bossy-Wetzel et al., 2003).

A fusão mitocondrial fornece um mecanismo pelo qual a população da organela seja mantida de forma homogênea e facilita a inter-complementação do DNAm (Chen & Chan, 2005). As mitocôndrias também se unem como parte de uma resposta ao estresse celular (Tondera et al., 2009). Este processo requer a coordenação de fusão da membrana mitocondrial interna e externa, garantindo que a compartimentação seja mantida (Meeusen et al., 2004; Meeusen et al., 2006). Três proteínas são necessárias para este evento: Mfn1 e Mfn2 (mitofusinas) para a fusão da membrana externa, e OPA1 (proteína tipo atrofia óptica 1) para a fusão da membrana interna (Meeusen et al., 2006). Ambas, Mfn1 e Mfn2, são integradas ao MME através de um domínio transmembrana bipartido, com a suas C- e N-terminais incluindo o domínio GTPase voltado para o citosol. Através da formação de homo- e/ou heterodímeros, Mfns são capazes de mediar o passo inicial de amarração da organela. Conforme ilustrado na Figura 1, a OPA1 é uma proteína da EEM com sequência alvo mitocondrial N-terminal, um domínio transmembrana, um domínio GTPase relacionado a dinamina central e domínio helicoidal C-terminal (Olichon et al., 2002), tem a capacidade de mediar a remodelação de cristas (Frezza et al., 2006). A atividade de OPA1 é regulada pelo processo proteolítico. A clivagem proteolítica libera a OPA1 a partir da membrana, produzindo isoformas funcionalmente distintas, que são necessárias para atividade de fusão. Várias proteases foram identificadas que podem mediar a clivagem da OPA1 incluindo o rombóide-7 protease de *Drosophila* e o seu homólogo de mamífero, PARL (semelhante à rombóide associado à presenilina) (McQuibban et al., 2003). As funções de fusão mitocondrial em parte, são consideradas como um mecanismo de proteção celular. O silenciamento de Mfn1 e Mfn2 resulta em fragmentação mitocondrial e aumenta a susceptibilidade mitocondrial a estímulos apoptóticos. Da mesma forma, a perda de OPA1 induz o rompimento de cristas mitocondrial, assim como a apoptose espontânea (Olichon et al., 2003; Suen et al., 2008).

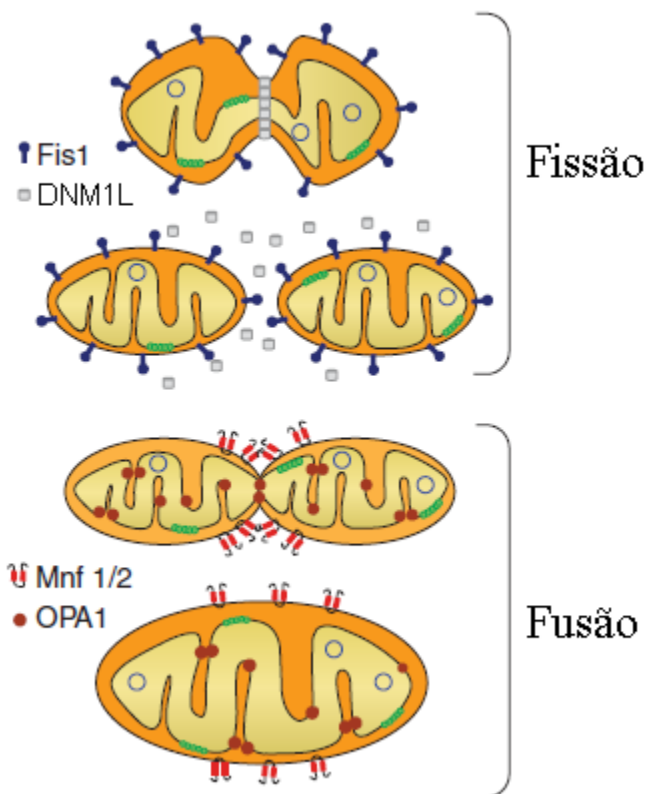


Figura 1. Fusão e fissão mitocondrial controlam o número e tamanho mitocondrial. A Fissão é mediada pelas proteínas DNM1L e Fis1. Mnf 1 e 2 estão envolvidas na fusão da MME, ao passo que a OPA1 regula a fusão da MMI (Detmer & Chan, 2007; Knott et al., 2008).

Um estudo realizado recentemente em nosso grupo de pesquisa investigou os efeitos do tratamento com ferro no período neonatal sobre a dinâmica mitocondrial através da avaliação de duas proteínas criticamente envolvidas nos processos de fissão e fusão mitocondrial, DNM1L e OPA1, respectivamente. Foi demonstrado que o tratamento de ferro reduziu significativamente os níveis de proteínas e expressão gênica da proteína de fissão mitocondrial DNM1L no hipocampo e da proteína de fusão mitocondrial OPA1 no córtex de ratos. É possível que uma redução da proteína de fissão mitocondrial DNML1 possa impedir a eliminação de mitocôndrias defeituosas (Da Silva et al., 2014).

1.1.3 Sinapse e Neurodegeneração

A sinapse é fisicamente pequena, mas uma estrutura molecular extremamente complexa. O meio intra-sináptico é constituído por componentes subcelulares e moleculares que contribuem para uma grande variedade de funções. Como resultado, uma sinapse, que apresenta apenas 2 micrômetros de diâmetro, incorpora uma ampla variedade de canais iônicos e dos receptores necessários para o bom controle da função sináptica, um grande número de vesículas sinápticas, contendo neurotransmissores, assim como numerosas organelas sub-sinápticas (incluindo o retículo endoplasmático e mitocôndrias) necessárias para manter os fornecimentos locais abundantes de energia e proteínas recém-sintetizadas (Harris & Weinberg, 2012).

As sinapses são formadas pela ligação funcional entre os axônios com terminais pós-sinápticos de seus neurônios alvo. A liberação de neurotransmissores é o principal mecanismo de transferência de informação entre os neurônios. As moléculas de neurotransmissores são armazenadas em organelas especializadas, as vesículas sinápticas (VSs) a partir do qual elas são liberadas no momento da chegada do impulso nervoso. As VSs são pequenas organelas translúcidas de cerca de 40-60 nm de diâmetro e são concentradas em grupos nas áreas subplasmalemal definidas do terminal nervoso. Essas áreas, chamada “zonas ativas”, são os locais onde ocorre a liberação dos neurotransmissores (Valtorta et al., 2004).

A Sinaptofisina (Sip) foi a primeira das proteínas de VSs a ser clonada e caracterizada (Jahn et al., 1985; Navone et al., 1986; Wiedenmann & Franke, 1985), e é conhecida como pertencente a uma família de proteínas com quatro domínios transmembranares, que inclui sinaptogirina e sinaptoporina (Sudhof et al., 1987). A Sip é a proteína mais abundante em massa, correspondendo aproximadamente 10% da proteína total da vesícula (Takamori et al., 2006) e cada VSs abriga aproximadamente 32 cópias de Sip. Devido a Sip estar localizada exclusivamente na VSs, ela é amplamente utilizada como marcador para os terminais pré-sinápticos (Kwon e Chapman, 2011). A Sip está envolvida em várias etapas da função sináptica incluindo exocitose, a formação de sinapses, biogênese e endocitose de VSs (Arthur & Stowell, 2007; Daly et al., 2000). Também promove a formação de membranas altamente curvadas como as vesículas sinápticas (Leube, 1995), interage com outras proteínas [incluindo a v-SNARE e a sinaptobrevina-2/ proteína de membrana associada a vesícula (VAMP2)] que estão envolvidas no acoplamento de vesículas e liberação de

neurotransmissores (Calakos & Scheller, 1994; Washbourne et al., 1995; Edelman et al., 1995).

As alterações persistentes na eficácia sináptica dos neurônios dentro do hipocampo resultam na potenciação de longa duração (LTP, sigla do termo em inglês *long-term potentiation*), e este proporciona uma base para a armazenagem de memória no cérebro (Bliss & Collingridge, 1993). Uma das marcas características de envelhecimento é o déficit da função cognitiva, o qual, especialmente no hipocampo, está correlacionado com as alterações na morfologia sináptica incluindo a perda de proteínas estruturais pré ou pós-sinápticas (tais como a sinaptofisina) e a perda progressiva da densidade sináptica (Burke & Barnes, 2006; Driscoll et al., 2006; Rapp & Gallagher, 1996; Rosenzweig & Barnes, 2003).

A função sináptica comprometida é considerada a base dos primeiros sintomas de várias doenças neurodegenerativas. No entanto, as marcações neuropatológicas de diagnósticos clássicos destas perturbações, a deposição de placas amilóides e/ou agregados de proteínas mal formadas e perda neuronal no contexto de síndromes clínicas inteiramente complexas, representam uma situação em fase terminal, essencialmente refratárias aos tratamentos curativos. A fase crítica para a intervenção e para a compreensão dos mecanismos subjacentes da doença neurodegenerativa é recente nestes processos. A perda de espinhas dendríticas e sinapses geralmente precede a de corpos celulares neuronais, que é irreversível, mas o potencial intrínseco de sinapses pode ser perdido e substituído, tornando assim este estágio da doença um alvo muito atraente para o tratamento. Assim, as sinapses são continuamente formadas, eliminadas e remodeladas durante a vida adulta. Estas mudanças estruturais em conectividade sináptica provavelmente são a base de muitas formas de plasticidade, incluindo a aprendizagem e memória ou cognição, cuja perda é essencial para o desencadeamento de muitas doenças neurodegenerativas (Mallucci, 2009).

Um estudo demonstrou que todas as amostras de cérebro de pacientes com DA tiveram perda de proteínas nas vesículas pré- e pós-sinápticas em comparação com os indivíduos controle na mesma faixa etária. Além disso, verificou-se que a perda de proteínas sinápticas foi mais grave nas amostras de córtex frontal do que no córtex parietal em pacientes com DA, o que sugere que o lobo frontal pode ser crítico para a função sináptica em DA. Usando técnicas de imunohistoquímica, também determinou que as proteínas pré-sinápticas (sinaptofisina e rab 3A) e a proteína pós-sináptica (sinaptopodina) foram as mais reguladas (em relação ao padrão de distribuição de todas as proteínas sinápticas, tanto no córtex frontal

e parietal). Então o estudo sugeriu que as proteínas pós-sinápticas e proteínas pré-sinápticas são importantes para a função sináptica e pode estar relacionada a alterações cognitivas na DA (Reddy et al., 2005).

Um estudo anterior realizado em nosso laboratório investigou a função mitocondrial comprometida que pode levar a uma redução na viabilidade sináptica, já que esta organela se encontra principalmente nos terminais sinápticos. Neste estudo também foi demonstrado que a sinaptofisina estava reduzida no hipocampo de ratos tratados com ferro, sugerindo que estes ratos podem ter anomalias sinápticas resultando em déficit de memória e de aprendizagem (Da Silva et al., 2014).

1.1.4 Sulforafano

O Sulforafano (SFN) é um isotiocianato que é sintetizado a partir do precursor glucosinolado, a glucorafanina (glucosinolato 4-metilsulfinilbutil) (Figura 2), encontrado em vegetais crucíferos do gênero *Brassica* como couve-flor, brócolis, couve, repolho, couve de bruxelas, mostarda e agrião, bem como em outros gêneros como do rabanete (Fahey et al., 2001; Van Poppel et al., 1999). O SFN [1-isotiocianato-(4R) - (metilsulfinil) butano] é um composto natural amplamente estudado desde a década de 1980 e considerado por possuir propriedades quimioterapêuticas incluindo antiproliferativa e propriedades anti-angiogênicas. No entanto, além das suas propriedades anticancerígenas, outros estudos também têm focado fortemente sobre os efeitos do SFN contra outras patologias importantes incluindo hiperglicemia e danos no cérebro, rim, fígado, coração, músculo e entre outros (Guerrero-Beltrán et al., 2012).

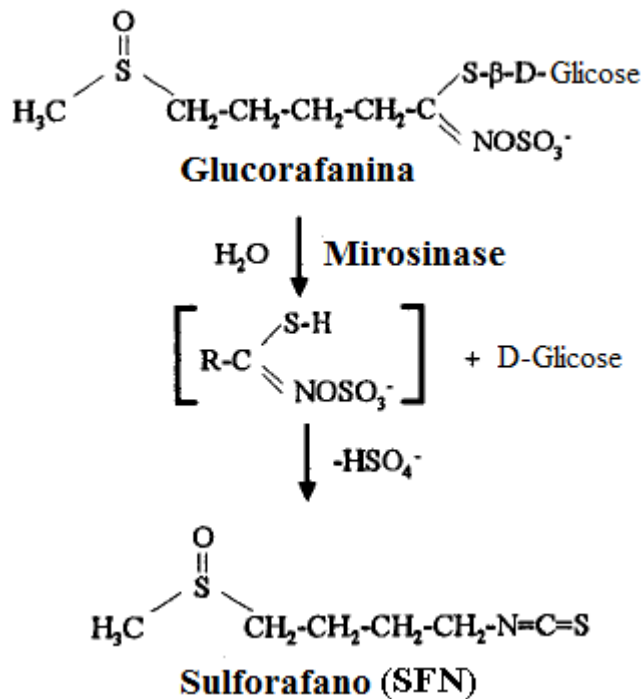


Figura 2. Conversão enzimática de Glucorafanina para Sulforafano (Bogaards et al., 1990; Rose et al., 2000).

Os seres vivos, sob condições normais, são protegidos contra dano oxidativo oriundo de ROS a partir de sistemas de defesa celular, incluindo sistemas enzimáticos e não enzimáticos (Winzer et al., 2000). O tratamento com SFN pode aumentar significativamente as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e as enzimas do ciclo redox da glutatona-S-hidroxilase (GSH) em frações mitocondriais pulmonares e hepáticas de ratos. Além disso, também pode ser notado o aumento dos níveis de GSH (Priya et al., 2011), principal molécula antioxidante sintetizada no citoplasma e transportada para a mitocôndria (Arnaudeau et al., 2001) onde contribui com cerca de 10 e 20% do GSH intracelular (consequentemente a diminuição de ROS) (Fernandez-Checa et al., 1998). Estes efeitos podem ter um papel potencial na desintoxicação e eliminação de possíveis carcinógenos do organismo, levando a eficácia do SFN (Priya et al., 2011).

A cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria é onde ocorre a geração de ATP e a regulação de enzimas chaves do ciclo de Krebs no nível bioquímico, alimentando a saída de NADH e FADH₂ para gerar ATP, e utilizar os níveis de ATP para ativar/inibir o ciclo de Krebs. O SFN parece interagir nesses dois sistemas, aumentando a produção e a atividade de: succinato desidrogenase (SDH), α -ketoglutarato desidrogenase (α -KGDH), aconitase,

isocitrato desidrogenase (ICDH), malato desidrogenase (MDH) [enzimas do ciclo de Krebs], complexo I (NADH-CoQ oxidoreductase), complexo II (Succinato-CoQ oxidoreductase), complexo III (CoQ-citocromo c oxidoreductase) e complexo IV (Citocromo c oxidase) [complexos da cadeia respiratória] (Priya et al., 2011).

O SFN também é conhecido por ser um potente ativador de fator 2 relacionado ao fator nuclear E2 (Nrf2) [fator de transcrição que age se ligando no elemento de resposta antioxidante/ERA] e exibe efeitos antioxidantes e anti-carcinogênico através do aumento da regulação de genes codificados pelo ERA [tais genes incluem: UDP-glucuronosil-transferase e glutathione-S-transferase (GST); NADPH: quinona redutase e heme oxigenase-1 (HO-1)] (Morrone et al., 2013), níveis de proteínas e atividade de enzimas antioxidantes (Guerrero-Beltrán et al., 2012). Também diminui a produção de ROS intracelular, aumentar a viabilidade celular e diminuir a fragmentação do DNA depois de 48 horas de tratamento em uma cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (James et al., 2011). Vários estudos têm relatado que SFN tem efeito protetor sobre os neurônios do sistema nervoso central, contra a neurotoxicidade causada por vários insultos oxidativos. No entanto, existem poucos estudos sobre o mecanismo detalhado de efeitos neuroprotetores do SFN no sistema nervoso central (Morrone et al., 2013).

Um estudo realizado por Morrone demonstrou que SFN neutraliza a perda de células da substância nigra após a injeção de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no estriado de ratos e investigou possíveis mecanismos moleculares pelos quais SFN protege os neurônios da neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA. O principal achado foi que o SFN amenizou alterações comportamentais, tais como coordenação motora e comportamento rotacional. Observou-se uma diminuição significativa do número de rotações contralaterais em ratos lesionados tratados com SFN em comparação com ratos lesionados tratados com veículo, o que pode ser intimamente ligado ao aumento significativo de células positivas TH (tirosina hidroxilase) que foi encontrado na substância nigra do mesmo grupo de animais. Ainda, observou-se que o tempo médio no teste de coordenação motora *RotaRod* era inferior em ratos lesionados com 6-OHDA em comparação com o grupo tratado com SFN, sugerindo a eficácia do SFN de melhorar a coordenação e equilíbrio dos animais lesionados. Outro resultado foi que a injeção de 6-OHDA causou uma superprodução de radicais livres que conseqüentemente levou à diminuição dos níveis de glutathione-S-hidroxilase (GSH) e as atividades da GST e glutathione redutase (GR) na substância nigra. A administração de SF no grupo *sham* não alterou significativamente o nível basal de GSH e as suas enzimas

relacionadas, mas alterou após o estresse oxidativo induzido por 6-OHDA, onde o SF restaurou o nível de GSH nigral e as atividades da GST e GR sugerindo que o SFN aumenta o potencial antioxidante no cérebro e ajuda-o na defesa contra o dano oxidativo induzido pela 6-OHDA. Tem sido bem estabelecido que os mecanismos moleculares que envolvem a atividade 'antioxidante' indireta de SFN são dependentes da ativação do Nrf2, que regula a expressão de uma série de genes que constituem a chamada resposta de fase II. Um número crescente de estudos sugeriu que a ativação de Nrf2 é um novo caminho neuroprotetor que confere resistência a uma variedade de doenças neurodegenerativas relacionadas ao estresse oxidativo (Morrone et al., 2013).

Outro estudo demonstrou que uma única injeção de SFN, após a lesão cerebral, foi suficiente para estimular a expressão de genes dependentes de Nrf2 e reduzir a permeabilidade da barreira hematoencefálica associada à lesão cerebral traumática e ao edema cerebral (Zhao et al., 2005 e Zhao et al., 2007). Então, a partir disso, dados demonstraram que, além de proteção vascular, o tratamento com sulforafano pós-lesão preserva a função neurológica em animais lesionados, evidenciado pela melhora da aprendizagem e da memória, e por um melhor desempenho numa tarefa de memória de trabalho. Os autores concluíram, através de seus resultados sobre o comportamento fisiopatológico e as melhorias oferecidas pela administração SFN pós-lesão, que o SFN pode ser uma opção terapêutica promissora para o tratamento de pacientes com lesões cerebrais (Dash et al., 2009).

Outro estudo examinou os efeitos neuroprotetores potenciais do SFN em um modelo de isquemia-hipóxica em ratos no período neonatal. Os resultados deste estudo foram que o SFN aumentou significativamente a expressão de Nrf2 e HO-1, que foi acompanhada pelo volume reduzido de infarte e a diminuição do número de células apoptóticas. Também foi evidenciada, uma redução da atividade da caspase-3, supressão da ativação de microglia, diminuição dos níveis de peroxidação lipídica e 8OH-DG (marcador de oxidação de DNA) nos animais pré-tratados com SFN. Estes resultados indicam que o SFN pode ser um potencial candidato para o tratamento de lesão cerebral neonatal devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Ping et al., 2010).

Embora exista um modelo experimental de tratamento neonatal com ferro bem estabelecido, o qual induz prejuízo cognitivo, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão completamente esclarecidos, mas podem estar associados ao estresse oxidativo, prejuízos energéticos e alterações na mitocôndria. Tendo em vista a ação do SFN como

antioxidante e protetor mitocondrial, o presente trabalho visa investigar os efeitos do SF sobre o prejuízo cognitivo induzido pelo ferro e seus possíveis efeitos protetores sobre a mitocôndria a partir da análise de proteínas de função mitocondrial, DNML1 e OPA1, e sobre a viabilidade sináptica através da análise da proteína sinaptofisina.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do tratamento com Sulforafano na idade adulta sobre os déficits de memória e sobre alterações em marcadores da função mitocondrial, DNML1 e OPA1, e marcador sináptico sinaptofisina, induzidos pelo tratamento neonatal com ferro.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento agudo com Sulforafano sobre o déficit de memória induzido pelo tratamento neonatal com ferro, através da tarefa de memória-reconhecimento de objeto.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com Sulforafano sobre o déficit de memória induzido pelo tratamento neonatal com ferro, através da tarefa de memória-reconhecimento de objeto.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com Sulforafano sobre os níveis protéicos do marcador mitocondrial DNML1 no hipocampo de ratos controles e ratos tratados com ferro no período neonatal através do Western Blot.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com Sulforafano sobre os níveis protéicos do marcador mitocondrial OPA1 no hipocampo de ratos controles e ratos tratados com ferro no período neonatal através do Western Blot.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com Sulforafano sobre os níveis protéicos do marcador sináptico Sinaptofisina no hipocampo de ratos controles e ratos tratados com ferro no período neonatal através do Western Blot.

CAPÍTULO 2

2.1 ARTIGO CIENTÍFICO

SUBMETIDO AO PERIÓDICO NEUROSCIENCE

Neuroscience

Original research

Sulforaphane rescues memory dysfunction and synaptic and mitochondrial alterations induced by brain iron accumulation

Isabela Cavalheiro Lavich^a, Betânia Souza de Freitas^a, Lucio Falavigna^a, Vinicius A. Dargél^a, Luiza M. Köbe^a, Cristiano Aguzzoli^a, Bruno Piffero^a, Pedro Zanetti Florian^a, Maria Noêmia Martins de Lima^{a,b}, Nadja Schröder^{*,a,b}.

a - Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

b - National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

*** Corresponding author:** Dr. Nadja Schröder, PhD, Department of Physiological Sciences, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12D, Sala 301, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil; nadja.schroder@puccrs.br; Phone number: +55 51 3353-4743

Abstract

Iron overload contributes to the development of neurodegeneration and the exacerbation of normal apoptosis rates, largely due to its participation in the Fenton reaction and production of reactive oxygen species (ROS). Mitochondria constitute the major intracellular source of ROS and the main target of attack by free radicals. They are dynamic organelles that bind (fusion) and divide (fission) in response to environmental stimuli, developmental status, and energy needs of the cells. Sulforaphane (SFN) is a natural compound that possesses antioxidant and anti-inflammatory properties. This study aims to investigate the effects of SFN on memory deficits and changes in markers of mitochondrial function, DNML1 and OPA1, and the synaptic marker, synaptophysin, induced by neonatal iron treatment. Male rats received, orally, vehicle or carbonyl iron (30mg/kg) from the 12th to the 14th postnatal day. In adulthood, they were treated, intraperitoneally, with saline or SFN (0.5 or 5 mg/kg) for 14 days every other day. Memory deficits were assessed using the object recognition task. DNML1, OPA1, and synaptophysin levels in the hippocampus were quantified by Western blotting. Results showed that SFN was able to reverse iron-induced decreases in mitochondrial fission protein, DNML1, as well as synaptophysin levels in the hippocampus, leading to a recovery of recognition memory impairment induced by iron. These findings suggest that SFN may be further investigated as potential agent for the treatment of cognitive deficits associated to neurodegenerative disorders.

Keywords: Sulforaphane, iron, mitochondria, recognition memory, synapse, neurodegenerative disorders.

1. Introduction

Iron is the most abundant transition metal in the brain and is involved in metabolic processes such as oxidative phosphorylation and synthesis of DNA, RNA and proteins; acting as a cofactor for many enzymes (Crichton et al., 2008; Youdim et al., 1991). In neurons, iron plays a role in the production of various neurotransmitters including dopamine, norepinephrine, serotonin and GABA (Lee et al., 2006; Todorich and Connor, 2004). Iron entry in the neonatal brain is essential for normal neurodevelopment and for the establishment of the final iron concentration in the adult brain, as brain iron absorption is maximal during the neonatal period (Connor et al., 1995; Moos, 2002).

Evidence suggest that iron overload contributes to the development of neurodegeneration, through the exacerbation of apoptosis rates, mainly due to its participation in the Fenton reaction and production of reactive oxygen species (ROS) that result in cell damage (oxidative stress) (Lee et al., 2006). In neurological diseases such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies, and Huntington's disease (HD), iron accumulation occurs in regions most susceptible to neuronal degeneration (cortex, hippocampus, and substance nigra). The mechanisms underlying iron accumulation in the brain are still a matter of controversy. Some authors have hypothesized that both genetic factors and non-genetic may be involved. Although it is known that the absorption of iron in the brain is higher during development of the nervous system there is a continuous absorption of iron resulting in the accumulation of iron during the aging process. Thus it is possible that dietary iron can represent a modifiable risk factor for neurodegenerative disorders associated with age (Bartzokis et al., 2007; Quintana et al., 2006). In previous studies we have shown that adult rats treated with iron in the neonatal period (12th to 14th day of life) have greater oxidative damage in the hippocampus and cortical areas where there is increased apoptosis, resulting in loss of memory (Dal-Pizzol et al., 2001; da Silva et al., 2014; de Lima et al.,

2005; Miwa et al., 2011). Over the years, we have been using this model of cognitive impairment to investigate the pharmacological properties of compounds in the search of novel potential treatments for memory dysfunction associated with neurodegenerative disorders.

Mitochondria are the main intracellular source of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) or ROS as well as the main target of attack by free radicals (Harman, 1972; Miquel et al., 1980). Mitochondria are dynamic organelles that actively divide (fission) and join each other (fusion) to combine metabolites and copies of mtDNA to suit the ever-changing energy demands of the cell (Labrousse et al., 1999; Smirnova et al., 2001). Mitochondrial fission is a regular event during cell division, allowing the cells to divide maintaining an adequate supply of energy produced by the organelle (McBride et al., 2006). The balance between mitochondrial fission and fusion is controlled by large dynamin-related GTPases, which have antagonistic effects (Liu et al., 2012). Fission is regulated and maintained by at least two proteins: the cytosolic dynamin-related protein 1 (Drp1 or DNML1) and the transmembrane fission 1 (Fis1) protein. Mitochondrial fusion provides a mechanism by which the population of the organelle is kept evenly and facilitates inter-complementation of mtDNA (Chen and Chan, 2005). One of three proteins is required for this event: OPA1 (protein optic atrophy type 1) for fusing the mitochondrial inner membrane (Meeusen et al., 2006). These two mechanisms are critical to proper functioning of synapses, as the defects in the regulation of the dynamic properties of the mitochondria may be involved in neurodegenerative diseases (Van Laar and Berman, 2013). In neurons, mitochondria are distributed not only in the cell body, but also migrate to the long processes, including synaptic terminals, which require large amounts of energy (Chen and Chan, 2006).

The synapses are formed by the functional link between the axons with post-synaptic terminals of their target neurons. Cognitive deficit have been correlated with changes in synaptic morphology, including loss of structural proteins pre or post-synaptic (such as

synaptophysin) and the progressive loss of synaptic density especially in the hippocampus (Burke and Barnes, 2006; Driscoll et al., 2006; Rapp and Gallagher, 1996; Rosenzweig and Barnes, 2003). Synaptophysin is located exclusively in synaptic vesicles, where it is involved in several steps of synaptic function including exocytosis, synapse formation, biogenesis and endocytosis (Arthur and Stowell, 2007; Daly et al., 2000).

Sulforaphane [SFN, 1-isothiocyanate-(4R)-(methylsulfinyl)butane] is an isothiocyanate found in cruciferous vegetables of the genus *Brassica* such as cauliflower, broccoli, cabbage, Brussels sprouts, mustard, and cress (Fahey et al., 2001; Van Poppel et al., 1999) that displays antioxidant, anti-inflammatory, and anticarcinogenic properties (Guerrero-Beltrán et al., 2012; Ping et al., 2010). Studies have shown that SFN protects against renal, hepatic, and cardiac damage (for a review see Guerrero-Beltrán et al., 2012). Recently, it has been demonstrated that SFN may be a promising neuroprotective compound. In a model of neonatal ischemia-hypoxia in rats, SFN was able to reduce the infarct volume and to decrease the number of apoptotic cells, as well as to reduce caspase-3 activity and to suppress oxidative stress (Ping et al., 2010). In the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) experimental model of PD in rats, SFN was shown to protect against nigral damage, alleviating behavioral changes such as motor coordination and rotational behavior, increasing antioxidant defenses, and protecting against oxidative damage and apoptosis (Morrone et al., 2013). Dash and coworkers (2009) have demonstrated that SFN was able to ameliorate cognitive deficits induced by traumatic brain injury in rats.

Although evidence suggests that SF exhibits neuroprotective properties having mitochondria as its main target, its functional properties and mechanisms of action are not completely understood. Here, we used the iron-induced model of memory impairment, which is associated with oxidative stress and increases in apoptotic markers, to investigate the effects of SFN on memory deficits as well as mitochondrial and synaptic alterations, by

measuring hippocampal levels of mitochondrial fission and fusion proteins, DNMI1 and OPA1, and the synaptic marker, synaptophysin.

2. *Materials and methods*

2.1 Animals

Pregnant Wistar rats were obtained from the Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE), Pontifical Catholic University, Porto Alegre, RS, Brazil. After birth each litter was adjusted within 48 h to eight rat pups, and to contain offspring of both genders in about equal proportions. Each pup was kept together with its mother in a plastic cage with sawdust bedding in a room temperature of $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and a 12/12 h light/dark cycle. At the age of 3 weeks, pups were weaned and the males were selected and raised maintained in groups of three to five in individually ventilated cages with sawdust bedding. For postnatal treatments, animals were given standardized pellet food and tap water *ad libitum*.

All behavioral experiments were performed at light phase between 09:00 h and 16:30 h. All experimental procedures were performed in accordance to the Principles of laboratory animal care and with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23 revised 1996) and approved by the Institutional Ethics Committee of the Pontifical Catholic University (CEUA 13/00366). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

2.2 Treatments

2.2.1 Iron neonatal treatment

The neonatal iron treatment has been described in detail elsewhere (Silva et al, 2012; Fagherazzi et al, 2012). Briefly, 12-day-old rat pups received orally a single daily dose (10 ml/Kg solution volume) of vehicle (5% sorbitol in water) (control group) or 30 mg/Kg of body weight of Fe²⁺ (iron carbonyl, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) via a metallic gastric tube, over 3 days (postnatal days 12-14).

2.2.2 Sulforaphane

For the investigation of the effects of SFN (LKT Laboratories, St. Paul, MN, USA) on iron-induced memory impairments, adult (2 month-old) rats treated neonatally with vehicle or iron (as described above) received an acute intraperitoneal injection of saline solution (NaCl 0.9 g%, vehicle) or SFN (at the doses of 0.5 and 5 mg/kg) immediately after the training session of the object recognition task. For experiments investigating the chronic effects of SFN on iron-induced memory impairments, adult (2 months-old) rats treated neonatally with vehicle or iron received an intraperitoneal injection of vehicle or SFN every other day (at the doses of 0.5 and 5 mg/kg) for 2 weeks (total of 7 injections). Drug solutions were freshly prepared immediately prior to administration (Dash et al., 2009; Morroni et al., 2013; Ping et al., 2010; Priya et al., 2011).

2.3 Behavioral procedures

2.3.1 Object recognition task

The object recognition task was performed as previously described (Silva et al, 2012; Fagherazzi et al, 2012). Briefly, the novel object recognition task took place in an open field apparatus (45 x 40 x 60 cm) with sawdust covering its floor. On the first day, rats underwent a habituation session during which they were placed in the empty open field for 5 min. On the following day, rats were given one 5-min training trial in which they were exposed to two identical objects (A1 and A2). The objects were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. On the long-term memory (LTM) testing trial (24 h after the training session), rats were allowed to explore the open field for 5 min in the presence of two objects: the familiar object A and a novel object B. These were placed in the same locations as in the training session. In long-term retention test trial, the novel object was placed in 50% trials in the right side and 50% trials in the left side of the open field. All objects were made of plastic Duplo Lego Toys and had a height of about 10 cm. Objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. Between trials the objects were washed with 10% ethanol solution. Object exploration was measured by an experimenter blind to group treatment assignments; using two stopwatches to record the time spent exploring the objects during the experimental sessions. Exploration was defined as follows: sniffing or touching the object with the nose. Sitting on the object was not considered as exploration. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $T_N/(T_F+T_N)$ [T_F = time spent exploring the familiar object (A); T_N = time spent exploring the novel object (B)].

2.3.2 Open-field behavior

Behavior during habituation to the open field prior to object recognition training was evaluated after chronic SFN administration, as previously described (Garcia et al, 2013). The open field was a 40 X 45 X 60 cm arena surrounded by 50 cm high walls, made of plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. Animals were placed in the rear left corner and left to explore the field freely for 5 min. Latency to start locomotion, line crossings, rearings and the number of fecal pellets produced were counted. The number of crossings and rearings were used, respectively, as measures of locomotor activity and exploratory behavior, whereas the latency to start locomotion and the number of fecal pellets were used as measures of anxiety.

2.4 Sample preparation for molecular analysis

Rats were euthanized by decapitation at 24h after completion of behavioral testing. The hippocampi from groups of rats treated neonatally with iron or vehicle and chronically with saline or SFN at the highest dose (5 mg/kg) in the adulthood were quickly dissected and placed in a cooled protease inhibitor solution (Complete Mini, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) for Western Blotting assays. Samples were stored at -80°C for subsequent analyses.

2.5 Western blotting analysis

Proteins were extracted in homogenization buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, protease inhibitor cocktail, Triton X-100 0.5%, and SDS

0.1%. After 30 min in ice, samples were centrifuged at 13,500 rpm for 10 min (da Silva et al, 2014). The supernatant was collected and the protein content was determined using Bradford assay (Bradford, 1976). Aliquots were stored at -20°C.

Twenty-five µg of protein was separated on a 10% SDS polyacrylamide gel and transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% non fat dry milk in TBS containing 0.05% Tween 20 and were incubated overnight with one of the following antibodies: anti-β-actin (Abcam, Cambridge, UK) at 1:2500; anti-DNM1L (Abcam, Cambridge, UK) at 1:500; anti-OPA1 (Abcam, Cambridge, UK) at 1:2000; anti-synaptophysin (Abcam, Cambridge, UK) at 1:1500. Goat anti-mouse IgG and goat polyclonal anti-rabbit IgG (both from Abcam, Cambridge, UK) secondary antibodies were used and detected using ECL Western Blotting Substrate Kit (Abcam, Cambridge, UK). Pre-stained molecular weight protein markers (SuperSignal Molecular Weight Protein Ladder, Thermo Scientific, Rockford, USA) were used to determine the detected bands' molecular weight and confirm target specificity of antibodies. Analysis of band intensities were performed in a Carestream Gel Logic 2200 PRO Imaging System and the associated Image Analysis Software. Total blotting protein levels of samples were normalized according to each sample's β-actin protein levels (da Silva et al, 2014).

2. 6 Statistical analysis

Behavioral data were analyzed as previously described (Silva et al, 2012; de Lima et al, 2008). Data for recognition indexes are expressed as median ± interquartile ranges. Comparisons among experimental groups were performed using a Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney *U*-tests, two-tailed when necessary. Total time exploring both objects in the training session and data from the experiments evaluating open field

behavior, as well as Western blotting data are expressed as mean \pm S.E.M and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by appropriate *Post-hoc* tests when necessary. In all comparisons, *p* values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1 Behavioral analyses

Figure 1 shows the results of object recognition in iron-treated rats that received a single intraperitoneal injection of SFN (0.5 or 5 mg/kg) immediately after training session. Kruskal-Wallis analysis of variance has revealed a significant difference in recognition indexes among the groups in the testing session ($H_{(5)} = 27.74$, $p < 0.0001$). No significant differences were observed when recognition indexes of the training session ($H_{(5)} = 8.11$, $p = 0.15$) or total time exploring both objects during the training session ($F_{(5, 60)} = 1.48$, $p = 0.21$, Table 1) were compared. As previously reported, iron given in the neonatal period impairs recognition memory, since iron-treated rats that received saline in adulthood presented a lower recognition index in the testing session when compared to controls (sorbitol-vehicle) ($p < 0.0001$). Likewise, iron-treated rats that received an acute injection of SFN at the lowest dose also presented memory impairment when compared to controls ($p < 0.05$). However, recognition index of iron-treated rats that received SFN at the highest dose was not statistically different from the control group ($p = 0.43$), indicating that SFN at the highest dose was able to reverse iron-induced memory impairment. SFN by itself when given acutely to control animals did not alter memory retention, since recognition indexes of the groups that

received vehicle in the neonatal period and SFN in the adulthood were not statistically different from that of the group treated with vehicle in the neonatal period and saline in the adulthood ($p = 0.44$ for comparison with SFN 0.5 mg/kg and $p = 0.08$ for comparison with SFN 5 mg/kg).

Data from the object recognition testing following chronic SFN administration to iron-treated rats are shown in Figure 2. Comparison of recognition indexes using Kruskal-Wallis analysis of variance has revealed a significant difference in the testing session ($H_{(5)} = 20.44$, $p = 0.001$), but not in the training session ($H_{(5)} = 3.65$, $p = 0.60$). No significant differences were found among the groups when comparing when the total time exploring both objects during the training session ($F_{(5, 63)} = 0.54$, $p = 0.75$, Table 1). Further comparison of recognition memory retention has indicated that iron-treated rats presented lower recognition index than controls ($p < 0.0001$), confirming previous results. SFN chronic administration at both doses was able to rescue memory deficits induced by iron neonatal treatment, as recognition indexes of groups that received iron in the neonatal period and SFN were not statistically different from the control group ($p = 0.19$ for comparison with SFN 0.5 mg/kg and $p = 0.46$ for comparison with SFN 5 mg/kg). Moreover, the group treated with the highest dose of SFN showed a significant difference when compared to the iron-treated group that received vehicle in the adulthood ($p = 0.001$), displaying a higher recognition index. Recognition indexes of control groups treated chronically with SFN were not statistically different from the control group ($p = 0.78$ for comparison with SFN 0.5 mg/kg and $p = 0.84$ for comparison with SFN 5 mg/kg), indicating that SFN has not affected recognition memory retention in control animals.

In order to control for general sensory-motor alterations possibly induced by iron neonatal treatment or chronic SNF, which could interfere with memory acquisition, open field behavior was evaluated. ANOVA comparisons have revealed no significant differences among the groups in the latency to start locomotion ($F_{(5, 62)} = 0.43$, $p = 0.83$), fecal bolus

produced ($F_{(5, 62)} = 0.13$, $p = 0.99$), number of crossings ($F_{(5, 62)} = 0.18$, $p = 0.97$), and number of rearings ($F_{(5, 62)} = 0.99$, $p = 0.43$).

3.2 Western blotting analyses

3.2.1 Mitochondrial proteins

Figures 3 and 4 show the analyses of mitochondrial fission and fusion proteins, DNM1L and OPA, respectively.

Statistical comparison of band intensities of DNM1L, using ANOVA, has indicated a significant difference among the groups ($F_{(3, 9)} = 23.50$, $p < 0.0001$, Figure 3). *Post hoc* analyses showed that iron neonatal treatment significantly reduced DNM1L in the hippocampus of adult rats, when compared to the control group ($p = 0.015$). Chronic SFN was able to rescue iron-induced reduction in DNM1L levels, since the group that received iron in the neonatal period and SFN in the adulthood showed significantly higher DNM1L levels than the control group ($p = 0.017$) and than the iron-treated group that received saline in the adulthood ($p < 0.0001$).

On the contrary, statistical comparison of OPA levels has revealed no significant differences among the groups ($F_{(3, 15)} = 0.028$, $p = 0.99$, Figure 4), suggesting that iron or SFN do not alter the expression of this protein in the hippocampus of rats.

3.2.2 Synaptophysin

Results of the synaptic marker synaptophysin are presented in Figure 5. ANOVA comparison of synaptophysin levels among the groups has shown a statistically significant difference among the groups ($F_{(3, 10)} = 4.15$, $p < 0.05$). Further *post hoc* comparisons have indicated that iron neonatal treatment significantly decreased synaptophysin levels when compared to the control group ($p = 0.038$). Chronic SFN administered to iron-treated rats was able to recover synaptophysin levels, since hippocampal synaptophysin levels of the group that received iron in the neonatal period and SFN was not statistically different from the control group ($p = 0.99$).

4. Discussion

Iron accumulation in the brain has been consistently related to neurodegenerative disorders (Ward et al., 2014). Evidence indicates that excessive iron contributes to cell death and neurodegenerative processes through oxidative damage observed in *post mortem* brains from patients suffering from neurodegenerative diseases (Salvador et al., 2010). More recently, iron accumulation has been related to cognitive decline observed in healthy aged subjects (Bartzokis et al., 2011; Penke et al., 2012; Rodrigue et al., 2013), as well as in patients from neurodegenerative diseases (Brass et al., 2006; Ding et al., 2009; Zhu et al., 2009). These studies have shown that higher iron content in brain regions correlate with poorer performance in cognitive tasks (for a review see Schröder et al., 2013). In the animal model used in the present study, we administer iron for only 3 days during the neonatal period, in order to produce iron increases in the brain (Schröder et al., 2001). We have

demonstrated that this treatment impairs memory in a variety of memory tasks (da Silva et al., 2012; de Lima et al., 2005; Schröder et al., 2001) and increases oxidative stress (de Lima et al., 2005) and apoptotic markers (da Silva et al., 2014; Miwa et al., 2011). Consistently with previous results, here we show that iron treatment induces persistent recognition memory deficits.

In spite of a great effort from the scientific community in searching novel molecular targets and therapies for cognitive decline, no effective drug has been launched for treating memory impairments. Although SFN has been considered as a neuroprotective compound, only a few studies have investigated its potential in ameliorating cognitive impairments related to neurodegeneration. Recently, the effects of SFN in recovering scopolamine-induced cognitive deficits were examined. Chronic treatment with SFN, with higher doses than those used in the present study, attenuated scopolamine-induced spatial memory impairment in mice (Lee et al., 2014). SFN, injected 1 and 24 h post-traumatic brain injury, was also able to ameliorate spatial memory deficits in rats (Dash et al., 2009). The present results show that SFN rescues recognition memory-deficits in an experimental model of cognitive impairment relevant to aging and neurodegenerative disorders. When administered immediately after training, only the highest dose of SFN was able to recover memory deficits, while in the chronic treatment both doses presented equivalent memory-ameliorating effect. The mechanisms underlying SFN's effects on memory recovering are still unknown; the acute effect observed here suggests that SFN may interfere with memory consolidation process itself. However, no memory improving effects were found when control animals were treated with SFN. Thus, a plausible explanation for these effects may be related to SFN's neuroprotective properties. For instance, spatial memory recovery was accompanied by a reduction in oxidative damage in the hippocampus and cortex of injured animals (Dash et al., 2009), and by an improvement in cholinergic system activity in hippocampus and frontal

cortex of scopolamine-injected mice (Lee et al., 2014). An alternative explanation may be related to the Histone Deacetylase (HDAC)-inhibition effect of SFN (Pham and Lee, 2012). HDAC inhibition has been reported to improve memory in a variety of experimental models (Levenson and Sweatt, 2005).

Here we show that neonatal iron treatment leads to a reduction in the mitochondrial fission protein, DNMI1L, suggesting that iron accumulation harms mitochondrial dynamics. An impaired balance between mitochondrial fission and fusion may be related to neurodegenerative disorders (Burté et al., 2015). DNMI1L was shown to be reduced in the hippocampus of AD patients (Wang et al., 2009). Chronic SFN increased DNMI1L in iron-treated animals, possibly helping to restore mitochondrial dynamics. Studies have suggested that SFN may act as a mitochondrial protector, due to its indirect antioxidant effects. SFN is an activator of Nuclear Factor E2 – Related Factor 2/anti-oxidant response element (Nrf2/ARE) pathway, which is responsible for the induction of ROS scavengers and antioxidant enzymatic defenses (Grabacka et al., 2014). *In vitro* experiments have demonstrated that SFN increases the expression of glutathione, heme oxygenase 1, and glutathione reductase (Cook et al., 2011; Mizuno et al., 2011; Vauzour et al., 2010). In addition, administration of SFN was shown to confer resistance to brain mitochondria against redox-regulated mitochondrial inner membrane permeability transition pore opening, which could contribute to neuroprotection observed with SFN (Greco and Fiskum, 2010). We have previously shown that iron treatment significantly increases oxidative stress in the brain (de Lima et al., 2005). Thus, it is possible that SFN, by inducing Nrf2/ARE pathway, protects against iron-induced oxidative stress, thereby conferring mitochondrial protection.

Nrf2 knockout mice displaying depressive-like behavior, presented lower levels of synaptophysin in the frontal cortex. Subsequently, it was demonstrated that SFN prevented LPS-induced depressive behavior in mice, through induction of Nrf2 (Martín-de-Saavedra et

al., 2013). Two recent studies have related increases of Nrf2 to synaptophysin expression and recovery of cognitive deficits (Gault et al., 2015; Prisila Dulcy et al., 2012). Thus, we can hypothesize that by activating Nrf2 pathway, SFN may also recover iron-induced reduction in synaptophysin levels. To our knowledge, this is the first study employing SFN *in vivo* treatment in a cognitive impairment model investigating synaptophysin expression. Synaptophysin is the main integral transmembrane protein of synaptic vesicles, and is considered a functional synaptic marker (Shojo and Kibayashi, 2006). Synaptic loss may be related to iron-induced cognitive deficits observed in our model, as we have previously reported that iron induces long-lasting decreases in synaptophysin levels in the hippocampus of rats (da Silva et al., 2014).

Conclusion

In conclusion, here we show that SFN was able to reverse iron-induced decreases in mitochondrial fission protein, DNMI1L, as well as synaptophysin levels in the hippocampus, a key structure involved in memory consolidation, leading to a recovery of recognition memory impairment induced by iron. These findings suggest that SFN may be considered as potential agent for the treatment of cognitive deficits associated to neurodegenerative disorders.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 308144/2012-0 to N.S.); the National Institute for

Translational Medicine (INCT-TM). P.Z.F. is recipient of a PROBIC/FAPERGS fellowship and V.A.D. is recipient of a PIBIC/CNPq fellowship. The funding sources had no role in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the paper for publication.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest to disclose. All authors have read and approved the final version of the article.

References

Arthur, C.P., Stowell, M.H., 2007. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL-domain channel protein. *Structure*, 15, 707–714.

Bartzokis, G., Lu, P.H., Tingus, K., Peters, D.G., Amar, C.P., Tishler, T.A., Finn, J.P., Villablanca, P., Altshuler, L.L., Mintz, J., Neely, E., Connor, J.R., 2011. Gender and iron genes may modify associations between brain iron and memory in healthy aging. *Neuropsychopharmacology*. 36, 1375-1384.

Bartzokis, G., Tishler, T.A., Lu, P.H., Villablanca, P., Altshuler, L.L., Carter, M., Huang, D., Edwards, N., Mintz, J., 2007. Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. *Neurobiol. Aging*. 28, 414-423.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Brass, S.D., Benedict, R.H., Weinstock-Guttman, B., Munschauer, F., Bakshi, R., 2006. Cognitive impairment is associated with subcortical magnetic resonance imaging grey matter T2 hypointensity in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 12, 437-444.

Burke, S. N., Barnes, C.A., 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 30–40.

Burté, F., Carelli, V., Chinnery, P.F., Yu-Wai-Man, P., 2015. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 11-24.

Chen, H., Chan, D.C., 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* 14, R283–R289.

Chen, H., Chan, D.C., 2006. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 453-459.

Connor, J. R., Pavlick, G., Karli, D., Menzies, S. L., Palmer, C., 1995. A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* 355, 111–123.

Cook, A.L., Vitale, A.M., Ravishankar, S., Matigian, N., Sutherland, G.T., Shan, J., Sutharsan, R., Perry, C., Silburn, P.A., Mellick, G.D., Whitelaw, M.L., Wells, C.A., Mackay-Sim, A., Wood, S.A., 2011. NRF2 activation restores disease related metabolic deficiencies in olfactory neurosphere-derived cells from patients with sporadic Parkinson's disease. *PLoS One.* 6(7), e21907.

Crichton, R.R., Dexter, D.T., Ward, R.J., 2008. Metal based neurodegenerative diseases – from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Coord. Chem. Rev.* 252, 1189–1199.

Da Silva, V.K., de Freitas, B.S., da Silva, A.D., Nery, L.R., Falavigna, L., Ferreira, R.D., Bogo, M.R., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Schröder, N., 2014. Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNM1L expression

levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection. *Mol. Neurobiol.* 49, 222-233.

Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Frota Jr, M.L.C., Andrades, M.E., Caregnato, F.F., Vianna, M.M.R., Schröder, N., Quevedo, J., Izquierdo, I., Archer, T., Moreira, J.C.F., 2001. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 130, 109–114.

Daly, C., Sugimori, M., Moreira, J.E., Ziff, E.B., Llinas, R., 2000. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6120–6125.

Dash, P.K., Zhao, J., Orsi, S.A., Zhang, M., Moore, A.N., 2009. Sulforaphane improves cognitive function administered following traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.* 460, 103–107.

De Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D.C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Schröder, N., 2005. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2521-2528.

De Lima, M.N., Presti-Torres, J., Garcia, V.A., Guimarães, M.R., Scalco, F.S., Roesler, R., Schröder, N., 2008. Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology.* 55, 788-792.

Ding, B., Chen, K.M., Ling, H.W., Sun, F., Li, X., Wan, T., Chai, W.M., Zhang, H., Zhan, Y., Guan, Y.J., 2009. Correlation of iron in the hippocampus with MMSE in patients with Alzheimer's disease. *J. Magn. Reson. Imaging*. 29, 793-798.

Driscoll, I., Howard, S.R., Stone, J.C., Monfils, M.H., Tomanek, B., Brooks, W.M., Sutherland, R.J., 2006. The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*. 139, 1173–1185.

Fagherazzi, E.V., Garcia, V.A., Maurmann, N., Bervanger, T., Halmenschlager, L.H., Busato, S.B., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Schröder, N., 2012. Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. *Psychopharmacology (Berl)*. 219, 1133-1140.

Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P., 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5–51.

Garcia, V.A., de Freitas, B.S., Busato, S.B., D'avila Portal, B.C., Piazza, F.C., Schröder, N., 2013. Differential effects of modafinil on memory in naïve and memory-impaired rats. *Neuropharmacology*. 75, 304-11.

Gault, V.A., Lennox, R., Flatt, P.R., 2015. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, improves recognition memory, oxidative stress, hippocampal neurogenesis and up-regulates key genes involved in cognitive decline. *Diabetes Obes. Metab. Epub ahead of print* doi: 10.1111/dom.12432.

Greco, T., Fiskum, G., 2010. Brain mitochondria from rats treated with sulforaphane are resistant to redox-regulated permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* 42, 491-497.

Grabacka, M.M., Gawin, M., Pierzchalska, M., 2014. Phytochemical modulators of mitochondria: the search for chemopreventive agents and supportive therapeutics. *Pharmaceuticals (Basel)*. 7, 913-942.

Guerrero-Beltrán, C.E., Olivera, M.C., Chaverria, J.P., Chirino, Y.I., 2012. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 503– 508.

Harman, D., 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Ger. Soc.* 20, 145–147.

Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A., van der Bliek, A.M., 1999. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell.* 4, 815–826.

Lee, D.W., Andersen, J.K., Kaur, D., 2006. Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. *Mol. Interv.* 6, 89–97.

Lee, S., Kim, J., Seo, S.G., Choi, B.R., Han, J.S., Lee, K.W., Kim, J., 2014. Sulforaphane alleviates scopolamine-induced memory impairment in mice. *Pharmacol. Res.* 85, 23-32.

Levenson, J.M., Sweatt, J.D., 2005. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 108-118.

Liu, W., Tian, F., Kurata, T., Morimoto, N., Abe, K., 2012. Dynamic changes of mitochondrial fusion and fission proteins after transient cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci. Res.* 90, 1183-1189.

Martín-de-Saavedra, M.D., Budni, J., Cunha, M.P., Gómez-Rangel, V., Lorrio, S., Del Barrio, L., Lastres-Becker, I., Parada, E., Tordera, R.M., Rodrigues, A.L., Cuadrado, A., López, M.G., 2013. Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. *Psychoneuroendocrinology.* 38, 2010-2022.

McBride, H.M., Neuspiel, M., Wasiak, S., 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 16, R551–560.

Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., Nunnari, J., 2006. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell.* 127, 383–395.

Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., Johnson Jr., J.E., 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* 15, 575–591.

Miwa, C.P., De Lima, M.N., Scalco, F., Vedana, G., Mattos, R., Fernandez, L.L., Hilbig, A., Schröder, N., Vianna, M.R., 2011. Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. *Neurotox. Res.*, 19, 527-535.

Mizuno, K., Kume, T., Muto, C., Takada-Takatori, Y., Izumi, Y., Sugimoto, H., Akaike, A., 2011. Glutathione biosynthesis via activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-

antioxidant-response element (ARE) pathway is essential for neuroprotective effects of sulforaphane and 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. *J. Pharmacol. Sci.* 115, 320-328.

Moos, T., 2002. Brain iron homeostasis. *Dan. Med. Bull.* 49, 279-301.

Morrone, F., Tarozzi, A., Sita, G., Bolondi, C., Zolezzi Moraga J.M., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., 2013. Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 36, 63-71.

Pham, T.X., Lee, J., 2012. Dietary regulation of histone acetylases and deacetylases for the prevention of metabolic diseases. *Nutrients.* 4, 1868-1886.

Penke, L., Valdés Hernández, M.C., Maniega, S.M., Gow, A.J., Murray, C., Starr, J.M., Bastin, M.E., Deary, I.J., Wardlaw, J.M., 2012. Brain iron deposits are associated with general cognitive ability and cognitive aging. *Neurobiol. Aging.* 33, 510-517.

Ping, Z., Liu, W., Kang, Z., Cai, J., Wang, Q., Cheng, N., Wang, S., Wang, S., Zhang, J.H., Sun, X., 2010. Sulforaphane protects brains against hypoxic–ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Brain Res.* 1343, 178–185.

Prisila Dulcy, C., Singh, H.K., Preethi, J., Rajan, K.E., 2012. Standardized extract of *Bacopa monniera* (BESEB CDRI-08) attenuates contextual associative learning deficits in the aging rat's brain induced by D-galactose. *J. Neurosci. Res.* 90, 2053-2064.

Priya, D.K.D., Gayathri, R., Gunassekaran, G.R., Sakthisekaran D., 2011. Protective role of sulforaphane against oxidative stress mediated mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in female Swiss albino mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 24: 110-117.

Quintana, C., Bellefqih, S., Laval, J.Y., Guerquin-Kern, J.L., Wu, T.D., Avila, J., Ferrer, I., Arranz, R., Patiño, C., 2006. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *J. Struct. Biol.* 153, 42-54.

Rapp, P. R., Gallagher, M., 1996. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9926–9930.

Rodrigue, K.M., Daugherty, A.M., Haacke, E.M., Raz, N., 2013. The role of hippocampal iron concentration and hippocampal volume in age-related differences in memory. *Cereb. Cortex.* 23, 1533-1541.

Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A., 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurobiol.* 69, 143–179.

Salvador, G.A., Uranga, R.M., Giusto, N.M., 2010. Iron and mechanisms of neurotoxicity. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011, 720658.

Schröder, N., Figueiredo, L.S., de Lima, M.N., 2013. Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies. *J Alzheimers Dis.* 34, 797-812.

Schröder, N., Fredriksson, A., Vianna, M.R., Roesler, R., Izquierdo, I., Archer, T., 2001. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav. Brain Res.* 124, 77-85.

Shojo, H., Kibayashi, K., 2006. Changes in localization of synaptophysin following fluid percussion injury in the rat brain. *Brain Res.* 1078, 198-211.

Silva, P.F., Garcia, V.A., Dornelles, A. da S., Silva, V.K., Maurmann, N., Portal, B.C., Ferreira, R.D., Piazza, F.C., Roesler, R., Schröder, N. 2012. Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. *Neuroscience.* 200, 42-49.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., van der Bliek, A.M., 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* 12, 2245–2256.

Todorich, B.M., Connor J.R., 2004. Redox metals in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1012, 171–178.

Van Laar, V.S., Berman, S.B., 2013. The interplay of neuronal mitochondrial dynamics and bioenergetics: Implications for Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 51, 43–55.

Van Poppel, G., Verhoeven, D.T., Verhagen, H., Goldbohm, R.A., 1999. Brassica vegetables and cancer prevention epidemiology and mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 472, 159–168.

Vauzour, D., Buonfiglio, M., Corona, G., Chirafisi, J., Vafeiadou, K., Angeloni, C., Hrelia, S., Hrelia, P., Spencer, J.P., 2010. Sulforaphane protects cortical neurons against 5-S-cysteinyl-dopamine-induced toxicity through the activation of ERK1/2, Nrf-2 and the upregulation of detoxification enzymes. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 532-542.

Wang, X., Su, B., Lee, H.G., Li, X., Perry, G., Smith, M.A., Zhu, X., 2009. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 29, 9090-9103.

Ward, R.J., Zucca, F.A., Duyn, J.H., Crichton, R.R., Zecca, L. 2014. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 13, 1045-1060.

Youdim, M.B., Ben-Shachar, D., Riederer, P., 1991. Iron in brain function and dysfunction with emphasis on Parkinson's disease. *Eur. Neurol.* 31, 34-40.

Zhu, W.Z., Zhong, W.D., Wang, W., Zhan, C.J., Wang, C.Y., Qi, J.P., Wang, J.Z., Lei, T., 2009. Quantitative MR phase-corrected imaging to investigate increased brain iron deposition of patients with Alzheimer disease. *Radiology.* 253, 497-504.

Figure captions

Figure 1 – Effect of acute Sulphoraphane on recognition memory in iron-treated rats.

Object Recognition Memory in rats treated neonatally with vehicle or iron and given with saline or sulforaphane (SFN) acutely in adulthood (3 months of age). Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney *U*-tests, two-tailed when necessary. Data expressed as median \pm interquartile ranges. N = 7 - 13 per group. Differences between Veh-Saline vs. other groups are indicated as * $p < 0.05$; differences between Veh-Saline vs. other groups are indicated as ** $p < 0.001$; differences between Iron-Saline vs. other groups are indicated as ++ $p < 0.01$.

Figure 2 – Effect of chronic Sulphoraphane on recognition memory in iron-treated rats.

Object Recognition Memory in rats treated neonatally with vehicle or iron and given with saline or sulforaphane (SFN) chronically in adulthood (3 months of age). Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney *U*-tests, two-tailed when necessary. Data expressed as median \pm interquartile ranges. N = 10 - 14 per group. Differences between Vehicle-Saline vs. Iron-Saline are indicated as ** $p < 0.01$; differences between Iron-Saline vs. Iron-SFN 5mg/kg are indicated as ++ $p < 0.01$.

Figure 3 – Effect of Sulphoraphane on Dynamin-1-like protein (DNM1L) fission protein expression in iron-treated rats.

Dynamin-1-like protein (DNM1L) fission protein expression in the hippocampus of rats treated neonatally with vehicle or iron and treated with saline or sulforaphane (SFN) chronically in adulthood (3 months of age). 25 μ g of protein, normalized to β -actin, were

separated on SDS-PAGE and probed with specific antibodies. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post-hoc. Data expressed as mean \pm S.E.M. N = 3 - 4 per group. Differences between Vehicle-Saline *vs.* other groups are indicated as * $p < 0.05$; differences between Iron-SFN *vs.* Iron-Saline are indicated as ## $p < 0.0001$.

Figure 4 – Effect of Sulphoraphane on Optic atrophy 1 (OPA1) fusion protein expression in iron-treated rats.

Optic atrophy 1 (OPA1) fusion protein expression in the hippocampus of 3-month-old rats treated neonatally with vehicle or iron and treated with saline or sulforaphane (SFN) chronically. 25 μ g of protein, normalized to β -actin, were separated on SDS-PAGE and probed with specific antibodies. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post-hoc. Data expressed as mean \pm S.E.M. N = 4 - 5 per group. No significant differences among the groups were observed.

Figure 5 – Effect of Sulphoraphane on synaptophysin expression in iron-treated rats.

Synaptophysin protein expression in the hippocampus of 3-month-old rats treated neonatally with vehicle or iron and treated with saline or sulforaphane (SFN) chronically. 25 μ g of protein, normalized to β -actin, were separated on SDS-PAGE and probed with specific antibodies. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post-hoc. Data expressed as mean \pm S.E.M. N = 3 - 4 per group. Differences between Vehicle-Saline *vs.* Iron-Saline are indicated as * $p < 0.05$.

Figure 1

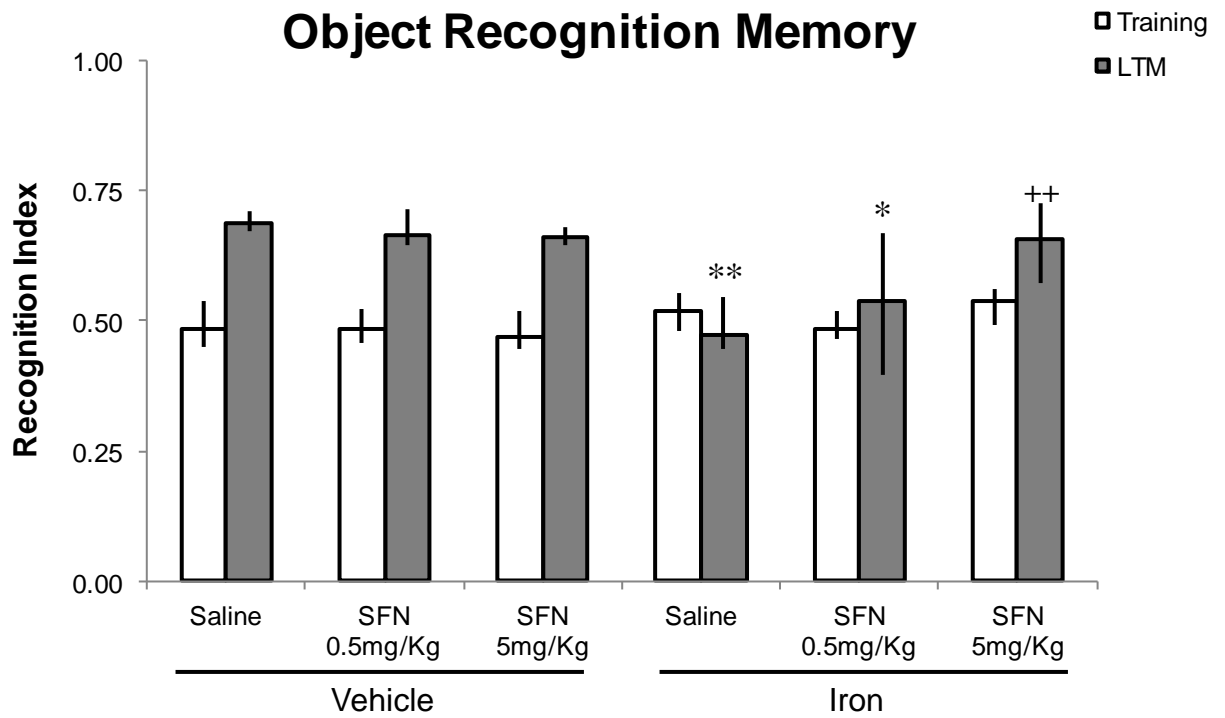


Figure 2

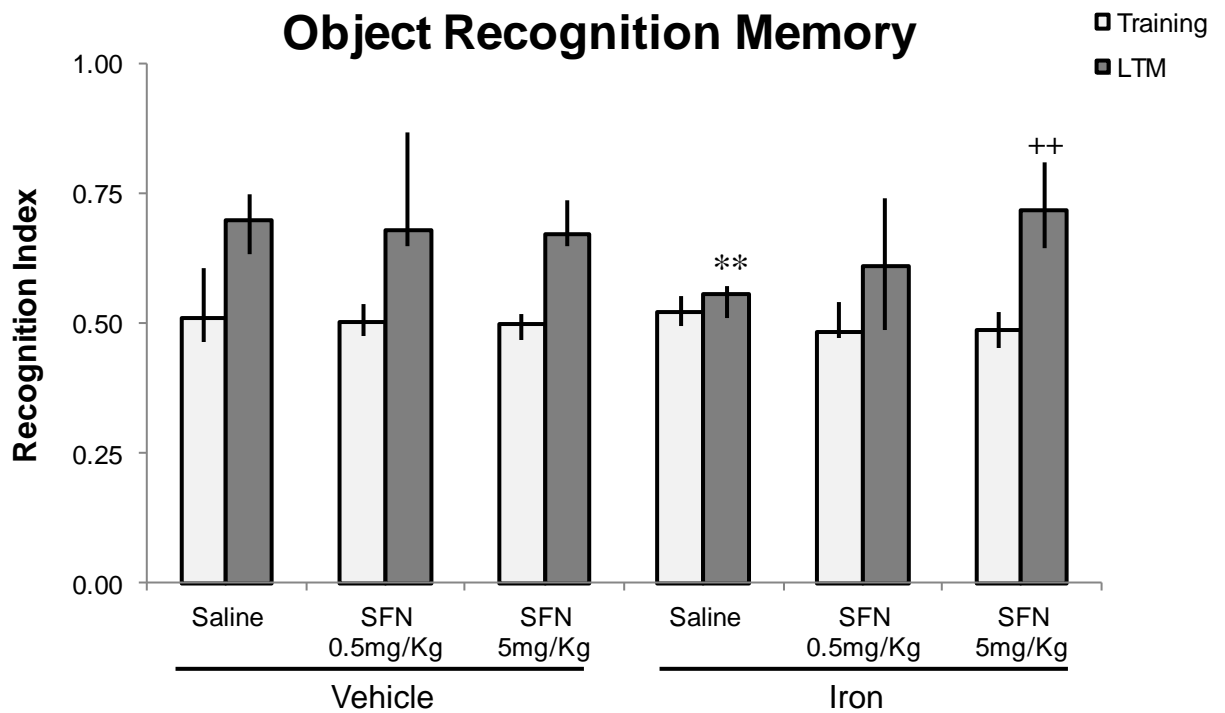


Figure 3

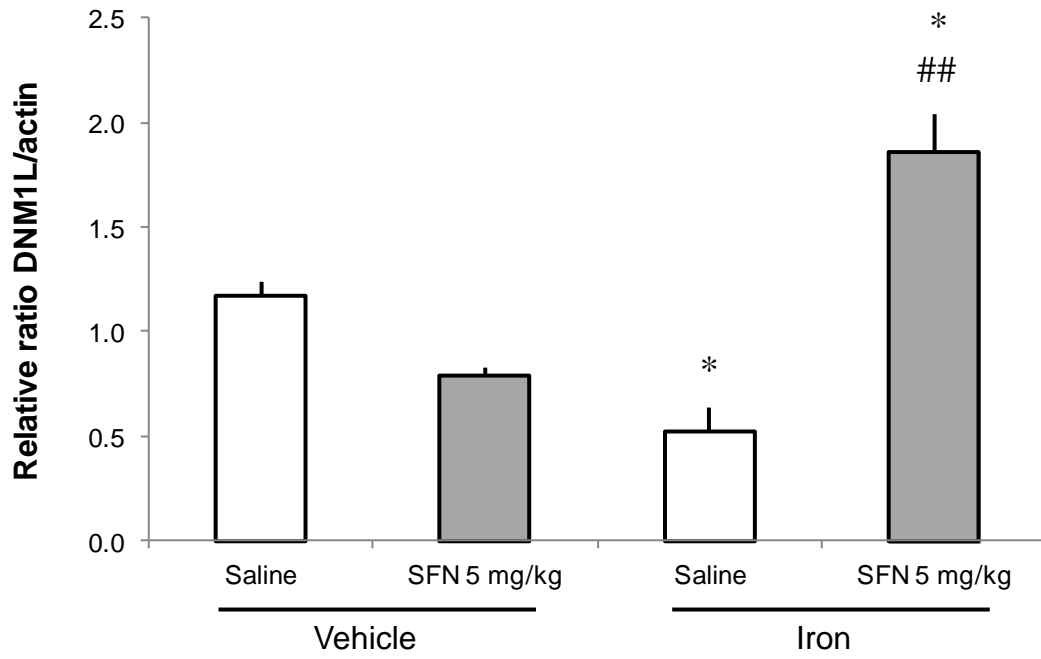


Figure 4

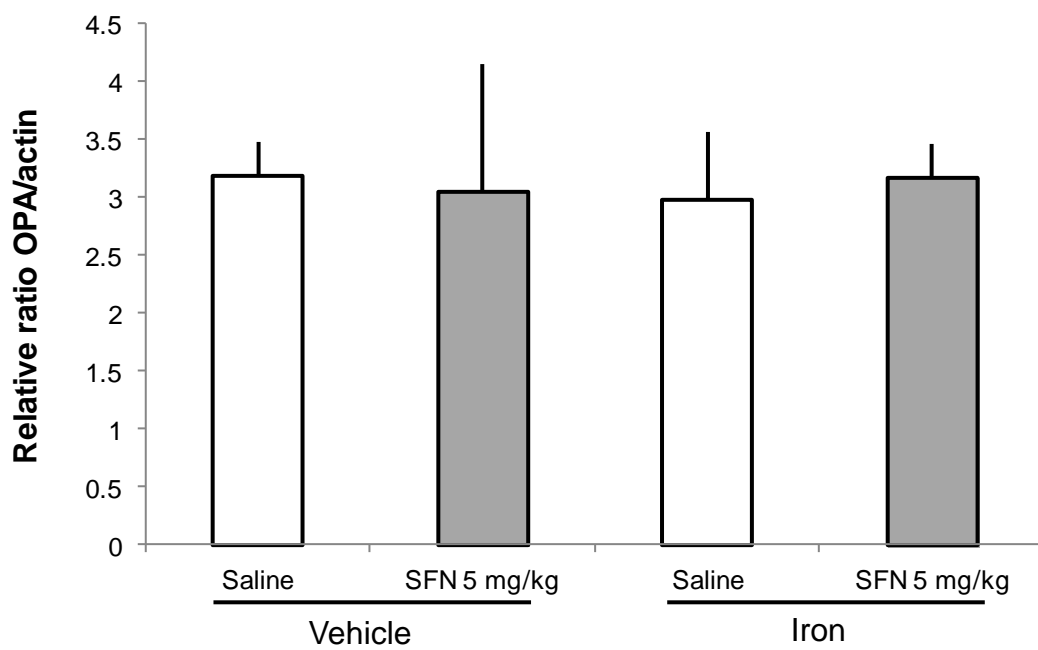


Figure 5

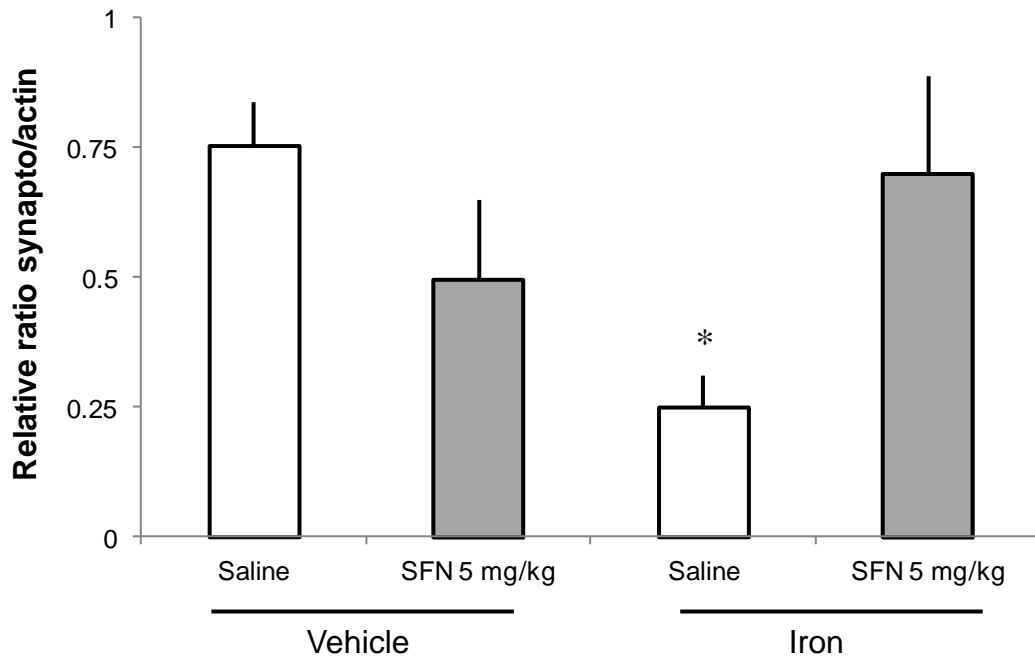


Table 1 – Total time (in seconds) exploring both objects in the training trial of object recognition task in iron-treated rats submitted to acute or chronic SFN administration.

GROUP	Acute SFN treatment	Chronic SFN treatment
Vehicle – Saline	59.7 ± 4.8 N = 10	35.2 ± 4.9 N = 10
Vehicle – SFN 0.5	66.1 ± 4.6 N = 11	41.6 ± 5.1 N = 11
Vehicle – SFN 5	60.5 ± 1.8 N = 7	39.7 ± 5.5 N = 12
Iron – Saline	68.9 ± 3.1 N = 13	44.4 ± 4.0 N = 10
Iron – SFN 0.5	65.4 ± 2.7 N = 13	40.5 ± 4.5 N = 14
Iron – SFN 5	58.1 ± 3.1 N = 12	35.4 ± 4.0 N = 12

Table 2 – Open-field behavior in iron-treated rats submitted to chronic SFN administration.

GROUP	<i>N</i>	Latency to start locomotion (s) (Mean ± S.E.M.)	Number of Crossings (Mean ± S.E.M.)	Number of Rearings (Mean ± S.E.M.)	Number of Fecal Pellets (Mean ± S.E.M.)
Vehicle – Saline	10	3.1 ± 0.9	72.6 ± 12.5	18.6 ± 2.8	2.5 ± 0.8
Vehicle – SFN 0.5	11	3.2 ± 0.5	72.5 ± 6.9	14.8 ± 1.7	2.4 ± 0.7
Vehicle – SFN 5	12	3.6 ± 0.4	75.4 ± 4.3	33.4 ± 1.3	2.2 ± 0.7
Iron – Saline	10	3.4 ± 0.6	71.9 ± 7.8	16.6 ± 2.5	2.3 ± 0.5
Iron – SFN 0.5	14	2.9 ± 0.4	78.8 ± 7.8	17.0 ± 2.4	1.8 ± 0.6
Iron – SFN 5	12	2.6 ± 0.3	69.33 ± 8.0	21.9 ± 5.3	2.2 ± 1.0

Open-field behavior was analyzed during the habituation session for the object recognition task in iron-treated rats after chronic SFN administration. Data are expressed as mean ± S.E.M.

CAPÍTULO 3

3.1 CONCLUSÕES

- O tratamento com ferro no período neonatal ocasiona um prejuízo na memória em comparação com os ratos tratados com sorbitol no período neonatal.
- O tratamento agudo com SFN (0,5 mg / kg) não melhora a memória em ratos tratados com ferro no período neonatal.
- O tratamento agudo com SFN (5 mg/ kg) restaura a memória em ratos tratados com ferro no período neonatal em comparação com o grupo veículo.
- O tratamento crônico com SFN (0, 5 e 5 mg/ kg) restaura a memória em ratos tratados com ferro no período neonatal em comparação com o grupo veículo.
- O tratamento neonatal com ferro ocasiona uma redução da expressão proteica de DNMI1L no hipocampo.
- O tratamento neonatal com ferro não altera a expressão proteica de OPA1 no hipocampo.
- O tratamento neonatal com ferro ocasiona uma redução da expressão proteica de Sinaptofisina no hipocampo.
- O tratamento crônico com SFN restaura a expressão proteica de DNMI1L no hipocampo após a redução ocasionada pela administração de ferro no período neonatal.
- O tratamento crônico com SFN não altera a expressão proteica de OPA1 no hipocampo em ratos tratados com sorbitol ou com ferro no período neonatal.
- O tratamento crônico com SFN restaura a expressão proteica de Sinaptofisina no hipocampo após redução ocasionada pela administração de ferro no período neonatal.

3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ferro é o metal de transição mais abundante no cérebro e está envolvido em vários processos metabólicos. No entanto, a deficiência desse metal, durante o período inicial de desenvolvimento do cérebro, pode causar alterações no comportamento como a deficiência de aprendizagem e memória na vida adulta (Youdim et al., 1991). Já o acúmulo de ferro em regiões seletivas do cérebro, pode estar implicado na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, tais como a DA e DP, devido a sua capacidade de catalisar reações de oxidação, que resultam na formação de radicais livres citotóxicos (Dexter et al., 1991; Sengstock et al., 1993; Kienzl et al., 1995).

A mitocôndria é o compartimento essencial na produção ATP para todas as células do organismo, sendo que nos neurônios, as mitocôndrias se distribuem no corpo celular e nos terminais dendrítico e axonal no qual estes são altamente ativos na transdução da sinalização intracelular pela liberação de neurotransmissores a partir de sinapses, requerendo grandes quantidades de energia (Chen & Chan, 2006). Em virtude disso, quaisquer disfunções no metabolismo das mitocôndrias podem culminar em conseqüências nas células nervosas (Wang *et al.*, 2009a). A redução de fornecimento de energia nas sinapses pode alterar a viabilidade e funcionalidade dos circuitos neuronais (Harris *et al.*, 2012) e em razão da sinalização sináptica diminuída, essas células podem ativar processos de morte celular, como a apoptose (Shimada *et al.*, 2003).

Estudos prévios já demonstraram que o ferro foi capaz de provocar uma alteração na dinâmica mitocondrial, reduzindo os níveis de DNM1L e OPA1 no hipocampo e córtex, respectivamente, sugerindo que o estresse oxidativo ocasionado pelo ferro resulta numa disfunção mitocondrial no qual desencadeia uma modificação na funcionalidade dessa organela (a responsável pela produção de ATP) que podem levar a um declínio da viabilidade sináptica e conseqüente morte neuronal, em regiões sabidamente mais afetadas em doenças neurodegenerativas, e déficits de memória (de Lima *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2014).

À necessidade de compreensão da etiologia das doenças neurodegenerativas, soma-se a busca por estratégias de prevenção e tratamento dessas doenças. Nesse trabalho, objetivamos investigar o potencial terapêutico do SFN na mitocôndria cerebral, uma vez que, apesar de já terem sido descritas propriedades antioxidantes (Ping et al., 2010) o mecanismo

detalhado de efeitos neuroprotetores do SFN no sistema nervoso central ainda não foram muito bem estudados.

Alguns estudos já haviam demonstrado que o SFN possui um papel potencial como agente protetor de danos oxidativos provocados por substâncias lesivas no cérebro. Como por exemplo, a proteção frente à neurotoxicidade induzida pelo 6-OHDA em que esta substância causou uma superprodução de radicais livres, uma diminuição dos níveis de GSH e as atividades da GST e GR na substância nigra. Já o SFN reverteu essa situação por restaurar o nível de GSH nigral e as atividades da GST e GR, sugerindo que o SFN aumenta o potencial antioxidante no cérebro (Morrone et al., 2013). E também o SFN foi capaz de preservar as funções neurológicas (melhora da aprendizagem e da memória) quando administrado em uma única injeção após a lesão cerebral, ou seja, foi suficiente para estimular a expressão de genes dependentes de Nrf2/ERA e reduzir a permeabilidade da barreira hematoencefálica associado à lesão cerebral traumática e ao edema cerebral (Zhao et al., 2005 e Zhao et al., 2007).

Nossas recentes análises mostraram que o SFN foi capaz de restaurar a memória em ratos tratados com ferro e recuperar os danos mitocondriais causados na DNMI1L e sinaptofisina no hipocampo, sugerindo assim que a disfunção mitocondrial ocasionado pelo ferro pode ser revertida, retornando ao normal à funcionalidade da organela e também a viabilidade sináptica, corroborando com um possível papel neuroprotetor para essa substância terapêutica.

Em conclusão, esse trabalho demonstra que o SFN pode ser um composto de proteção para a mitocôndria no sistema nervoso central frente à sobrecarga de ferro, e que o ferro pode induzir a uma disfunção mitocondrial e possivelmente numa diminuição da função sináptica. Espera-se que esse estudo possa contribuir a outras pesquisas na busca de um melhor entendimento do estresse oxidativo ocasionado pelo ferro, da contribuição mitocondrial nesse processo e da possível estratégia terapêutica utilizando SFN.

REFERÊNCIAS

1. Abbott, N. J.; Patabendige, A. A.; Dolman, D. E.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiol Dis**, 37:13–25, 2009.
2. Andrews, N.C. & Schmidt, P. J. Iron homeostasis. **Annu. Rev. Physiol**, 69:69–85, 2007.
3. Arnaudeau, S.; Kelley, W.L.; Walsh Jr, J. V. & Demaurex, N. Mitochondria recycle Ca²⁺ to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. **J Biol Chem**, 276:29430-9, 2001.
4. Arthur, C.P. & Stowell, M.H. Structure of synaptophysin: a hexamericMARVEL-domain channel protein. **Structure**, 15:707–714, 2007.
5. Bartzokis, G.; Tishler, T.A.; Lu, P.H.; Villablanca, P.; Altshuler, L.L.; Carter, M.; Huang, D.; Edwards, N.; Mintz, J. Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. **Neurobiol. Aging**, 28:414–423, 2007.
6. Beal, M. F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. **Ann Neurol**, 58:495–505, 2005.
7. Bliss, T. V. & Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361:31–39, 1993.
8. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72:248-254, 1976.
9. Bogaards, J. J.; van Ommen, B.; Falke, H. E.; Willems, M. I. & van Bladeren, P. J. Glutathione S-transferase subunit induction patterns of Brussels sprouts, allyl isothiocyanate and goitrin in rat liver and small intestinal mucosa: A new approach for the identification of inducing xenobiotics. **Food Chem. Toxicol.**, 28:81-88, 1990.
10. Bossy-Wetzel, E.; Barsoum, M. J.; Godzik, A.; Schwarzenbacher, R. & Lipton, S. A. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. **Curr Opin Cell Biol**, 15:706–716, 2003.
11. Burke, S. N. & Barnes, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. **Nat. Rev. Neurosci.**, 7:30–40, 2006.
12. Calakos, N. & Scheller, R. H. Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. **J Biol Chem**, 269:24534–24537, 1994.
13. Campello, S. & Scorrano, L. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. **EMBO Rep**, 11(9):678–684, 2010.
14. Chan, D. C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 22:79–99, 2006.

15. Chen, H. & Chan, D. C. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. **Hum Mol Genet**, 14(Spec No 2):R283–R289, 2005.
16. Chen, H. & Chan, D. C. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. **Curr Opin Cell Biol**, 18:453-459, 2006.
17. Connor, J. R.; Pavlick, G.; Karli, D.; Menzies, S. L. & Palmer, C. A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. **J Comp Neurol**, 355:111–123, 1995.
18. Crichton, R. R.; Dexter, D. T. & Ward, R. J. Metal based neurodegenerative diseases—from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Coord Chem Rev**, 252:1189–1199, 2008.
19. Da Silva, V. K.; de Freitas, B. S.; Dornelles, A. S.; Nery, L. R.; Falavigna, L.; Ferreira, R. D. P.; Bogó, M. R.; Hallak, J. E. C.; Zuardi, A. W.; Crippa, J. A. S. & Schröder, N. Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNMI1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection. **Mol Neurobiol**, DOI:10.1007/s12035-013-8514-7, 2013.
20. Dal-Pizzol, F.; Klamt, F.; Frota Jr, M. L. C.; Andrades, M. E.; Caregnato, F. F.; Vianna, M. M. R.; Schröder, N.; Quevedo, J.; Izquierdo, I.; Archer, T. & Moreira, J. C. F. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. **Developmental Brain Research**, 130:109–114, 2001.
21. Daly, C.; Sugimori, M.; Moreira, J.E.; Ziff, E. B. & Llinas, R. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 97: 6120–6125, 2000.
22. Dash, P. K.; Zhao, J.; Orsi, S. A.; Zhang, M. & Moore, A. N. Sulforaphane improves cognitive function administered following traumatic brain injury. **Neurosci Lett.**, 460(2):103–107, 2009.
23. Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science**, 302:819–822, 2003.
24. De Lima, M. N.; Polydoro, M.; Laranja, D. C.; Bonatto, F.; Bromberg, E.; Moreira, J. C.; Dal-Pizzol, F. & Schröder, N. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. **Eur J Neurosci**, 21:2521-2528, 2005a.
25. De Lima, M. N. M.; Dias, C. P.; Torres, J. P.; Dornelles, A.; Garcia, V. A.; Scalco, F. S.; Guimarães, M. R.; Petry, R. C.; Bromberg, E.; Constantino, L.; Budni, P.; Dal-Pizzol, F. & Schröder, N. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. **Neurobiol Aging**, 29:1052-1059, 2008.
26. Dexter, D. T.; Carayon, A.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y.; Wells, F. R.; Daniel, S. E.; Lees, A. J.; Jenner, P. & Marsden, C. D. Alterations in the levels of iron, ferritin and other

- trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 114, 1953–1975, 1991.
27. DiMauro, S. & Schon, E. A. Mechanisms of disease: Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*, 348:2656–2668, 2003.
 28. Detmer, S. A. & Chan, DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:870–879, 2007.
 29. Driscoll, I.; Howard, S. R.; Stone, J. C.; Monfils, M. H.; Tomanek, B.; Brooks, W. M. & Sutherland, R. J. The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*, 139:1173–1185, 2006.
 30. Dwork, A. J.; Lawler, G.; Zybert, P. A.; Durkin, M.; Osman, M.; Willson, N. & Barkai, A. I. An autoradiographic study of the uptake and distribution of iron by the brain of the young rat. *Brain Res*, 518:31–39, 1990.
 31. Edelmann, L.; Hanson, P. I.; Chapman, E. R. & Jahn, R. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J*, 14: 224–231, 1995.
 32. Fagherazzi, E. V.; Garcia, V. A.; Maurmann, N.; Bervanger, T.; Halmenschlager, L. H.; Busato, S. B.; Hallak, J. E.; Zuardi, A. W.; Crippa, J. A. & Schröder, N. Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. *Psychopharmacology (Berl)*, 199:284–91, 2012.
 33. Fahey, J. W.; Zalcman, A. T. & Talalay, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56:5–51, 2001.
 34. Fernandez-Checa, J. C.; Garcia-Ruiz, C.; Colell, A.; Morales, A.; Mari, M.; Mirandi, M. & Ardite, E. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors*, 8:7-11, 1998.
 35. Fernandez, L. L.; Fornari, L. H. T.; Barbosa, M. V. & Schröder, N. Iron and neurodegeneration. *Scientia Medica*, 17:218–224, 2007.
 36. Fernandez, L. L.; De Lima, M. N. M.; Scalco, F.; Vedana, G.; Miwa, C.; Hilbig, A.; Vianna, M. & Schroder, N. Early Post-Natal Iron Administration Induces Astroglial Response in the Brain of Adult and Aged Rats. *Neurotox Res*, 20:193–199, 2011.
 37. Ferrer, I.; López-Gonzalez, I.; Carmona, M.; Dalfó, E.; Pujol, A. & Martínez, A. Neurochemistry and the non-motor aspects of PD. *Neurobiol Dis*, 46:508–26, 2012.
 38. Frezza, C.; Cipolat, S.; Martins de Brito, O.; Micaroni, M.; Beznoussenko, G. V.; Rudka, T.; Bartoli, D.; Polishuck, R. S.; Danial, N. N.; De Strooper, B. & Scorrano L. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, 126:177–189, 2006.
 39. Fortin, A.; Gregan, S. P.; MacLaurin, J. G.; Kushwaha, N.; Hickman, E. S.; Thompson, C. S.; Hakim, A.; Albert, P. R.; Cecconi, F.; Helin, K.; Park, D. & Slack

- RS. APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. **J Cell Biol**, 155:207-216, 2001.
40. Guerrero-Beltrán, C. E.; Olivera, M. C.; Chaverria, J. P. & Chirino, Y. I. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64:503–508, 2012.
 41. Halliwell, B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurol Scand Suppl*, 126:23–33, 1989.
 42. Harman, D. The biologic clock: the mitochondria? **Journal of the American Geriatrics Society**, 20:145–147, 1972.
 43. Harris, Z. L.; Durley, A. P.; Man, T. K. & Gitlin, J. D. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 19, pp. 10812–10817, 1999.
 44. Harris, J. J.; Jolivet, R.; Attwell, D. Synaptic energy use and supply. **Neuron**, v. 75, n. 5, p. 762-777, 2012.
 45. Harris, K. M. & Weinberg, R. J. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 4: a005587, 2012.
 46. Hayflick, L. How and why we age. **Experimental Gerontology**, 33:639–653, 1998.
 47. Jahn, R.; Schiebler, W.; Ouimet, C. & Greengard, P. A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. **Proc Natl Acad Sci**, 82:4137–4141, 1985.
 48. James, D.I.; Parone, P. A.; Mattenberger, Y.; Martinou, J.C. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. **J Biol Chem**, 278(38):36373–36379, 2003.
 49. Janetzky, B., Reichmann, H., Youdim, M. B. H. & Riederer, P. Iron and Oxidative Damage in Neurodegenerative Diseases. **Wiley-Liss**, New York, 1997.
 50. Labrousse, A. M.; Zappaterra, M. D.; Rube, D. A. & van der Bliek, A. M. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. **Mol Cell**, 4:815–26, 1999.
 51. Larsson, N. G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. **Annu Rev Biochem**, 79: 683–706, 2010.
 52. Lee, D. W.; Sohn, H. O.; Lim, H. B.; Lee, Y. G.; Kim, Y. S.; Carp, R. I. & Wisniewski, H. M. Alteration of free radical metabolism in the brain of mice infected with scrapie agent. **Free Radic Res**, 30(6):499–507, 1999.
 53. Lee, D. W.; Andersen, J. K. & Kaur, D. Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. **Mol Interv**, 6:89–97, 2006.

54. Lee, S. H.; Kim, K. R.; Ryu, S. Y.; Son, S.; Hong, H. S.; Mook-Jung, I.; Lee, S. H. & Ho, W. K. Impaired short-term plasticity in mossy fiber synapses caused by mitochondrial dysfunction of dentate granule cells is the earliest synaptic deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, 32: 5953–63, 2012.
55. Leube, R. E. The topogenic fate of the polytopic transmembrane proteins, synaptophysin and connexin, is determined by their membrane-spanning domains. **J Cell Sci**, 108(Pt 3):883-94, 1995.
56. Li, Z.; Okamoto, K.; Hayashi, Y. & Sheng, M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. **Cell**, 119:873–887, 2004.
57. Liesa, M.; Palacin, M. & Zorzano, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. **Physiol Ver**, 89(3):799–845, 2009.
58. Luiro, K.; Kopra, O.; Blom, T.; Gentile, M.; Mitchison, H. M.; Hovatta, I.; Törnquist, K. & Jalanko, A. Batten disease (JNCL) is linked to disturbances in mitochondrial, cytoskeletal, and synaptic compartments. **J Neurosci Res**, 84:1124–38, 2006.
59. Kim, I.; Rodriguez-Enriquez, S. & Lemasters, J. J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. **Arch Biochem Biophys**, 462(2):245–253, 2007.
60. Kienzl, E.; Puchinger, L.; Jellinger, K.; Linert, W.; Stachelberger, H. & Jameson, R. F. The role of transition metals in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.**, 134(Supp.):69–78, 1995.
61. Knott, Andrew B., Perkins, G.; Schwarzenbacher, R. & Bossy-Wetzler E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci**, 9:505–518, 2008.
62. Koch, A.; Thiemann, M.; Grabenbauer, M.; Yoon, Y.; McNiven, M. A. & Schrader, M. Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. **J Biol Chem**, 278:8597–8605, 2003.
63. Kwon, S. E. & Chapman, E. R. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. **Neuron**, 70(5): 847–854, 2011.
64. Mattson, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 1(2):120–129, 2000.
65. Mallucci, G. R. Starts and stops at the synapse. **Prion**, 3(4):195-201, 2009.
66. Mannella, C. A. Structural diversity of mitochondria: functional implications. **Ann NY Acad Sci**, 1147:171–179, 2008.
67. Manji, H.; Kato, T.; Di Prospero, N. A.; Ness, S.; Beal, M. F.; Krams, M. & Chen, G. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci**, 13:293–307, 2012.

68. McBride, H. M.; Neuspiel, M. & Wasiak, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. **Curr Biol**, 16:R551–60, 2006.
69. McQuibban, G. A.; Saurya, S. & Freeman, M. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. **Nature**, 423:537–541, 2003.
70. Meeusen, S.; McCaffery, J. M. & Nunnari, J. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. **Science**, 305(5691):1747–1752, 2004.
71. Meeusen, S.; DeVay, R.; Block, J.; Cassidy-Stone, A.; Wayson, S.; McCaffery, J.M. & Nunnari, J. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. **Cell**, 127(2):383–395, 2006.
72. Miquel, J.; Economos, A. C.; Fleming, J. & Johnson Jr., J.E. Mitochondrial role in cell aging. **Experimental Gerontology**, 15:575–591, 1980.
73. Miwa, C. P. ; De Lima, M. N.; Scalco, F.; Vedana, G.; Mattos, R.; Fernandez, L. L.; Hilbig, A.; Schröder, N. & Vianna, M. R. Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. **Neurotox Res**, 19:527-535, 2011.
74. Moos, T. Brain iron homeostasis. **Dan Med Bull**, 49:279-301, 2002.
75. Morroni, F.; Tarozzi, A.; Sita, G.; Bolondi, C.; Moraga, J. M. Z.; Forti, G. C. & Hrelia, P. Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. **NeuroToxicology**, 36:63–71, 2013.
76. Navone, F.; Jahn, R.; Di Gioia, G.; Stukenbrok, H.; Greengard, P. & De Camilli, P. Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. **J Cell Biol.**, 103:2511–2527, 1986.
77. Olichon, A.; Emorine, L. J.; Descoins, E.; Pelloquin, L.; Bricchese, L.; Gas, N.; Guillou, E.; Delettre, C.; Valette, A.; Hamel, C. P.; Ducommun, B.; Lenaers G. & Belenguer, P. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. **FEBS Lett**, 523:171-176, 2002.
78. Olichon, A.; Baricault, L.; Gas, N.; Guillou, E.; Valette, A.; Belenguer, P. & Lenaers G. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. **J Biol Chem**, 278:7743–7746, 2003.
79. Pak, J. W.; Herbst, A.; Bua, E.; Gokey, N.; McKenzie, D. & Aiken, J. M. Mitochondrial DNA mutations as a fundamental mechanism in physiological declines associated with aging. **Aging Cell**, 2:1–7, 2003.
80. Parone, P. A.; Da Cruz, S.; Tondera, D.; Mattenberger, Y.; James, D. I.; Maechler, P.; Barja, F. & Martinou, J.C. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. **PLoS One**, 3(9):e3257, 2008.

81. Perez, V. P.; De Lima, M. N. M.; Silva, R. S.; Dornelles, A. S.; Vedana, Gustavo; Bogo, Maurício R.; Bonan, Carla D. & Schröder, Nadja. Iron Leads to Memory Impairment that is Associated with a Decrease in Acetylcholinesterase Pathways. **Current Neurovascular Research**, 7, 00-00, 2010.
82. Ping, Z.; Liu, W.; Kang, Z.; Cai, J.; Wang, Q.; Cheng, N.; Wang, S.; Wang, S.; Zhang, J. H. & Sun, X. Sulforaphane protects brains against hypoxic–ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme. **Brain Research**, 1343:178–185, 2010.
83. Pitts, K. R.; McNiven, M. A. & Yoon, Y. Mitochondria-specific function of the dynamin family protein DLP1 is mediated by its C-terminal domains. **J Biol Chem**, 279:50286–55094, 2004.
84. Priya, D. K. D.; Gayathri, R.; Gunassekaran, G. R. & Sakthisekaran D. Protective role of sulforaphane against oxidative stress mediated mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in female Swiss albino mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, 24:110-117, 2011.
85. Quintana, C. About the presence of hemosiderin in the hippocampus of Alzheimer patients. **J Alzheimers Dis**, 12:157–160, 2007.
86. Quintana, C.; Bellefqih, S.; Laval, J. Y.; Guerquin-Kern, J. L.; Wu, T. D.; Avila, J.; Ferrer, I.; Arranz, R. & Patiño, C. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. **J Struct Biol**, 153:42–54, 2006.
87. Rapp, P. R. & Gallagher, M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 93:9926–9930, 1996.
88. Reddy, P. H.; Mani, G.; Park, B. S.; Jacques, J.; Murdoch, G.; Whetsell, W. Jr.; Kaye, J. & Manczak, M. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. **J Alzheimers**, 7(2):103-17, 2005.
89. Reddy, P. H. & Shirendeb, U. P. Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease. **Biochim Biophys Acta**, 1822: 101–10, 2012.
90. Riederer, P. F. View on neurodegeneration as a basis for neuroprotective strategies. **Med Sci Monit**, 10:RA287–RA290, 2004.
91. Rose, P.; Faulkner, K.; Williamson, G. & Mithen, R. 7-Methylsulfinylheptyl and 8-methylsulfinyloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II enzymes. **Carcinogenesis**, 21:1983-1988, 2000.
92. Rosenzweig, E. S. & Barnes, C. A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. **Prog. Neurobiol.**, 69:143–179, 2003.
93. Schröder, N.; Fredriksson, A.; Vianna, M. R.; Roesler, R.; Izquierdo, I. & Archer, T. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. **Behav Brain Res**, 124:77-85, 2001.

94. Schröder, N.; Figueiredo, L. S. & De Lima, M. N. M. Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies. **J Alzheimers Dis**, 34:797-812, 2013.
95. Sengstock, G. J.; Olanow, C. W.; Menzies, R. A.; Dunn, A. J. & Arendash, G. W. Infusion of iron into the rat substantia nigra: Nigral pathology and dose-dependent loss of striatal dopaminergic markers. **J. Neurosci. Res.**, 35:67–82, 1993.
96. Seo, A. Y.; Hofer, T.; Sung, B.; Judge, S.; Chung, H. Y. & Leeuwenburgh, C. Hepatic oxidative stress during aging: effects of 8% long-term calorie restriction and lifelong exercise. **Antioxid. Redox. Signal**, 8:529-538, 2006.
97. Seo, A. Y.; Xu, J.; Servais, S.; Hofer, T.; Marzetti, E.; Wohlgemuth, S. E.; Knutson, M. D.; Chung, H. Y. & Leeuwenburgh, C. Mitochondrial iron accumulation with age and functional consequences. **Aging Cell**, 7:706-716, 2008.
98. Shimada, A.; Keino, H.; Satoh, M.; Kishikawa, M.; Hosokawa, M. Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: A model of cerebral degeneration. **Synapse**, v. 48, n. 4, p. 198–204, 2003.
99. Sian-Hulsmann, J.; Mandel, S.; Youdim, M. B. H. & Riederer, P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J. Neurochem**, 118:939–957, 2011.
100. Smirnova, E.; Griparic, L.; Shurland, D. L. & van der Blik, A. M. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. **Mol Biol Cell**, 12:2245–56, 2001.
101. Stowers, R. S.; Megeath, L. J.; Gorska-Andrzejak, J.; Meinertzhagen, I. A. & Schwarz, T. L. Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel Drosophila protein. **Neuron**, 36:1063–1077, 2002.
102. Sudhof, T. C.; Lottspeich, F.; Greengard, P.; Mehl, E. & Jahn, R. A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. **Science**, 238:1142–1144, 1987.
103. Suen, D. F.; Norris, K. L. & Youle, R. J. Mitochondrial dynamics and apoptosis. **Genes Dev**, 22:1577–1590, 2008.
104. Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Gronborg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brugger, B.; Ringler, P.; Müller, S. A.; Rammner, B.; Gräter, F.; Hub, J. S.; De Groot, B. L.; Mieskes, G.; Moriyama, Y.; Klingauf, J.; Grubmüller, H.; Heuser, J.; Wieland, F. & Jahn, R. Molecular anatomy of a trafficking organelle. **Cell**, 127:831–846, 2006.
105. Todorich, B. M. & Connor J. R. Redox metals in Alzheimer's disease. **Ann NY Acad Sci**, 1012:171–178, 2004.
106. Tondera, D.; Grandemange, S.; Jourdain, A.; Karbowski, M.; Mattenberger, Y.; Herzig, S.; Da Cruz, S.; Clerc, P.; Raschke, I.; Merkwirth, C.; Ehse, S.; Krause, F.; Chan, D.C.; Alexander, C.; Bauer, C.; Youle, R.; Langer, T. & Martinou, J.C. SLP-2 is

- required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. **EMBO J**, 28(11):1589–1600, 2009.
107. Trimmer, P. A.; Swerdlow, R. H.; Parks, J. K.; Keeney, P.; Bennett Jr., J. P.; Miller, S. W.; Davis, R. E. & Parker Jr., W. D. Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines. **Exp Neurol**, 162:37–50, 2000.
108. Valtorta, F.; Pennuto, M.; Bonanomi, D. & Benfenati, F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? **BioEssays**, 26:445–453, 2004.
109. Van Laar, V. S. & Berman, S. B. The interplay of neuronal mitochondrial dynamics and bioenergetics: Implications for Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, 51:43–55, 2013.
110. Van Poppel, G.; Verhoeven, D. T.; Verhagen, H. & Goldbohm, R. A. Brassica vegetables and cancer prevention epidemiology and mechanisms. **Adv Exp Med Biol**, 472:159–68, 1999.
111. Wang, X.; Su, B.; Zheng, L.; Perry, G.; Smith, M. A.; Zhu, X. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, Suppl 1, p. 153-15, 2009a.
112. Washbourne, P.; Schiavo, G. & Montecucco, C. Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. **Biochem J**, 305(Pt 3):721–724, 1995.
113. Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 11(12):872–884, 2010.
114. Wiedenmann, B. & Franke, W. W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. **Cell**, 41:1017–1028, 1985.
115. Winzer, K.; Becker, W.; Van Noorden, C. J. F. & Köhler A. Short time induction of oxidative stress in hepatocytes of the European flounder (*Platichthys flesus*). **Mar Environ Res**, 50:495-501, 2000.
116. Wu, L. J.; Leenders, A. G.; Cooperman, S.; Meyron-Holtz, E.; Smith, S.; Land, W.; Tsai, R. Y.; Berger, U. V.; Sheng, Z. H. & Rouault, T. A. Expression of iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood brain barrier. **Brain Res.**, 1001, 108–117, 2004.
117. Yoon, Y.; Krueger, E. W.; Oswald, B. J. & McNiven, M. A. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. **Molecular and Cellular Biology**, 23: 5409–5420, 2003.
118. Youdim, M. B.; Ben-Shachar, D. & Riederer, P. Iron in brain function and dysfunction with emphasis on Parkinson's disease. **Eur. Neurol**, 31:34–40, 1991.

119. Zhao, J.; Moore, A. N.; Clifton, G. L. & Dash P. K. Sulforaphane enhances aquaporin-4 expression and decreases cerebral edema following traumatic brain injury. **J Neurosci Res**, 82:499–506, 2005.
120. Zhao, J.; Moore, A. N.; Redell, J. B. & Dash, P. K. Enhancing expression of Nrf2-driven genes protects the blood brain barrier after brain injury. **J Neurosci**, 27:10240–10248, 2007.
121. Zecca, L.; Youdim, M. B.; Riederer, P.; Connor, J. R. & Crichton, R. R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. **Nat Rev Neurosci**, 5:863–873, 2004.

ANEXO - Comprovante de submissão do artigo**Submission Confirmation**

ees.nsc.0.2f7d52.5298e814@eesmail.elsevier.com em nome de Neuroscience, Editorial
[neuroscience@journal-office.com]

Para: Nadja Schroder; nadja_s@terra.com.br
segunda-feira, 23 de fevereiro de 2015 17:59

Sulforaphane rescues memory dysfunction and synaptic and mitochondrial alterations induced
by brain iron accumulation
Research Paper
Corresponding Author: Dr. Nadja Schröder

Dear Dr. Schröder,

Your submission entitled "Sulforaphane rescues memory dysfunction and synaptic and
mitochondrial alterations induced by brain iron accumulation" has been received for
consideration in Neuroscience.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to EES for
Neuroscience (<http://ees.elsevier.com/nsc/>) as an author.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail
with this number for your reference.

Please be aware that Neuroscience offers the 3D visualization viewer for the neuroimaging
data embedded in published online articles. Hence, we would like to encourage you to upload
the neuroimaging data (in NIfTI format) as supplementary material with your manuscript to
our online submission system during the article revision stage. More information can be found
at: <http://www.elsevier.com/3DNeuroimaging>

Thank you for submitting your manuscript to Neuroscience. Should you have any questions,
please feel free to contact our office.

Kind regards,

Stephen G. Lisberger, Chief Editor
Etienne Hirsch, Associate Editor
Neuroscience

Neuroscience, Editorial Office

Elsevier
E-mail: neuroscience@journal-office.com