

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

**LUCIANA SILVA FIGUEIREDO**

**PAPEL DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA NA FORMAÇÃO DA  
MEMÓRIA E SUAS ALTERAÇÕES EM UM MODELO DE DISFUNÇÃO  
COGNITIVA ASSOCIADA AO ACÚMULO CEREBRAL DE FERRO**

PORTO ALEGRE

2015

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

**LUCIANA SILVA FIGUEIREDO**

**PAPEL DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA NA FORMAÇÃO DA  
MEMÓRIA E SUAS ALTERAÇÕES EM UM MODELO DE DISFUNÇÃO  
COGNITIVA ASSOCIADA AO ACÚMULO CEREBRAL DE FERRO**

PORTO ALEGRE

2015

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR  
TESE DE DOUTORADO

**LUCIANA SILVA FIGUEIREDO**

**PAPEL DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA NA FORMAÇÃO DA  
MEMÓRIA E SUAS ALTERAÇÕES EM UM MODELO DE DISFUNÇÃO  
COGNITIVA ASSOCIADA AO ACÚMULO CEREBRAL DE FERRO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande  
do Sul para a obtenção do título de  
Doutora em Medicina e Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Nadja Schröder

PORTO ALEGRE

2015

*We are what we remember.*

*Norberto Bobbio*

## ABREVIACES UTILIZADAS

ALS: da sigla do termo em inglês, *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (Esclerose Lateral Amiotrófica)

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ApUch: ubiquitina hidrolase C-terminal

ATP: da sigla do termo em inglês, *Adenosine Triphosphate* (trifosfato de adenosina)

BDNF: da sigla do termo em inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (fator neurotrófico derivado do cérebro)

CaMKII: quinase dependente de cálcio-calmodulina

CMS: da sigla do termo em inglês, *Context-Signal Memory* (memória de contexto)

CP: da sigla do termo em inglês, *Core Particle* (núcleo catalítico)

DFO: deferoxamina

DNA: cido desoxirribonucleico

DOPAC: cido dihidroxifenilacético

DUB: da sigla do termo em inglês, *Deubiquitinating Enzyme* (enzima deubiquitinada)

GSH: glutatona reduzida

HVA: cido homovanílico

KCl: cloreto de potássio

LAC: lactacistina

LTM: da sigla do termo em inglês, *Long-Term Memory* (memória de longa duração)

LTP: da sigla do termo em inglês, *Long-Term Potentiation* (potenciação de longa duração)

Lys: da sigla do termo em inglês, *Lysine* (lisina)

MAO: monoamino oxidase

MCI: da sigla do termo em inglês, *Mild Cognitive Impairment* (Transtorno Cognitivo Leve)

NAC: N-acetil cisteína

NFT: da sigla do termo em inglês, *Neurofibrillary Tangles* (emaranhados neurofibrilares)

NEDD8: da sigla do termo em inglês, *Neural Precursor Cell Expressed Development Down-Regulated 8*

NMDA: N-metil D-aspartato

PKA: proteína quinase A

PSEN1: da sigla do termo em inglês, *Presenilin 1*

ROS: da sigla do termo em inglês, *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

RP: da sigla do termo em inglês, *Regulatory Particle* (partícula reguladora)

SNC: sistema nervoso central

SOD1: da sigla do termo em inglês, *Copper-Zinc Superoxide Dismutase 1* (enzima superóxido dismutase 1)

SUMO-1: da sigla do termo em inglês, *Small Ubiquitin-like Modifier*

UBB<sup>1</sup>: da sigla do termo em inglês, *Mutant Ubiquitin* (ubiquitina mutante)

UBE3A: da sigla do termo em inglês, *Ubiquitin-Protein Ligase E3A* (proteína ubiquitina ligase E3A)

UCH-L3: da sigla do termo em inglês, *Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L3 (Ubiquitin Thiolesterase)* (ubiquitina carboxi-terminal de L3 hidrolase)

UPS: da sigla do termo em inglês, *Ubiquitin Proteasome System* (sistema ubiquitina-proteassoma)

## RESUMO

A função neuronal saudável e a modificação sináptica precisam tanto da síntese quanto da degradação de proteínas. Evidências indicam que o *turnover* de proteínas mediado pela atividade do proteassoma está envolvido na plasticidade sináptica e na memória de longa duração. No entanto, seu papel nas diferentes fases da memória continua em discussão, e estudos anteriores não avaliaram a possível necessidade da degradação de proteínas na memória de reconhecimento. Nesse trabalho, nós mostramos que o inibidor de proteassoma, lactacistina, infundido na área de CA1 do hipocampo em dois períodos de tempo específicos durante a consolidação, prejudica a retenção da memória de reconhecimento em ratos. A administração da lactacistina não afetou a reconsolidação da memória. Estas descobertas fornecem a primeira evidência para a importância da atividade do proteassoma na memória de reconhecimento, indicando que a degradação de proteínas no hipocampo é necessária durante duas janelas de tempo específicas na consolidação da memória, contribuindo para a melhor compreensão do papel do *turnover* de proteína na formação da memória. Alterações dos níveis de ferro cerebral têm sido observadas em doenças neurodegenerativas. Já foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa, que a sobrecarga de ferro no período neonatal resulta em graves e persistentes déficits de memória na vida adulta. A degradação das proteínas mediada pelo sistema ubiquitina-proteassoma desempenha um importante papel na regulação de vários processos celulares e seu comprometimento tem sido implicado na patogênese de doenças neurodegenerativas. Então, nesse estudo, também foram avaliados os efeitos da exposição de ferro no período neonatal sobre a expressão das subunidades do proteassoma  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , e  $\beta 5$  e das proteínas poliubiquitinadas em cérebros de ratos aos 15 dias de vida e na idade adulta. Dois tipos de memória dependente do hipocampo, aversiva e de reconhecimento, foram analisados em animais adultos. Confirmamos as evidências anteriores, de que o ferro administrado no período neonatal prejudica tanto a memória aversiva quanto a memória de reconhecimento. Os níveis de proteínas poliubiquitinadas encontraram-se



elevados no hipocampo, mas não no córtex, de animais adultos tratados com ferro. A expressão gênica das subunidades  $\beta 1$  e  $\beta 5$  foram afetadas pela idade no hipocampo, sendo maior nos primeiros estágios de desenvolvimento, acompanhado por um aumento relacionado com a idade nos níveis de proteína poliubiquitinada em ratos adultos. No córtex, a expressão gênica das três subunidades do proteassoma foi significativamente mais elevada na idade adulta do que na idade neonatal. Em conjunto, esses resultados sugerem que a expressão das subunidades e a atividade do proteassoma são regulados de forma dependente da idade. Este, foi o primeiro estudo a investigar o sistema de degradação de proteínas em cérebros de ratos neonatos e também, o primeiro a estudar as subunidades do proteassoma comparando as idades neonatal e adulta. A exposição ao ferro no período neonatal produz efeitos nocivos duradouros sobre o funcionamento do sistema ubiquitina-proteassoma, que pode estar relacionado com a deficiência de memória induzida pelo ferro, fornecendo evidências de que esse sistema pode ser considerado um alvo para o tratamento dos déficits de memória.

**Palavras-Chave:** proteassoma, lactacistina, degradação de proteínas, hipocampo, reconhecimento do objeto, memória de reconhecimento, sistema ubiquitina-proteassoma,  $\beta$ -subunidades do proteassoma, ferro, doenças neurodegenerativas, memória.

## **ABSTRACT**

The healthy neuronal function and synaptic modification need both the synthesis and degradation of proteins. Evidence indicates that the protein turnover mediated by proteasome activity is involved in synaptic plasticity and long term memory. However, their role in different stages of memory is still under discussion, and previous studies did not evaluate the possible need of protein degradation in recognition memory. In this work, we have shown that proteasome inhibitor, lactacystin, infused in the CA1 area of the hippocampus at two specific time periods during consolidation affect the retention of the recognition memory in mice. The administration of lactacystin did not affect the reconsolidation of memory. These findings provide the first evidence for the importance of proteasome activity in memory recognition, indicating that the protein breakdown in the hippocampus is required during two specific time windows in memory consolidation, contributing to a better understanding of protein turnover's role in memory formation. Changes of brain iron levels have been observed in neurodegenerative diseases. It has been demonstrated by our research group, that iron overload in the neonatal period results in severe and persistent memory deficits in adulthood. Protein degradation mediated by the ubiquitin proteasome system plays an important role in regulating various cellular processes and their involvement has been implicated in pathogenesis of neurodegenerative diseases. So in this study was also evaluated the effects of iron exposure in the neonatal period on the expression of proteasome subunits  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , and  $\beta 5$  and polyubiquitinated proteins in brains of rats at 15 days of life and adulthood. Two types of hippocampal-dependent memory and recognition aversive were analyzed in adult animals. We confirm earlier evidence that iron administered in the neonatal period affect both the aversive memory and recognition memory. The levels of proteins polyubiquitinated found to be high in the hippocampus, but not in the cortex of adult animals treated with iron. The gene expression of the subunits  $\beta 1$  and  $\beta 5$  were affected by age in the hippocampus, which is higher in the early stages of development, accompanied by a related increase with age polyubiquitinated

protein levels in adult rats. In the cortex, the gene expression of all three subunits of the proteasome was significantly higher in old adult than in neonatal age. Together, these results suggest that the expression of the subunits of the proteasome and are regulated activity of age-dependent manner. This was the first study to investigate the protein degradation system in the brain of rats newborns and also the first to study the proteasome subunits comparing neonatal and adult ages. Exposure to iron in the neonatal period produces long lasting harmful effects on the functioning of the ubiquitin-proteasome system, which may be related to deficiency of the iron induced memory, providing evidence that this system can be considered a target for the treatment of deficits memory.

**Keywords:** proteasome, lactacystin, protein degradation, hippocampus, object recognition, recognition memory, ubiquitin-proteasome system, proteasome  $\beta$ -subunits, iron, neurodegenerative disorders, memory.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.1	Ferro e Doenças Neurodegenerativas	15
1.2	Modelo Animal de Sobrecarga de Ferro Neonatal	22
1.3	Memória	25
1.4	Sistema Ubiquitina-Proteassoma	28
1.4.1	Ubiquitina	29
1.4.2	Conjugação de Ubiquitina	30
1.4.3	Enzimas E1, E2 e E3	30
1.4.4	Proteassoma 26S	32
1.5	Sistema Ubiquitina-Proteassoma, Plasticidade Sináptica e Memória	33
1.6	Sistema Ubiquitina-Proteassoma e Doenças Neurodegenerativas	36
1.7	Sistema Ubiquitina-Proteassoma e Ferro	41
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b>	43
2.1	Objetivos Específicos	43
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	45
3.1	Parte I – Artigo 4.2	45
3.1.1	Animais	45
3.1.2	Tratamento	45
3.1.3	Desenho Experimental	46
3.1.4	Análise Comportamental	48
3.1.5	Análise Histológica	49
3.1.6	Análise Estatística	49
3.2	Parte II – Artigo 4.3	50
3.2.1	Animais	50
3.2.2	Tratamento	50

3.2.3	Desenho Experimental	51
3.2.4	Análises Comportamentais	52
3.2.5	Análises Moleculares	53
3.2.5.1	Expressão de Proteínas do UPS – Western Blot	53
3.2.5.2	Expressão Gênica do UPS – <i>Real-Time</i> PCR quantitativo	55
3.2.6	Análise Estatística	56
<b>4</b>	<b>ARTIGOS</b>	<b>58</b>
4.1	<i>Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies</i> (Journal of Alzheimer’s Disease 2013;34(4):797-812)	58
4.2	<i>Two waves of proteasome-dependent protein degradation in the hippocampus are required for recognition memory consolidation</i> (Neurobiology of Learning and Memory 120(2015)1-6)	75
4.3	<i>Iron loading selectively increases hippocampal levels of ubiquitinated proteins and impairs hippocampus-dependent memory</i> (Molecular Neurobiology) (SUBMETIDO)	82
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>88</b>

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Conjugação de Ubiquitina e Enzimas E1, E2 e E3	31
Figura 2:	Estrutura do Proteassoma 26S	33

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Doenças neurodegenerativas caracterizadas por agregação e deposição de proteína anormal	21
Tabela 2:	Sequências <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) dos primers usados na análise de RT-qPCR	56

## 1 INTRODUÇÃO

Até o ano de 2050, a população mundial com mais de 80 anos deve triplicar. Com o aumento da população idosa, o peso econômico dos cuidados e tratamento das pessoas com problemas de saúde relacionados com a idade também aumenta, levando à necessidade de medidas que impeçam ou mesmo revertam esses problemas. A saúde mental é uma preocupação importante no envelhecimento, tendo em vista a alta prevalência de déficits de memória e comprometimento cognitivo (Joseph *et al.*, 2009). A ausência de tratamentos efetivos contra as doenças neurodegenerativas trazem a necessidade de maiores investigações sobre os mecanismos básicos que venham trazer novos alvos para o desenvolvimento de possíveis tratamentos (Joseph *et al.*, 2009).

Doenças neurodegenerativas são caracterizadas por disfunção progressiva e perda de neurônios e sinapses em áreas vulneráveis do sistema nervoso, determinando a apresentação clínica e o curso da doença (Jellinger, 2009). A neurodegeneração é multifatorial, causada por fatores genéticos, ambientais e fatores endógenos relacionados ao envelhecimento. As doenças neurodegenerativas têm sido tradicionalmente definidas como entidades clínico-patológicas; mais recentemente, elas vêm sendo classificadas de acordo com os mecanismos genéticos e/ou de acordo com os depósitos de proteínas encontrados (Jellinger, 2009). Devido ao envolvimento de mudanças conformacionais críticas de proteínas, esses transtornos são frequentemente chamados de doenças causadas por proteínas mal dobradas ou proteinopatias (Jellinger, 2009).

Alterações neuropatológicas em muitas doenças degenerativas do sistema nervoso são caracterizadas pela presença de proteínas anormais que se acumulam no cérebro, levando a uma perda seletiva de neurônios de forma dependente da idade (Fernandez *et al.*, 2010).

As doenças neurodegenerativas compartilham mecanismos patogênicos comuns. São eles: (1) proteínas dinâmicas anormais mal dobradas, defeito de degradação, disfunção proteassomal e agregação; (2) estresse oxidativo e formação de radicais livres e ROS (espécies reativas de oxigênio); (3) danos bioenergéticos, disfunções mitocondriais e dano ao DNA (ácido desoxirribonucleico); (4) fragmentação do aparelho de Golgi neuronal; (5) interrupção do transporte celular; (6) ações e mutações de chaperonas moleculares; (7) disfunção de neurotrofinas; (8) “neuroinflamação” / processo neuroimune e (9) desregulação na homeostasia de metais. Estes mecanismos são inter-relacionados em complexos círculos viciosos, finalmente levando à disfunção celular e morte (Jellinger, 2009).

### **1.1 Ferro e Doenças Neurodegenerativas**

O ferro é um metal essencial para o SNC (sistema nervoso central). Muitos processos no desenvolvimento normal do SNC, incluindo a fosforilação oxidativa, a mielinização dos axônios e a síntese de neurotransmissores requerem ferro (Van Gelder *et al.*, 1998; Hentze *et al.*, 2004). As funções biológicas do ferro são baseadas em seu potencial redox favorável, que permite que este metal se submeta a interconversão entre o cátion divalente ou estado ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e o cátion trivalente ou estado férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) (Papanikolaou e Pantopoulos, 2005).

O ferro dentro do cérebro sadio apresenta um padrão heterogêneo de distribuição dependente da região e do tipo celular. A ordem da distribuição de ferro total no tecido cerebral normal é globo pálido > putâmen > substância negra > núcleo caudado > córtex cerebral = cerebelo. É mais abundante em áreas que são ricas em neurônios dopaminérgicos (Sian-Hülsmann *et al.*, 2011).

O ferro é essencial no cérebro neonatal para o desenvolvimento neurológico normal. A deficiência de ferro em uma idade importante nos seres humanos, durante o período de

desenvolvimento inicial do cérebro, tem sido relacionada a alterações comportamentais, incluindo déficits no aprendizado e na memória (Schröder *et al.*, 2013).

Os níveis de ferro são estritamente regulados em um processo conhecido como homeostase do ferro (Mills *et al.*, 2010). O ferro se acumula progressivamente no cérebro com a idade, o que é normalmente associado a mudanças no metabolismo e/ou homeostase do ferro. O acúmulo de ferro provoca a modificação da estrutura terciária de proteínas (Uversky *et al.*, 2001; Zecca *et al.*, 2004). A principal estratégia de proteção para evitar a sobrecarga de ferro no cérebro é a barreira hematoencefálica, que limita a entrada de ferro para o cérebro pelo sangue através de um sistema de transporte seletivo altamente regulado (Mills *et al.*, 2010). Há uma relação direta de causa e efeito entre a desregulação na homeostase do metal e o aumento do dano oxidativo, sendo a ferritina e ferro cerebral fatores de risco para o envelhecimento e para o início de doenças neurodegenerativas (Jellinger, 2009).

Tem sido proposto que um desequilíbrio na síntese de proteínas de armazenamento de ferro, como ferritina, neuromelanina, hemosiderina, e a quantidade de ferro livre aumentariam o risco de dano celular por estresse oxidativo (Fernandez *et al.*, 2011). Evidências mostram que, apesar das funções fisiológicas vitais, o ferro pode desempenhar um papel no dano oxidativo sob certas condições, mais pronunciado no envelhecimento (Fernandez *et al.*, 2010). Alterações na homeostase de metais induzem uma maior produção de radicais livres, principalmente catalisada por ferro ou cobre, estando diretamente envolvida em processos neurodegenerativos encontrados em várias doenças.

A habilidade do ferro em aceitar e doar elétrons pode levar à formação de nitrogênio reativo e ROS que podem desencadear um ataque oxidativo aos componentes do tecido contribuindo, portanto, à doença e, talvez, ao próprio envelhecimento (Salvador *et al.*, 2010). A capacidade de doar e aceitar elétrons nessas reações não só contribui para o papel crítico do ferro em processos fisiológicos, mas também pode levar a danos oxidativos significativos via



produção de radicais livres no cérebro quando o excesso de ferro está presente (Gaasch *et al.*, 2007).

Assim, a concentração de ferro pode conferir uma predileção à degeneração neuronal e, posteriormente, precipitar distúrbios do movimento nos gânglios da base. Esta ideia é demonstrada pelo declínio cognitivo e pela dificuldade de movimento observado em neuroferritinopatia, uma doença genética caracterizada pela deposição anormal de ferro nos gânglios da base. Distúrbios dos gânglios da base são responsáveis por uma proporção significativa de incapacidade motora decorrentes de distúrbios neurológicos (Sian-Hülsmann *et al.*, 2011).

O acúmulo de metais de transição no sistema nervoso é uma observação comum em diferentes doenças neurodegenerativas; particularmente, a homeostase do ferro tem se mostrado alterada (Salvador *et al.*, 2010). O acúmulo de ferro em áreas cerebrais tem sido implicado na patogênese de doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, Hallervorden-Spatz entre outras. Estudos mostram um aumento seletivo e significativo de ferro na substância negra de pacientes com doença de Parkinson (Riederer *et al.*, 1989; Dexter *et al.*, 1991).

Pacientes com doenças neurodegenerativas apresentam altas concentrações de ferro cerebral associado ao aumento do estresse oxidativo fornecendo evidências para um papel essencial do ferro na neurodegeneração (Salazar *et al.*, 2008). Um aumento no conteúdo de ferro localizado nas células gliais e neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* tem sido encontrado em pacientes com doença de Parkinson (Sofic *et al.*, 1988; Hirsch *et al.*, 1991). Este aumento de ferro contribui para a morte celular dos neurônios dopaminérgicos por catalisar a produção de radicais hidroxil a partir do peróxido de hidrogênio, um subproduto do catabolismo da dopamina e, por promover a formação de  $\alpha$ -sinucleína, o componente mais abundante dos corpos de Lewy. A neuroproteção obtida pela

quelação de ferro farmacológica ou genética em modelos animais de doença de Parkinson reforça o papel do ferro na degeneração neuronal na doença de Parkinson (Kaur *et al.*, 2003).

Os neurônios dopaminérgicos em pacientes com doença de Parkinson são vulneráveis ao estresse oxidativo, pois esses neurônios contêm um grande número de mitocôndrias o que predispõem a um elevado consumo de oxigênio, além de apresentarem um acúmulo de ferro nos neurônios (Sofic *et al.*, 1991).

Como mencionado anteriormente, estudos têm mostrado que o ferro pode contribuir para a patologia da doença Parkinson por induzir a agregação de proteínas, como a  $\alpha$ -sinucleína. A toxicidade induzida pela  $\alpha$ -sinucleína resulta em um mecanismo de apoptose e pode ser iniciado por estresse oxidativo, porque os radicais hidroxil são produzidos por essa molécula na presença de ferro. A ligação de ferro à  $\alpha$ -sinucleína desempenha um papel importante na fisiopatologia da doença de Parkinson, porque o ferro acelera a agregação da  $\alpha$ -sinucleína (Zhang *et al.*, 2005).

Há uma relação entre a quantidade de ferro infundido por via intranigral e as concentrações de dopamina, e seus metabólitos DOPAC (ácido dihidroxifenilacético) e HVA (ácido homovanílico) dentro do estriado ipsilateral de ratos. Sengstock e colaboradores (1994) demonstraram que a infusão de ferro, em excesso, na substância negra induz a perdas neuronais na *pars compacta*, uma atrofia nigral progressiva e dose-dependente, e também há diminuições progressivas de dopamina e HVA e aumentos progressivos no comportamento rotacional induzido por apomorfina.

Em cérebro de pacientes com doença de Alzheimer, o ferro se acumula em torno e dentro das placas senis (Bishop *et al.*, 2002). Evidências crescentes sugerem que o ferro e a sua principal proteína de armazenamento, a ferritina, se acumulam em regiões específicas do cérebro durante o envelhecimento em condições fisiológicas. O potencial deletério do acúmulo de ferro e seu metabolismo alterado nas células cerebrais são corroborados por

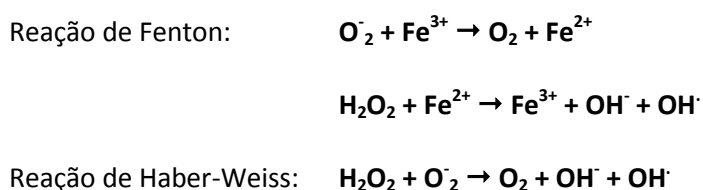
evidências indicando que, em condições patológicas, há uma exacerbação do envelhecimento associado a mudanças no conteúdo de ferro em áreas específicas do cérebro (Miwa *et al.*, 2011).

Na doença de Alzheimer, a homeostase irregular do ferro pode contribuir para a formação de ROS e oligômeros  $\beta$ -amilóides tóxicos, facilitando assim, a formação de placas amilóides e o aumento da peroxidação lipídica que precede a formação de placas  $\beta$ -amilóides em modelo animal da doença de Alzheimer (Jellinger, 2009).

Na doença de Alzheimer, foi observado que o ferro se acumula nas mesmas regiões do cérebro que são caracterizadas pela deposição de  $\beta$ -amilóide, tais como hipocampo, córtex parietal e córtex motor. Além disso, o acúmulo de ferro também foi observado em neurônios com NFT (emaranhados neurofibrilares). Curiosamente, a ligação do ferro férrico com a proteína tau precede a agregação da proteína tau hiperfosforilada e a subsequente formação de NFT (Smith *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2002).

Produtos tóxicos podem surgir quando o peróxido de hidrogênio é formado por superóxido dismutase, que então reage com o ferro livre ou mal ligado – Reação de Fenton (demonstrada abaixo). O superóxido pode também reagir com o ferro férrico através da Reação de Haber-Weiss (demonstrada abaixo), produzindo  $Fe^{2+}$ , que em seguida, novamente afeta o ciclo redox. O resultado são radicais hidroxil livres ( $OH^{\cdot}$ ) altamente reativos que interagem com as moléculas que levam à produção de outros radicais livres. Isto resulta no estresse oxidativo induzido pela peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial, aumento da concentração de cálcio livre intracelular e, finalmente, causando disfunção celular e morte. Lipídeos da membrana neuronal são ricos em ácidos graxos altamente poliinsaturados e, são suscetíveis a danos causados pela peroxidação lipídica. O ferro pode iniciar e ampliar a peroxidação lipídica. Vários antioxidantes produzidos naturalmente, como o  $\alpha$ -tocoferol, pode

ajudar a reduzir os danos oxidativos nos tecidos induzido pelo estresse (Khalil *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997).



O ferro não tem sido envolvido somente na oxidação de lipídios e proteínas, mas também em danos ao DNA. Tem sido mostrado que o ferro é capaz de oxidar as bases do DNA, e que o acúmulo deste metal de transição, observado em alguns distúrbios neurodegenerativos, poderia agir tanto pelo aumento do dano oxidativo do DNA como também impedindo a sua reparação. O ferro tem sido relacionado à neurotoxicidade, e seu acúmulo, principalmente no hipocampo e no córtex, tem sido observado antes de lesões da doença de Alzheimer serem detectáveis. Além disso, foi demonstrado também acúmulo tanto de placas senis quanto de depósitos de amilóide em modelo A $\beta$ PP2576 de camundongos transgênicos para doença de Alzheimer. Estudos mostraram agregados  $\beta$ -amilóides insolúveis serem dissolvidos por quelantes de metal (Cherny *et al.*, 1999). O estresse oxidativo é considerado a primeira mudança na patogênese da doença de Alzheimer, e altos níveis de estresse oxidativo têm sido observados como precursor clínico da doença de Alzheimer, conhecida como MCI (Transtorno Cognitivo Leve). Coincidentemente, níveis aumentados de ferro foram encontrados, tanto no córtex, quanto no cerebelo, de casos pré-clínicos de Alzheimer/MCI (Smith *et al.*, 2010). Acredita-se que o estresse oxidativo, o dano celular e a apoptose neuronal estão subjacentes ao envelhecimento cognitivo progressivo natural (Miwa *et al.*, 2011).

Uma ampla gama de doenças neurodegenerativas é caracterizada por dano neuronal, que pode ser causado por agregados tóxicos de proteínas. Enquanto os genes são identificados para esses transtornos e cultura de células e modelos animais são desenvolvidos, tornou-se

claro que o maior efeito de mutações nestes genes é o processamento anormal e o acúmulo de proteínas mal formadas em inclusões neuronais e placas (Taylor *et al.*, 2002).

As doenças neurodegenerativas compartilham uma característica notável comum: a agregação e deposição de proteína anormal, conforme mostrado na Tabela 1. Os neurônios são particularmente vulneráveis aos efeitos tóxicos de proteínas mutantes ou mal formadas. As características comuns dessas doenças neurodegenerativas sugerem abordagens semelhantes de tratamento, com base no entendimento do mecanismo celular normal de eliminação de proteínas indesejadas e potencialmente nocivas (Taylor *et al.*, 2002).

**Tabela 1:** Doenças neurodegenerativas caracterizadas por agregação e deposição de proteína anormal (Taylor *et al.*, 2002; Ross e Poirier, 2004).

<b>Doença</b>	<b>Depósitos de proteína</b>	<b>Proteína tóxica</b>	<b>Genes da doença</b>	<b>Fator de risco</b>
<b>Alzheimer</b>	Placas extracelulares  Emaranhados intracelulares	Peptídeo $\beta$ -amilóide  Tau	APP* Presenilina 1** Presenilina 2**	Alelo apoE4
<b>Parkinson</b>	Corpos de Lewy	$\alpha$ -sinucleína	$\alpha$ -sinucleína* Parkin** UCHL1**	Ligação tau
<b>Príon</b>	Placas príon	PrP <sup>Sc</sup>	PRNP*	Homozigotia príon
<b>Huntington</b>	Inclusões intranucleares e agregados citoplasmáticos	Huntingtina com expansão poliglutamina	IT15	
<b>Poliglutaminas</b>	Inclusões nucleares e citoplasmáticas	Proteínas contendo poliglutaminas	9 genes diferentes com expansão repetida CAG*	
<b>Tauopatias</b>	Emaranhados citoplasmáticos	Tau	Tau*	Ligação tau
<b>Esclerose amiotrófica lateral familiar</b>	Corpos bunina	SOD1 (superóxido dismutase 1)	SOD1*	

\*Mutações patogênicas associadas a um ganho tóxico de função

\*\*Mutações patogênicas associadas a uma perda de função

## 1.2 Modelo Animal de Sobrecarga de Ferro Neonatal

O uso de modelos animais tem aumentado muito a compreensão dos mecanismos de regulação do ferro e da patogênese de doenças neurodegenerativas relacionadas com a deposição de ferro no cérebro (Dornelles *et al.*, 2010). Modelos animais permitem demonstrar que a deposição neonatal de ferro no cérebro produz disfunção cognitiva na vida adulta, avaliado por diferentes parâmetros de aprendizagem e memória (Rech *et al.*, 2010).

A suplementação de ferro é amplamente prescrita para crianças e, a maioria das fórmulas infantis enriquecidas com ferro apresenta uma quantidade muito maior do que a quantidade presente no leite materno (correspondente a uma ingestão de até 14mg de ferro por dia) (De Lima *et al.*, 2005a). No modelo animal usado no trabalho, o ferro é administrado por via oral durante o período de máxima absorção pelo cérebro, de modo que o modelo se relaciona com a suplementação de ferro na dieta para crianças (Dornelles *et al.*, 2010).

Nos mamíferos, o feto pode ser indiretamente exposto a agentes tóxicos durante a gestação através da ingestão materna. Durante o período neonatal, a prole pode ser afetada por agentes tóxicos através da ingestão de leite materno ou pela exposição direta a xenobióticos. Em muitas espécies de mamíferos o rápido crescimento do cérebro ocorre durante o desenvolvimento perinatal. No ser humano, este período começa durante o terceiro trimestre de gravidez e continua durante todo o primeiro ano de vida do bebê. Em ratos e camundongos o período correspondente é o neonatal, abrangendo as primeiras 3 a 4 semanas de vida. Esse é o período crítico durante o qual o cérebro passa por várias fases fundamentais do desenvolvimento, como a maturação e crescimento axonal e dendrítico, o estabelecimento de conexões neurais, sinaptogênese, a multiplicação e mielinização de células da glia, e morte celular, axonal e dendrítico. Este é também o período em que os animais adquirem muitas faculdades sensoriais e motoras (Fredriksson *et al.*, 1999).

O período pós-natal imediato é fundamental para o estabelecimento e distribuição do conteúdo normal de ferro no cérebro adulto. Os sítios de ligação, tanto do transporte de ferro, quanto da transferrina, são máximos durante o período pós-natal de rápido crescimento do cérebro, essencialmente durante a segunda semana pós-parto em ratos e camundongos, sendo que a absorção máxima de ferro ocorre em ratos com 15 dias de idade (Taylor *et al.*, 1991; Taylor e Morgan, 1990). Dwork e colaboradores (1990) mostraram que o ferro adquirido pelo cérebro durante esse período de desenvolvimento fica retido sem retornar ao plasma. Muitas enzimas que estão presentes no encéfalo, como por exemplo, a tirosina hidroxilase e a MAO (monoamino oxidase) utilizam o ferro como cofator (Janetzky *et al.*, 1997). A necessidade de ferro é maior durante os períodos de diferenciação e rápido crescimento, como no final do período fetal e neonatal. Por consequência, uma deficiência em sua homeostase durante esses períodos pode resultar em um desenvolvimento anormal (Collard, 2011).

Existem várias semelhanças no desenvolvimento do encéfalo de ratos e humanos, entre elas, a maturação no período pós-natal (Watson *et al.*, 2006). Ao nascer, em ambas as espécies, a barreira hematoencefálica não está totalmente formada. Sendo assim, ela não possui capacidade para regular a transferência de material do sangue para o interstício líquido do cérebro. O período de amadurecimento da barreira hematoencefálica ainda não é bem estabelecido, mas acredita-se que o amadurecimento ocorra a partir dos 7 a 10 dias pós-natal em ratos e, aos 6 meses de idade em humanos (Rice, 2000). Assim, a capacidade de regular a disponibilidade do ferro cerebral não está desenvolvida no início da vida, fazendo com que ratos e humanos sejam suscetíveis aos efeitos da deficiência ou excesso de ferro no período neonatal (Haorah *et al.*, 2007).

No modelo animal de sobrecarga neonatal são usados ratos com idade entre 12 e 14 dias, pois, nesse período, os animais ainda não têm uma barreira hematoencefálica desenvolvida, portanto, o ferro pode passar para os tecidos cerebrais (Schröder *et al.*, 2001). No rato adulto, a

barreira hematoencefálica está intacta e o ferro não consegue passar para o cérebro (Schröder *et al.*, 2001). Os ratos recebem por via oral (gavagem) uma única dose diária de  $\text{Fe}^{2+}$  30mg/kg de peso (De Lima *et al.*, 2005b; Budni *et al.*, 2007). A absorção de ferro patologicamente excessiva e sua retenção nos gânglios da base ocorrem durante o tratamento com ferro entre os 12° e 14° dias pós-parto, induzindo principalmente déficits de comportamento motor e memória (Fredriksson *et al.*, 2000).

Os efeitos da administração de ferro durante o período neonatal sobre a cognição têm sido bem documentados. Camundongos (Fredriksson *et al.*, 1999, 2000) e ratos adultos (Schröder *et al.*, 2001) que receberam ferro durante o período crítico de desenvolvimento, que corresponde ao período de captação máxima de ferro pelo cérebro, mostraram déficits de memória espacial, quando testados no labirinto radial. Além disso, este tratamento promoveu o prejuízo da tarefa de esQUIVA inibitória, um tipo de condicionamento aversivamente motivado em ratos. O tratamento neonatal com ferro também prejudica a memória de reconhecimento de longa duração em ratos adultos e induz ao dano oxidativo em regiões cerebrais implicadas na formação da memória, aumentando assim a possibilidade de que os déficits cognitivos induzidos pelo ferro são pelo menos parcialmente mediados pelo estresse oxidativo (De Lima *et al.*, 2005a, 2005b).

Esse modelo animal também foi usado para avaliar a morte celular por apoptose em ratos adultos e idosos (24 meses). A suplementação de ferro nos primeiros estágios de desenvolvimento resulta no acúmulo e posterior toxicidade cerebral, aumentando o dano oxidativo até um nível que as defesas naturais falham e as taxas neuronais de apoptose são exacerbadas durante a idade adulta, resultando em déficits de memória (Miwa *et al.*, 2011).

Fernandez e colaboradores (2011) também demonstraram que a administração de ferro no período neonatal induz a resposta astrogliAl no cérebro de ratos adultos e idosos. A



ingestão de ferro durante o período neonatal induz a gliose astrocitária no hipocampo, estriado e substância negra dos animais.

Em suma, esse modelo animal mostra que a deposição neonatal de ferro no cérebro produz disfunção cognitiva na vida adulta, avaliada por diferentes tipos de aprendizagem e modelos de memória (Schröder *et al.*, 2001; De Lima *et al.*, 2005a; Fredriksson *et al.*, 1999, 2000). Este protocolo de tratamento induz o acúmulo de ferro nos gânglios da base em ratos (Schröder *et al.*, 2001). Além disso, a suplementação de ferro nesse período induz a peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas na substância negra (Dal-Pizzol *et al.*, 2001), mostrando-se assim, um excelente modelo animal para o estudo da relação entre a deposição de ferro no período neonatal e as doenças neurodegenerativas.

### **1.3 Memória**

Memória significa aquisição (também chamada de aprendizado ou codificação), formação (também chamada de consolidação), conservação e evocação (também chamada de recuperação ou lembrança) de informações (Izquierdo, 2011). As memórias são classificadas conforme seu conteúdo e de acordo com o tempo que duram. Existem dois tipos de memória de acordo com seu conteúdo: (1) memórias declarativas ou explícitas, são as memórias que registram fatos, eventos ou conhecimento, as quais podem ser, episódicas, referentes a eventos aos quais assistimos ou participamos, ou semânticas, de conhecimentos gerais; e (2) memórias procedurais ou implícitas, são as memórias de capacidades ou habilidades motoras e sensoriais (Izquierdo, 2011). Existem três tipos de memória quanto ao tempo de armazenamento das informações: (1) memória de trabalho ou operacional, é muito breve e fugaz, serve para manter durante alguns segundos, no máximo poucos minutos, a informação que está sendo processada no momento; essa memória é processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal; (2) memória de curta duração, dura entre 1 a 6 horas, esse tipo de memória

requer as mesmas estruturas nervosas que a de longa duração, mas envolve mecanismos próprios e distintos (Izquierdo *et al.*, 1998 e 1999); e (3) memória de longa duração, levam tempo para serem consolidadas; nas primeiras horas após a sua aquisição são lábeis e suscetíveis a interferências (Izquierdo, 1999), essas memórias duram muitos meses ou anos (Izquierdo, 2011).

A codificação é o primeiro passo na criação de uma memória. Envolve a percepção dos sinais sensoriais e seus efeitos posteriores. Imediatamente depois há a consolidação, que consiste na tradução dessas percepções através dos efeitos de transmissão pós-sináptica e potenciais de ação e, a formação da memória (Myskiw e Izquierdo, 2012). A formação de uma memória de longa duração requer entre 3 e 8 horas, e ocorre inicialmente no hipocampo, muitas vezes com a participação concomitante do córtex parietal posterior e entorrinal e o complexo nuclear basolateral da amígdala, e envolve uma ativação em série de muitos sistemas de proteínas quinases hipocampais, estimulação de diversas proteínas celulares incluindo fatores de transcrição nucleares que desencadeiam a transcrição de DNA e síntese de proteínas e, por último, modificações sinápticas. Esses processos integram o que se chama de consolidação celular (Furini *et al.*, 2013). Depois que as memórias são consolidadas na região de CA1 do hipocampo, elas são armazenadas de uma forma duradoura (dias, semanas, anos) em outros locais como o córtex sensorial secundário e algumas regiões pré-frontais e parietais (Furini *et al.*, 2013). Vários estudos recentes têm implicado o hipocampo no armazenamento inicial de memórias "permanentes", em alguns casos através de alterações bioquímicas locais (Bekinschtein *et al.*, 2007; Parfitt *et al.*, 2012).

Os mecanismos da consolidação da memória de longa duração começaram a ser desvendados como consequência da descoberta de um processo eletrofisiológico chamado de potenciação de longa duração (LTP). A LTP consiste no aumento persistente da resposta dos neurônios à breve estimulação repetitiva de um axônio ou um conjunto de axônios que fazem sinapses com elas (Izquierdo, 2011). A sequência dos passos bioquímicos da LTP no hipocampo

são os mesmos que acontecem na consolidação da memória quando estamos acordados. Usando um modelo animal de LTP “in vitro”, pesquisadores mostraram que a consolidação da memória é acompanhado por LTP no hipocampo e esta pode ser impedida se houver prévia saturação desses mecanismos (Gruart *et al.*, 2006; Clarke *et al.*, 2010). A LTP é, de fato, a base da consolidação da memória a nível celular no hipocampo (Furini *et al.*, 2013).

As memórias podem ser modificadas de várias maneiras após a sua consolidação. As duas formas mais conhecidas e mais amplamente estudadas são a extinção e a reconsolidação, que modificam as memórias quantitativamente e, no caso da reconsolidação, às vezes também qualitativamente (Izquierdo, 2011; Fiorenza *et al.*, 2011). A recuperação não reforçada de memórias de longa duração, reativa os traços anteriormente consolidados dessas memórias e os coloca em um estado instável, que podem sofrer dois processos opostos dependente de síntese de proteína: a extinção (Izquierdo, 2011; McGaugh, 2000) e a reconsolidação (Sara, 2000; Izquierdo *et al.*, 2008). A extinção foi originalmente descrita por Pavlov há um século atrás. A reconsolidação tem sido reconhecida há relativamente pouco tempo. Ambos os processos são acionados durante a primeira sessão de recuperação após a consolidação inicial de memórias (Sara, 2000; Nader *et al.*, 2000; Izquierdo *et al.*, 2008). A reconsolidação reafirma memórias que poderiam ser perdidas, e pode permitir a inclusão de informação adicional, o que é comum em sessões de recuperação. A extinção é uma forma de aprendizado, enquanto reconsolidação tem a característica de recuperação, que pode ou não envolver a adição de um novo aprendizado. A reconsolidação não é uma recapitulação ou uma repetição da consolidação: o curso de tempo de ambos os processos é diferente, e, assim, são várias estruturas cerebrais e processos moleculares envolvidos (Sara, 2000; Nader *et al.*, 2000; Izquierdo *et al.*, 2008). O processo de evocação é metabolicamente importante em muitas regiões do cérebro e, em parte, envolve a reativação de sistemas de neurotransmissores e proteínas quinases utilizados na consolidação. Se, por um lado, sua repetição na ausência do reforço tende a levar à extinção, por outro, a simples reativação da memória pode levar a sua

reconsolidação (Izquierdo, 2011). Estudos recentes revelam padrões de ativação complementares durante a recuperação em diferentes pontos no processo de consolidação, de modo que o hipocampo, e não o córtex, é ativado durante a recuperação logo após a aprendizagem, ao passo que o padrão inverso, a ativação cortical e não do hipocampo, é observada quando a consolidação está concluída. Estes resultados baseiam-se na teoria de que o córtex depende de *inputs* de memórias recém estabelecidas no hipocampo para formar uma memória de longo prazo que, em última análise, orienta a lembrança (Eichenbaum, 2006).

Nesse trabalho, nós utilizamos duas tarefas comportamentais que avaliam tipos de memórias diferentes. A esQUIVA inibitória é uma tarefa que utiliza o hipocampo e que se adquire em poucos segundos, como a LTP. Essa tarefa envolve a formação de uma memória declarativa na qual o animal aprende a inibir uma resposta para não receber um estímulo aversivo (Izquierdo, 2011). Já a tarefa de reconhecimento do objeto, avalia memórias não aversivas, é utilizada para acessar a memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido. A memória de longo-prazo pode ser avaliada já que a sessão teste é uma nova situação, que não pode ser antecipada pelos animais. Dessa forma, é requerida uma recordação retrospectiva da memória, o que caracteriza a memória tipo episódica em animais por critério comportamental (Ennaceur & Delacour, 1988).

#### **1.4 Sistema Ubiquitina-Proteassoma**

O UPS (Sistema Ubiquitina-Proteassoma) é a principal via responsável pela degradação extralissossomal de proteínas citosólicas e de proteínas que residem no núcleo e no retículo endoplasmático de células eucarióticas. O UPS degrada principalmente proteínas curtas (menos de 20 aminoácidos) através de um processo de múltiplas etapas. A molécula

marcadora é uma pequena proteína, a ubiquitina, que uma vez ligada covalentemente a proteínas, as envia para a destruição pelo proteassoma 26S, um complexo de multissubunidades de proteases e dependente de ATP (trifosfato de adenosina). O processamento rápido e preciso de uma vasta extensão de proteínas celulares pelo UPS permite um controle preciso das funções celulares críticas como o reparo do DNA, a progressão do ciclo celular, desenvolvimento, apoptose, transcrição gênica, transdução de sinal, senescência, resposta imune, metabolismo e controle de qualidade da proteína (Wong e Cuervo, 2011; Jellinger, 2009; Hegde e Upadhya, 2007).

O mau funcionamento do UPS, o que poderia ocorrer em várias etapas do complexo processo de degradação, resulta em graves alterações celulares e, se persistente, muitas vezes leva à morte celular. Parte da patologia celular é uma consequência direta das funções celulares críticas moduladas por este sistema proteolítico, mas a toxicidade celular em células comprometidas pelo UPS também tem um papel no mecanismo de controle de qualidade da proteína (Wong e Cuervo, 2011).

#### 1.4.1 Ubiquitina

A ubiquitina é uma proteína globular pequena (8,5 kDa), extremamente estável e altamente conservada, de leveduras a mamíferos (Wong e Cuervo, 2011). Ubiquitinas eucariotas compartilham uma sequência idêntica. Embora ausente na maioria dos procariontes, incluindo *Escherichia coli*, a ubiquitina foi identificada em uma eubactéria, a cianobactéria *Anabaena variabilis*. Esta preservação evolutiva da ubiquitina ressalta a importância fundamental do UPS na fisiologia celular básica. A ubiquitina é uma proteína com 76 aminoácidos e pode ser encontrada como um monômero livre no citosol ou ligado covalentemente a si mesma ou a outras proteínas (Mani e Gelmann, 2005).

#### 1.4.2 Conjugação de Ubiquitina

A maioria dos substratos proteicos é direcionada para o proteassoma 26S pela ligação covalente de várias proteínas de ubiquitina em um processo conhecido como ubiquitinação. Na maioria dos casos, a primeira ubiquitina é ligada através de seu resíduo glicina carboxi-terminal para o grupo  $\epsilon$ -amino de um resíduo de lisina no substrato para gerar uma ligação isopeptídica. Nos substratos proteicos sem resíduos de lisina, a ubiquitina pode ser conjugada com o seu terminal amino, formando uma ligação peptídica linear (ubiquitinação amino-terminal). A conjugação de ubiquitina a um substrato é orquestrada pelas ações de três enzimas: E1, E2 e E3 (Wong e Cuervo, 2011).

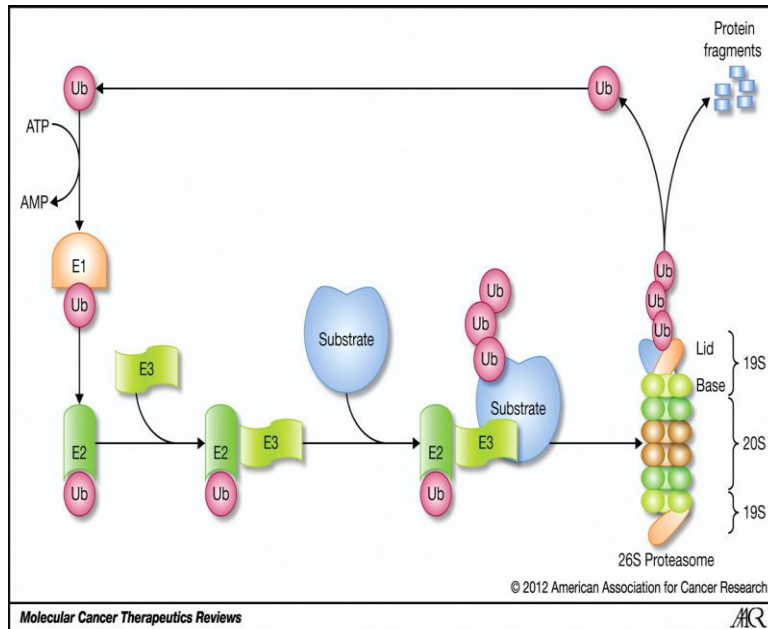
#### 1.4.3 Enzimas E1, E2 e E3

Entre as três classes de enzimas de ubiquitinação, a E1 é a menos fisiologicamente regulada. As enzimas E2 são mais seletivas e interagem com as enzimas E3. A especificidade do substrato na reação de conjugação da ubiquitina é determinada pelas enzimas E3 (Hegde e Upadhyay, 2011).

Conforme mostra a figura 1, a reação começa com a formação de uma ligação tiol-éster entre o resíduo de glicina no carbono terminal da ubiquitina e o resíduo de cisteína ativo da primeira enzima do sistema, a enzima ativadora de ubiquitina, E1. A molécula de ubiquitina é subsequentemente, transferida para o grupo cisteinil da segunda enzima chamada enzima conjugadora de ubiquitina, E2. Por último, através da ação de uma ubiquitina ligase, E3, a ubiquitina e o substrato marcado são unidos através de uma ligação amida (isopeptídica). Esta capacidade da enzima E3 para reconhecer e se ligar tanto no substrato alvo quanto na enzima E2 sugere que, esta enzima fornece especificidade para a reação. Neste ponto, a reação de ubiquitinação pode resultar na adição de uma única molécula de ubiquitina a um alvo único, a

monoubiquitinação. Alternativamente, a ubiquitinação pode resultar na adição de moléculas de ubiquitina a outras lisinas na proteína alvo, dando origem a multiubiquitinação. Após a ubiquitina inicial ser conjugada a um substrato, ele também pode ser conjugado com outra molécula de ubiquitina através de um dos seus sete resíduos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 ou K63). Um vínculo isopeptídico é formado entre a glicina 76 de uma ubiquitina e o grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de um dos sete potenciais resíduos de lisina da ubiquitina anterior, dando origem a diferentes tipos de proteínas poliubiquitinadas. Essas cadeias de poliubiquitina podem variar em comprimento com relação ao número de moléculas de ubiquitina, resultando em diferentes topologias e, em última análise diferentes consequências funcionais (Jadhav e Wooten, 2009; Hegde e Upadhya, 2007).

**Figura 1:** Conjugação de Ubiquitina e Enzimas E1, E2 e E3



A ubiquitina é ativada pela enzima ativadora de ubiquitina (E1) e, em seguida, é transferida para uma enzima de conjugação de ubiquitina (E2). E2 transfere as porções de ubiquitina ativada para o substrato de proteína que está ligado especificamente a uma ubiquitina ligase (E3). A transferência de ubiquitina ocorre diretamente ou através de uma ligação tiol-éster. A conjugação repetida de porções de ubiquitina gera uma corrente de poliubiquitina, que serve como ligação, e como um sinal para a

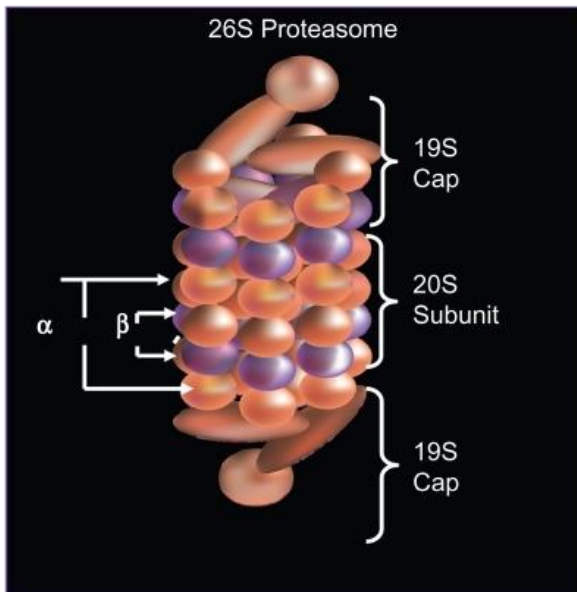
degradação pelo proteassoma 26S. O substrato de proteína é degradado, gerando pequenos peptídeos e ubiquitina livre que pode ser reutilizada (Nader, 2012).

#### 1.4.4 Proteassoma 26S

O proteassoma 26S é um extenso complexo (~2,5MDa) de multisubunidades de proteases, dependente de ATP que consiste em duas partes: o núcleo catalítico (CP) 20S e a partícula reguladora (RP) 19S. A atividade do CP 20S é regulada pela montagem de diferentes RPs que se ligam em um ou ambos os lados do núcleo catalisador para formar várias espécies de proteassoma. O proteassoma 26S (Figura 2), formado pela associação do CP 20S e da RP 19S tem como função regular a qualidade do controle da atividade de degradação. O CP é uma estrutura tipo barril formada por 28 subunidades organizadas em dois anéis  $\alpha$  externos e dois anéis  $\beta$  internos, cada um compreendendo respectivamente, sete anéis  $\alpha$  e sete anéis  $\beta$  estruturalmente semelhantes. Os anéis  $\alpha$  servem como uma porta para entrada do substrato na câmara proteolítica formado pelos anéis  $\beta$ . As subunidades  $\beta$  estão diretamente envolvidas na atividade proteolítica da partícula, sendo que das sete subunidades  $\beta$  que compõem o anel, apenas três são cataliticamente ativas:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$ . As três atividades proteásicas detectadas no complexo são (1) peptidil-glutamil hidrolase, que cliva peptídeos após resíduos de aminoácidos ácidos e a subunidade  $\beta 1$  é responsável pela sua atividade; (2) tripsina, que cliva preferencialmente após resíduos de aminoácidos básicos e a subunidade  $\beta 2$  é responsável pela sua atividade e (3) quimotripsina, que cliva após resíduos hidrofóbicos e a subunidade  $\beta 5$  é responsável pela sua atividade (Yao *et al.*, 2008). A tampa 19S está envolvida no reconhecimento inicial da cadeia de poliubiquitina da proteína alvo. Embora a proteína alvo seja degradada, a cadeia de poliubiquitina geralmente não é (Wong e Cuervo, 2011; Fioravante e Byrne, 2011; Mani e Gelmann, 2005).



Figura 2: Estrutura do Proteassoma 26S



O proteassoma 26S é formado pela associação do núcleo catalítico 20S e pelas subunidades reguladoras 19S em ambas as extremidades (Chari *et al.*, 2010).

### 1.5 Sistema Ubiquitina-Proteassoma, Plasticidade Sináptica e Memória

O UPS está bem colocado para regular a transmissão e plasticidade sinápticas. Componentes do UPS estão localizados próximos das regiões pré e pós-sinápticas. A localização pós-sináptica, em particular, é dinamicamente regulada pela atividade sináptica, pois a estimulação com KCl (cloreto de potássio) ou NMDA (N-metil D-aspartato) induz a uma redistribuição do proteassoma induzida pela CaMKII (quinase dependente de cálcio-calmodulina) em direção às espinhas dendríticas. Além disso, os níveis de várias proteínas sinápticas são regulados pelo UPS, incluindo reguladores pré-sinápticos do ciclo de vesículas sinápticas, proteínas do citoesqueleto e receptores pós-sinápticos. Devido à sua localização subcelular e os seus alvos, o papel do UPS na plasticidade sináptica tem sido estudado extensivamente nos últimos anos (Fioravante e Byrne, 2011).

A formação de LTM (memórias de longa duração) ocorre em etapas, envolvendo aquisição e consolidação. Historicamente, a formação da LTM era sinônimo de aumento da expressão gênica e síntese proteica. Sem dúvida, a transcrição gênica e a tradução são necessárias para a LTM, mas os resultados recentes indicam que a degradação de proteínas pode ser igualmente importante. A degradação de subconjuntos de proteínas pode remover as restrições inibitórias na formação da memória. Juntamente com a síntese proteica, as proteínas de degradação regulam a modulação sináptica e plasticidade, e em última análise, a formação da memória (Fioravante e Byrne, 2011).

A formação de uma LTM depende da reorganização dos contatos sinápticos, um processo que requer expressão gênica e depende de rearranjo de proteínas associadas com a força sináptica. Em vários exemplos, a degradação de proteínas inibitórias pré-existentes é um passo crucial para induzir essas modificações sinápticas. O UPS está envolvido na plasticidade sináptica em modelos animais vertebrados e invertebrados. Diferentes linhas de evidências experimentais mostraram resultados controversos sobre o papel do UPS na consolidação da memória. Por um lado, alguns autores propõem que a degradação de proteínas inibidoras críticas é essencial para a consolidação da memória. Além disso, alguns estudos demonstraram que a inibição do UPS por LAC (lactacistina) e MG-132 (inibidores do proteassoma) bloqueia a formação de LTM em *Aplysia*. De acordo com estes resultados, a inibição do UPS leva a uma falha no fortalecimento sináptico (Merlo e Romano, 2007). Os resultados de Merlo e Romano (2007) indicam que o UPS é necessário para a consolidação da CMS (memória de contexto) no caranguejo *Chasmagnathus*. Em um modelo de invertebrados é mostrado que a injeção do inibidor do UPS, MG-132, prejudica a formação da LTM de maneira dependente do tempo e da dose. O equilíbrio entre os efeitos compartimentados do UPS dentro da célula determina o resultado global da plasticidade sináptica e memória. Um mecanismo provável seria que, dentro dos terminais sinápticos o principal efeito do UPS seria diminuir a ocorrência de fortalecimento sináptico. Em contraste, no núcleo e nas células somáticas a principal função do

UPS é degradar certas proteínas inibidoras que impedem a expressão gênica úteis na formação da memória. O efeito global do UPS na plasticidade sináptica e formação da memória poderia ser determinado pelo equilíbrio do impacto relativo dos componentes compartimentalizados do proteassoma sobre a fisiologia neuronal (Merlo e Romano, 2007).

Em ratos, a infusão bilateral de LAC no hipocampo causou amnésia retrógrada para o teste de aprendizagem de esQUIVA inibitória (Wood *et al.*, 2005). Em *Aplysia*, o sistema ubiquitina tem sido implicado na facilitação de longa duração, e em aumento na força das conexões sinápticas de longa duração entre os neurônios sensoriais e motores. Curiosamente, a PKA (proteína quinase A) permanece ativa durante a memória de longo prazo, mesmo quando os níveis de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) diminuem. Esta ativação constitutiva da PKA parece resultar da degradação da subunidade reguladora da PKA via UPS. Um componente crucial do UPS envolvido na facilitação de longo prazo em *Aplysia* é a Ap-Uch que melhora a atividade do proteassoma por desmontar cadeias poliubiquitinadas depois que um substrato é degradado pelo proteassoma (Wood *et al.*, 2005).

Resultados de Wood e colaboradores (2005) demonstraram que a UCH-L3 (ubiquitina thiolesterase, que em seres humanos é codificada pelo gene *UCHL3*, uma protease que catalisa a remoção de ubiquitina a partir de polipeptídeos) tem um papel no aprendizado espacial e na memória de trabalho. Para ApUch (ubiquitina hidrolase C-terminal: enzima associada com a degradação através do proteassoma) e UBE3A (proteína ubiquitina ligase E3A, que em seres humanos é codificada pelo gene *UBE3A*, enzima envolvida no direcionamento de proteínas para degradação dentro das células), a atividade dessas enzimas no que diz respeito à aprendizagem e memória tem sido atribuída à degradação de substratos proteicos via poliubiquitinação e UPS. Considerando o papel da ApUch e UBE3A na plasticidade sináptica e na LTM, e o papel da UCH-L3 no aprendizado espacial e na memória de trabalho, parece que as

enzimas do UPS podem ser diferentemente envolvidas na regulação de diferentes tipos de memória de armazenamento, dependendo dos seus alvos moleculares.

## 1.6 Sistema Ubiquitina-Proteassoma e Doenças Neurodegenerativas

Primeiramente, a imunoreatividade da ubiquitina foi observada por patologistas no tecido cerebral doente. Nenhum vínculo causal entre a presença de ubiquitina e a doença ficou evidente no momento. Quando o papel da ubiquitina na degradação de proteínas foi descoberto, pensava-se que ela apenas orientava proteínas anormais para a degradação. Durante a década de 90 um papel fisiológico do UPS foi primeiramente estabelecido na progressão do ciclo celular. Isso foi seguido pela descoberta de que a plasticidade sináptica é mediada pelo UPS. Muitos estudos estabeleceram o papel da via da ubiquitina em várias outras funções normais do cérebro, tais como o desenvolvimento de conexões sinápticas. Com o avanço da compreensão do papel normal do UPS em muitas partes do corpo incluindo o cérebro, a ligação entre a degradação de proteínas e anormalidades do cérebro, começam a ser elucidadas (Hegde e Upadhya, 2011).

O UPS é importante no controle de qualidade de danos ou de proteínas malformadas e depende de UBB<sup>+1</sup> (ubiquitina mutante que atua como um forte inibidor do proteassoma *in vivo* e induz ao acúmulo geral de substratos ubiquitinados e a interrupção do ciclo celular) como um elemento de sinalização. As chaperonas estão envolvidas no processo de enovelamento de proteínas com a cooperação do UPS, mas sua função é alterada na doença de Alzheimer. Chaperonas moleculares (hsp70 e hsp40) são a primeira linha de defesa contra proteínas malformadas e agregação de proteínas e, o UPS, a segunda linha de defesa. Entretanto, uma disfunção nesse sistema pode levar ao acúmulo e agregação de proteínas ubiquitinadas. Foi detectada uma diminuição significativa na atividade do proteassoma nas

regiões do hipocampo, para-hipocampal, giro médio-temporal e no lóbulo parietal inferior de pacientes com Alzheimer em comparação com controles (Riederer *et al.*, 2011). O prejuízo na proteólise como uma possível causa da neurodegeneração visto em muitas doenças do sistema nervoso já foi sugerido anteriormente.

O início de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e doença de Parkinson é a presença de imunoreatividade de ubiquitina nas inclusões neuronais tais como corpos de Lewy e NFT. A imunoreatividade da ubiquitina nas inclusões intracelulares resulta do acúmulo de proteínas ubiquitinadas. O acúmulo de proteínas ubiquitina-conjugadas em lesões neuropatológicas foi primeiro detectada em inclusões NFT e, mais tarde, observado em uma gama de doenças neurodegenerativas (Lowe *et al.*, 1988). Apesar de diferentes partes do cérebro serem afetadas em diferentes doenças neurodegenerativas, a presença de proteínas ubiquitinadas na maioria das doenças neurodegenerativas sugere a possibilidade de que essas doenças estejam associadas à incapacidade do neurônio em degradar proteínas específicas ou agregados de proteína acumulada. Os agregados de proteínas ubiquitinadas são resultado do mau funcionamento do UPS ou de alterações nos substratos proteicos que os torna resistentes à degradação (Hegde, 2004; Hegde e Upadhya, 2007; Tai e Schuman, 2008).

Vários estudos relacionam o UPS neuronal na patogênese da doença de Alzheimer. A deposição anormal de agregados de proteínas altamente insolúveis ou corpos de inclusão dentro das células nervosas é comumente observado no tecido nervoso em associação com várias doenças crônico-degenerativas, incluindo doença de Alzheimer (Ciechanover e Brundin, 2003). Estes corpos de inclusão mostram imunorreatividade de ubiquitina em cérebros humanos com doença de Alzheimer junto com imunorreatividade para neurofilamentos, tau, NEDD8, PSEN1 e subunidades do proteassoma (Vrij *et al.*, 2004). Estudos mostram que Lys-63 ligada a cadeias de ubiquitina foi encontrada em inclusões intraneuronais no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (Paine *et al.*, 2009). O acúmulo de proteína conjugada

com ubiquitina em lesões neuropatológicas foi detectado primeiro em NFT isolados de cérebros humanos e estes emaranhados se correlacionam com o grau da demência (Perry *et al.*, 1987; Braak e Braak, 1991). Tem sido sugerido que o UPS pode também desempenhar um papel na mediação dos efeitos da inflamação no cérebro e na formação de NFT (Arnaud *et al.*, 2006). Proteínas agregadas em experimentos de linhagem de células tendem a inibir o UPS (Johnston *et al.*, 1998). O início da agregação de proteínas ubiquinadas pode acontecer por comprometimento da função do proteassoma (Arnaud *et al.*, 2006).

Estudos de Keller e colaboradores (2000) indicam que a atividade do proteassoma é prejudicada no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer. A atividade do proteassoma diminuiu significativamente no giro parahipocampal, no giro temporal superior e médio e no lóbulo parietal inferior, regiões cerebrais que mostram severas alterações degenerativas. Várias modificações pós-translacionais que prejudicam a atividade do proteassoma incluindo a agregação aumentada de substratos do proteassoma e modificação oxidativa direta do complexo proteassoma foram identificados, sugerindo assim, que uma modificação pós-translacional pode ser responsável pela perda de atividade do proteassoma no cérebro em pacientes com doença de Alzheimer. É provável que a perda de atividade do proteassoma ocorra em outras doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade que exibem aumento do dano oxidativo, incluindo a doença de Parkinson e doença de Huntington (Keller *et al.*, 2000).

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS) é uma doença dos neurônios motores. A degeneração destes neurônios provoca atrofia muscular e, eventualmente, prejudica o movimento das pessoas atingidas com a doença. Mutações na SOD1 (enzima superóxido dismutase 1) têm sido associada com alguns casos de ALS familiar autossômica dominante e com alguns casos de ALS esporádica. Vários estudos têm relacionado o UPS ao *turnover* da SOD1. Outros relatam que em mutantes da SOD1 as proteínas são degradadas mais

rapidamente do que pela SOD1 tipo selvagem através do UPS (Hoffman *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 2000).

A Síndrome de Angelman é um distúrbio neurológico com sintomas como retardo mental, comportamento anormalmente feliz, suscetibilidade a ataques epiléticos e marcha anormal (Williams, 2005). Verificou-se que os defeitos ocorrem no gene chamado UBE3A. Mutações pontuais em UBE3A são encontradas em 4 a 6% dos casos (Jiang *et al.*, 1998). UBE3A é um gene maternalmente impresso com expressão específica no cérebro do alelo materno. UBE3A é o gene que codifica uma ubiquitina ligase, a E6-AP ubiquitina ligase (Albrecht *et al.*, 1997). A E6-AP, em associação com E6 degrada a proteína supressora de tumor p53 (Huibregtse *et al.*, 1991). Além de p53, a E6-AP é conhecida por anexar a ubiquitina a pelo menos outros três substratos: RAD23, um homólogo humano da proteína de reparo do DNA de levedura; várias cópias de proteína de manutenção 7 (MCM7), a qual funciona na replicação do cromossomo; e a própria E6-AP (Kumar *et al.*, 1999; Kuhne e Banks, 1998).

Há uma ligação direta entre mutação em uma DUB (enzima deubiquitinada), a USP14, (enzima que, em seres humanos, é codificada pelo gene *USP14*, localiza-se no citoplasma e cliva a ubiquitina a partir de precursores de ubiquitina ligados a proteínas ubiquitinadas) e ataxia. Camundongos com mutações homozigotas recessivas *USP14* desenvolvem ataxia e tremores graves com 2 a 3 semanas de idade, seguida por paralisia dos membros posteriores e morte entre 6 e 10 semanas de idade (Wilson *et al.*, 2002). A mutação reduz severamente a expressão da *USP14* em cerca de 5 a 10% dos níveis encontrados em camundongos selvagens. Acredita-se que a *USP14* recicle a ubiquitina através da desmontagem das cadeias poliubiquitinadas para a forma monomérica da ubiquitina. Assim, os níveis de ubiquitina monomérica são reduzidos no cérebro de camundongos mutantes *USP14* (Anderson *et al.*, 2005).

A insuficiência do UPS contribui para a morte celular ou degeneração em doenças de poliglutaminas. Este processo é provavelmente progressivo. A formação inicial de agregados de proteínas com trechos de poliglutaminas prejudica a atividade do proteassoma que por sua vez leva ao acúmulo de mais agregados proteicos, e assim, proteínas mal dobradas poderiam se construir na célula. Inicialmente, no entanto, é provável que a degradação do proteassoma tenha efeito sobre as propriedades sinápticas do neurônio, porque a atividade do proteassoma em diferentes compartimentos subcelulares do neurônio é essencial para a função sináptica normal e plasticidade (Hegde e Upadhy, 2011).

A doença de Huntington está associada com disfunção neuronal e morte celular, principalmente na região do putâmen caudado (estriado) do cérebro. A doença de Huntington é causada pelo aumento de mutações do número de repetições CAG no éxon 1 do gene huntingtina (IT15), que é expresso na maioria das células do corpo humano. A marca da neuropatologia da doença é a presença de corpos de inclusão nuclear ubiquitina positiva intracelular e de huntingtina mutante. Uma causa potencial da agregação de proteínas anormais é a disfunção ou sobrecarga do UPS, o qual é essencial para a depuração de proteínas de vida curta (duram dias, horas ou segundos), deformadas, mutantes e danificadas em células eucarióticas (Seo *et al.*, 2007). Seo e colaboradores (2007) descobriram que as atividades do proteassoma são inibidas no estriado, córtex frontal, cerebelo e substância negra de cérebro de pacientes com doença de Huntington e também em células como fibroblastos da pele. Também foi encontrado um aumento dos níveis de expressão de ubiquitina, uma diminuição da atividade enzimática do complexo mitocondrial II-III na região do putâmen caudado do cérebro e diminuição do BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) e níveis de proteína em várias regiões cerebrais de pacientes com doença de Huntington. Estes resultados indicam que a disfunção do UPS pode precipitar a patologia crítica dos neurônios vulneráveis de tamanho médio no estriado.



Quatro genes estão associados com a Doença de Parkinson: (1) os genes de  $\alpha$ -sinucleína (são parte dos corpos de Lewy, as inclusões intracelulares presente nos cérebros de pacientes com Parkinson; os corpos de Lewy contêm grandes quantidades de proteínas ubiquitinadas incluindo a  $\alpha$ -sinucleína ubiquitinada), (2) os genes de UCHL1 (enzima da via da ubiquitina, família das peptidases), (3) os genes de DJ-1 (substrato para a conjugação de SUMO-1, uma proteína relacionada com a ubiquitina), e (4) genes de Parkin (proteína que, em seres humanos é codificada pelo gene *PARK2*) (Shinbo *et al.*, 2006). Há também evidências que indicam que a doença de Parkinson pode afetar adversamente a função sináptica. Uma forma recessiva, de início precoce de doença de Parkinson tem sido associada com mutações no gene Parkin. Até o momento, mutações de Parkin parecem ser de perda de função que reduzem a capacidade da Parkin em regular a degradação proteica. Uma mutação de sentido trocado no gene para UCHL1 pode estar ligada a doença de Parkinson típica, de início precoce (Betarbet *et al.*, 2006).

Sendo assim, conforme demonstrado e evidenciado em diversas doenças neurodegenerativas acima descritas, pode-se perceber uma possível relação entre o mau funcionamento do UPS e a atividade prejudicada do proteassoma e a patogênese dessas doenças.

### **1.7 Sistema Ubiquitina-Proteassoma e Ferro**

Os efeitos da administração do ferro no período neonatal e sua relação com as doenças neurodegenerativas têm sido bem documentados. Muitos estudos também têm mostrado o papel da proteólise em doenças do SNC. Porém, poucos estudos investigaram a relação entre esses dois fatores, o UPS e o papel do ferro nas doenças neurodegenerativas.

Zhang e colaboradores (2005) através de seus estudos mostraram que a co-injeção de um inibidor do proteassoma com o quelante de ferro DFO (deferroxamina) protege

significativamente contra a perda de neurônios TH-positivos (neurônios dopaminérgicos) da substância negra induzida pelo inibidor do UPS, a LAC, e dos níveis de dopamina no estriado, e também reduz a formação de agregados de proteínas de corpos de inclusão. Estes resultados sugerem que a neurodegeneração na substância negra induzida pelo inibidor de proteassoma pode ser prevenida com quelante de ferro. A aplicação de um quelante de ferro pode ser uma forma eficaz de reduzir a reatividade do ferro e também para proteger os neurônios dopaminérgicos da falha do UPS induzido por degeneração.

Shamoto-Nagai e colaboradores (2006) estudaram os efeitos do ferro ( $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$ ) sobre o UPS usando células SH-PSV (linhagem de células humanas obtidas do neuroblastoma). Após o cultivo na presença de ferro por 20h, a fluorescência ZsGFP (*Zoanthus* sp. proteína verde fluorescente) em células SH-PSV aumentou de forma dose-dependente.  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  aumentaram o acúmulo de ZsGFP com quase a mesma intensidade, e o DFO suprimiu o aumento na fluorescência ZsGFP. Ácido ascórbico, NAC (N-acetil cisteína), GSH (glutathiona reduzida), galato de epigalocatequina ((-)-EGCG) e  $\alpha$ -tocoferol suprimiram o acúmulo de ZsGFP induzido pelo  $Fe^{2+}$ . Por outro lado,  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  não afetaram a atividade *in vitro* de amostras de proteassoma 20S preparados a partir de células SH-SY5Y. Estes resultados mostraram que o ferro inibe o UPS, mas não é devido à inibição direta das enzimas do proteassoma 20S.

O presente estudo baseou-se na hipótese de que os déficits cognitivos associados com o envelhecimento podem estar relacionados ao acúmulo de ferro no cérebro e ao mau funcionamento do UPS, bem como o envolvimento destes nas doenças neurodegenerativas, plasticidade sináptica e, aprendizado e memória. O proteassoma facilita a degradação de proteínas que é frequentemente alterada em doenças neurodegenerativas, que pode levar a neurodegeneração ao seu maior fator de risco, o envelhecimento.

## 2 OBJETIVOS GERAIS

Esta tese teve como objetivo avaliar o efeito da inibição do UPS sobre a consolidação e a reconsolidação de memória de reconhecimento, visando compreender o papel desempenhado pela degradação proteica pelo UPS na formação da memória. Ainda, foram avaliados os efeitos imediatos e em longo prazo da sobrecarga com ferro no período neonatal sobre o funcionamento e a expressão das subunidades catalíticas do UPS em estruturas cerebrais, buscando entender os mecanismos pelos quais a sobrecarga com ferro leva a prejuízos cognitivos na idade adulta.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Investigar os efeitos da microinfusão intrahipocampal de inibidor do proteassoma em diferentes períodos de tempo (0; 1,5; 3 e 6 horas após o treino), sobre a consolidação da memória no teste de reconhecimento do objeto.

2.2.2 Investigar os efeitos da microinfusão intrahipocampal de inibidor do proteassoma sobre a reconsolidação da memória no teste de reconhecimento de objeto.

2.3.1 Determinar níveis de proteínas poliubiquitinadas através da técnica de western-blot em estruturas cerebrais (hipocampo e córtex) de ratos tratados com ferro do 12° ao 14° dia de vida pós-natal e eutanasiados com 15 ou 90 dias de vida.

2.3.2 Determinar os níveis proteicos das subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  do proteassoma através da técnica de western-blot em estruturas cerebrais (hipocampo e córtex) de ratos tratados com ferro do 12° ao 14° dia de vida pós-natal e eutanasiados com 15 ou 90 dias de vida.

2.3.3 Avaliar a expressão gênica das subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  do proteassoma através da técnica de *real time* PCR em estruturas cerebrais (hipocampo e córtex)

de ratos tratados com ferro do 12º ao 14º dia de vida pós-natal e eutanasiados com 15 ou 90 dias de vida.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Parte I – Artigo 4.2

##### 3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos adquiridos no Centro de Reprodução e Experimentação Animal (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sob cuidado de um médico veterinário. Os animais foram mantidos no ratário da unidade, em grupos de cinco animais por caixa (dimensões de 41x34x17cm), sob condições de temperatura e luz controlados (a  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclo claro-escuro de 12 horas) com água e comida disponíveis *ad libitum*. Os experimentos foram realizados entre as 9:00h e 18:00h. Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com o NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health* (edição revisada em 1996) e as recomendações de acordo com as considerações estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2008) e com a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca, 2008). Todos os esforços foram realizados para diminuir o número de animais utilizados e seu sofrimento.

##### 3.1.2 Tratamento

Foi realizado tratamento com um inibidor do proteassoma, a LAC. A LAC é um antibiótico isolado do *Streptomyces* que ao sofrer hidrólise, se transforma em clasto-lactacistina- $\beta$ -lactona, o inibidor ativo, que irá modificar a treonina do N-terminal do proteassoma 20S, através de uma ligação altamente específica e irreversível. O primeiro grupo recebeu 10 $\mu\text{g}$  de

LAC diluída em 2,5µL de veículo (DMSO 2%) (Rodriguez-Ortiz *et al.*, 2011; Vernon *et al.*, 2011; Vernon *et al.*, 2010; Artinian *et al.*, 2008) e o outro grupo recebeu somente veículo. No hipocampo foi injetado bilateralmente 1µL de volume. Todas as administrações por via intra-hipocampal foram realizadas com o auxílio de uma seringa Hamilton acoplada a uma agulha de infusão que foi inserida pela cânula, atingindo 1mm de profundidade além da cânula. A taxa de infusão não excedeu 1µL (hipocampo) por minuto e após a infusão houve um período de 30 segundos antes da retirada da agulha de infusão para evitar o refluxo da solução.

#### *Procedimentos Cirúrgicos para Implantação de Cânulas:*

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com quetamina (75mg/kg) e xilazina (25mg/kg) e por via subcutânea no local da cirurgia com bupevacaina (0,5mg/kg). Os animais foram implantados bilateralmente com cânulas que permitiam microinfusões da droga na área CA1 do hipocampo dorsal (coordenadas: ântero-posterior: -4,3mm em relação ao bregma; médio-lateral: ±3mm em relação ao bregma e ventral: -2mm em relação à superfície do crânio) como descrito anteriormente em estudos e experimentos piloto (Roesler *et al.*, 2003a; Roesler *et al.*, 2003b; Reolon *et al.*, 2009). As cânulas foram fixadas com auxílio de cimento acrílico autopolimerizante e de pequenos parafusos (1,4mm de diâmetro afixados no crânio). Para analgesia pós-cirúrgica, na recuperação foi utilizado analgésico não opióide por via intramuscular (dipirona sódica 500mg/mL na dose de 20mg), e os animais passaram por um período de recuperação de 7 dias após a cirurgia.

#### 3.1.3 Desenho Experimental

Este estudo teve caráter experimental, no qual foi observado o efeito da micro-infusão intra-hipocampal do inibidor do proteassoma LAC na dose de 10µg diluída em 2,5µL de DMSO

2% em diferentes momentos em relação ao treino na tarefa de reconhecimento do objeto, na consolidação e reconsolidação da memória.

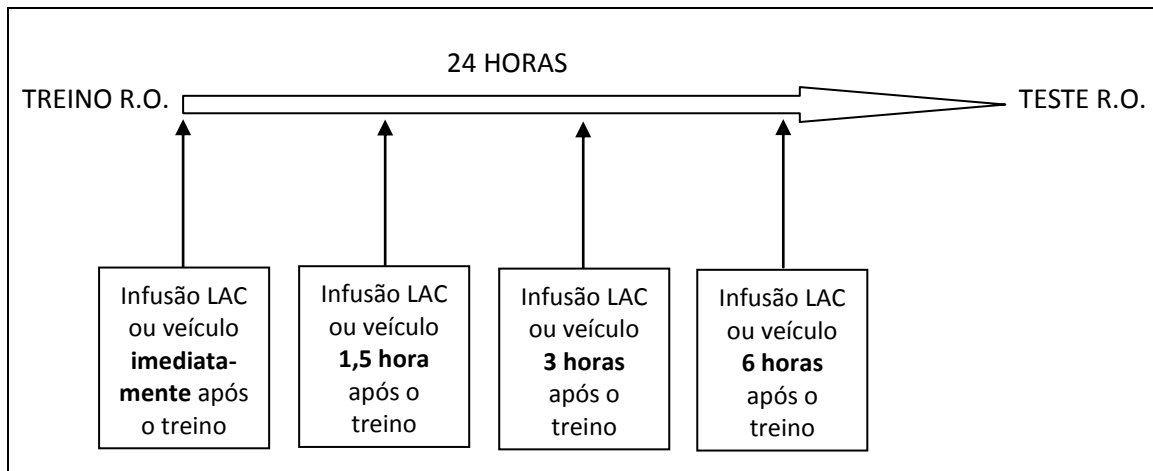
O número de animais utilizados para realização de tarefas comportamentais varia entre 10 a 12 animais por grupo. Entretanto, em função da taxa de acerto da cirurgia estereotáxica de canulação do hipocampo, foi prevista a utilização de 15 ratos por grupo, totalizando 150 animais. Os animais usados nesse estudo foram divididos em dois grandes grupos, conforme o tratamento. O grupo 1 recebeu LAC e o grupo 2, o grupo controle, recebeu veículo, DMSO 2%. Esses se subdividiram em outros 5 grupos, conforme os diferentes tempos que receberam a droga ou o veículo, totalizando 10 grupos.

As microinfusões de veículo ou fármaco foram administradas imediatamente após o treino, 1 hora e meia após o treino, 3 horas após o treino e 6 horas após o treino, uma única vez por animal. Para análise da reconsolidação da memória, 24 horas após o treino, os animais receberam um teste (teste 1) para então receberem o tratamento, o teste 2 foi realizado 24h após (Artinian *et al.*, 2008).

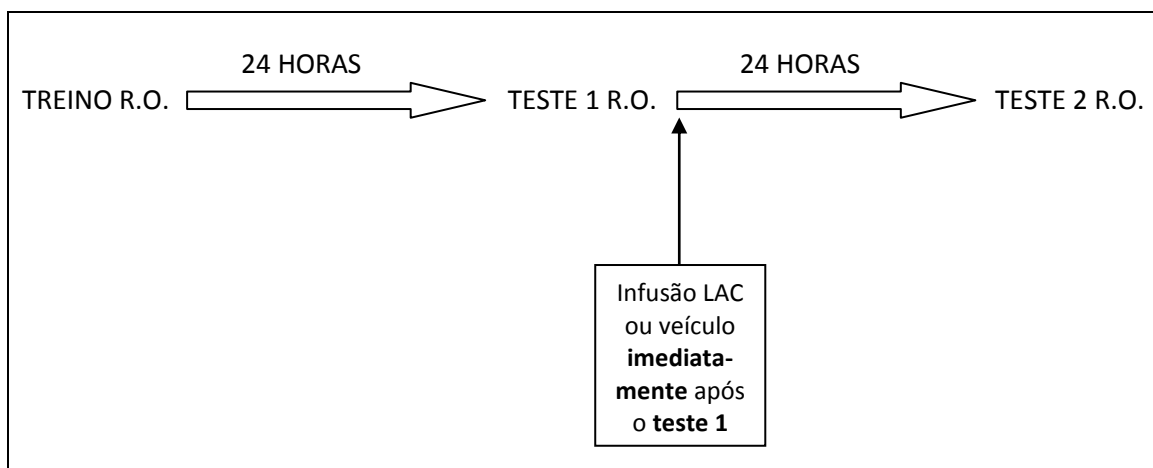
As cirurgias e as tarefas comportamentais foram realizadas na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínica de Porto Alegre (HCPA), sob a orientação do Professor Dr. Rafael Roesler.

Abaixo, esquema do desenho experimental:

### Consolidação



### Reconsolidação



#### 3.1.4 Análise Comportamental

##### *Reconhecimento do Objeto:*

No primeiro dia de execução da tarefa os ratos foram submetidos a uma sessão de habituação ao pesquisador (*handling*), onde cada animal pôde habituar-se ao pesquisador durante um minuto e meio. No dia seguinte, os ratos foram individualmente habituados a uma caixa de campo aberto (caixa de madeira medindo 45 x 40 x 60cm) contendo somente



serragem durante cinco minutos. No terceiro dia, durante a sessão de treino, dois objetos idênticos foram colocados no campo aberto e o animal pôde explorá-los durante cinco minutos. O tempo gasto pelo animal na exploração de cada objeto foi registrado, utilizando-se dois cronômetros. Durante as sessões de teste de retenção de memória de longa duração, realizada vinte e quatro horas após o treino, o rato foi colocado novamente na mesma caixa, onde um dos objetos já familiares utilizado na sessão de treino foi substituído por um objeto novo. Na sessão de teste, o animal pôde explorar a caixa por cinco minutos. Um índice de preferência, a razão entre a quantidade de tempo gasto na exploração de qualquer um dos objetos (na sessão de treino) ou o objeto novo (sessão de teste) sobre o tempo total gasto explorando ambos os objetos, foi utilizado como uma medida de memória de reconhecimento (De Lima *et al.*, 2008).

#### 3.1.5 Análise Histológica

Dois dias após os testes comportamentais, os animais foram infundidos com 1 $\mu$ l de azul de metileno 4% bilateralmente no hipocampo. Quinze minutos após a infusão, foi realizada eutanásia (isoflurano) e posterior decapitação. Os encéfalos foram removidos e armazenados em formol por quatro a sete dias. Com o auxílio de uma lupa foi verificado o posicionamento da cânula. Os dados dos animais cujas cânulas ficaram mal posicionadas foram retirados do experimento.

#### 3.1.6 Análise Estatística

Um índice de reconhecimento foi calculado para cada animal e expresso pela razão  $TB/(TA + TB)$  [TA = tempo gasto pelo animal explorando o objeto familiar A; TB = tempo gasto explorando o novo objeto B]. Os dados foram expressos como média dos índices de

reconhecimento  $\pm$  S.E.M. Comparações dos índices de reconhecimento e do tempo total explorando os objetos foram realizadas utilizando a análise de variância de duas vias (ANOVA), com os grupos (veículo ou LAC) e os tempos de infusão (imediatamente, 1,5, 3 e 6 horas pós-treino) como fatores fixos. Teste de Tukey HSD *post hoc* foi utilizado quando necessário. O Teste t para amostras independentes foi usado para comparar os índices de reconhecimento dos grupos em um determinado tempo de infusão. No experimento de reconsolidação, os índices de reconhecimento e o tempo total explorando ambos objetos no treino, teste 1 e teste 2 foram comparados por ANOVA de medidas repetidas. Em todas as comparações,  $p < 0,05$  foi considerado para indicar significância estatística.

### 3.2 Parte II – Artigo 4.3 (SUBMETIDO)

#### 3.2.1 Animais

Ratas Wistar prenhes foram obtidas do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE/PUCRS), Porto Alegre, Brasil. Cada ninhada foi ajustada em 8 filhotes de ambos os sexos e mantida com sua respectiva mãe em sua caixa de moradia em ambiente climatizado com ciclos claro/escuro de 12 horas, recebendo alimentação comercial e água *ad libitum*. Os filhotes foram desmamados com 21 dias de vida e os machos foram colocados em grupos de 3 a 5 ratos por caixa. No término do experimento, os ratos machos foram eutanasiados por decapitação em guilhotina.

### 3.2.2 Tratamento

Os ratos receberam uma dose oral diária por gavagem (via tubo intra-gástrico) de veículo (salina, grupo controle) ou 30mg/kg de peso corporal de carbonila de ferro (Carbonyl iron, Sigma-Aldrich) entre o 12° e o 14° dia de vida pós-natal (De Lima *et al.*, 2005a; Fagherazzi *et al.*, 2011).

### 3.2.3 Desenho Experimental

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Todos os procedimentos foram realizados seguindo a Lei Arouca (n° 11.794/08), o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institute of Health* (edição revisada em 1996) e as recomendações para utilização de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e também, aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA 12/00306).

Foram utilizados no estudo ratos machos, divididos em dois grupos. Um grupo com ratos que receberam tratamento com ferro no período neonatal, nos 12°, 13° e 14° dias de vida, e outro, que receberam veículo neste mesmo período (grupo controle).

Cada um desses grupos de tratamento (ferro e controle) se subdividiu em dois subgrupos. Um grupo em que os ratos foram eutanasiados com 15 dias de vida (neonatal), e outro grupo em que os ratos foram mantidos até a idade adulta, eutanasiados com 90 dias de idade (adulto). Resultando assim, em quatro grupos: (1) neonatal/veículo, (2) neonatal/ferro, (3) adulto/veículo e (4) adulto/ferro. Todos os animais do grupo adulto foram submetidos a testes comportamentais como parâmetro de controle positivo.

Após os períodos previamente estabelecidos, os animais foram igualmente eutanasiados e o hipocampo e o córtex foram removidos para análises posteriores.

Os animais foram eutanasiados por decapitação e as estruturas encefálicas foram rapidamente dissecadas e armazenadas em freezer à -80°C em solução resfriada com inibidor de protease ou trizol até sua utilização.

#### 3.2.4 Análises Comportamentais

##### *Reconhecimento do Objeto:*

No primeiro dia de execução da tarefa os ratos foram submetidos a uma sessão de habituação ao pesquisador (*handling*), onde cada animal pôde habituar-se ao pesquisador durante um minuto e meio. No dia seguinte, os ratos foram individualmente habituados a uma caixa de campo aberto (caixa de madeira medindo 45 x 40 x 60cm) contendo somente serragem durante cinco minutos. No terceiro dia, durante a sessão de treino, dois objetos idênticos foram colocados no campo aberto e o animal pôde explorá-los durante cinco minutos. O tempo gasto pelo animal na exploração de cada objeto foi registrado, utilizando-se dois cronômetros. Durante as sessões de teste de retenção de memória de longa duração, realizada vinte e quatro horas após o treino, o rato foi colocado novamente na mesma caixa, onde um dos objetos já familiares utilizado na sessão de treino foi substituído por um objeto novo. Na sessão de teste, o animal pôde explorar a caixa por cinco minutos. Um índice de preferência, a razão entre a quantidade de tempo gasto na exploração de qualquer um dos objetos (na sessão de treino) ou o objeto novo (sessão de teste) sobre o tempo total gasto explorando ambos os objetos, foi utilizado como uma medida de memória de reconhecimento (De Lima *et al.*, 2008).

### *Esquiva Inibitória:*

Os animais foram submetidos ao treino e testes de retenção de memória de longa duração na tarefa de esquiva inibitória, um modelo animal de memória motivada emocionalmente de caráter aversivo (Meller *et al.*, 2004). O aparato da esquiva inibitória consiste de uma caixa de acrílico de 50x25x25cm com uma grade de barras de aço paralelas de 1mm de diâmetro. Na sessão de treino, os animais foram colocados na plataforma (com largura de 10cm, localizada junto à parede esquerda da caixa) e sua latência de descida sobre a grade foi medida com a utilização de cronômetros. Quando os animais desceram com suas quatro patas na grade, foram dados 3 choques de 1 segundo, cada choque com intensidade de 0,4 mA. Na sessão de teste de memória de longa duração (realizada 24h após o treino), os animais foram recolocados na plataforma. As latências de descida à grade no treino e no teste foram registradas e usadas como medida de retenção (memória) da tarefa.

### 3.2.5 Análises Moleculares

#### 3.2.5.1 Expressão de Proteínas do UPS – Western Blot

##### *Preparo das amostras:*

As estruturas cerebrais (córtex e hipocampo) foram homogeneizadas com a solução de lise (RIPA, Tris pH 7,5, SDS 0,1%, Triton X-100 1% e ortovanadato pH 5.8) e maceradas. Após, as amostras foram incubadas no gelo por 20 minutos, centrifugadas a 12.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf. A concentração proteica de cada amostra foi determinada através do método de Bradford utilizando-se albumina bovina como padrão (Bradford, 1976).

*Western-Blot:*

Anticorpos das subunidades  $\beta 1$  (20S proteasome  $\beta 1$  subunit, mAb),  $\beta 2$  [20S proteasome  $\beta 2$  (Z) subunit] e  $\beta 5$  [20S proteasome  $\beta 5$  subunit (human), pAb]:

As amostras contendo cada uma, 25 $\mu$ g de proteína foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 10% e subsequentemente transferidas para membranas de nitrocelulose (Perkin Elmer). As membranas foram bloqueadas com albumina (albumina, tween 20 e PBS) por uma hora (subunidades  $\beta 1$  e  $\beta 2$ ) e leite em pó 5% (subunidade  $\beta 5$ ) por uma hora à temperatura ambiente e incubadas com os anticorpos primários das subunidades  $\beta 1$  (1:500),  $\beta 2$  (1:500) e  $\beta 5$  (1:500) do proteassoma (Enzo Life Sciences) *overnight* a 4°C (adaptado de Seo *et al.*, 2007). As membranas foram lavadas 6 vezes por 5 minutos cada com tampão TBST (Tris pH 7.5, 0,1% Tween 20), e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-mouse (1:5000) (subunidades  $\beta 1$  e  $\beta 2$ ) e anti-rabbit (1:1500) (subunidade  $\beta 5$ )(Abcam) sob agitação a 4°C. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas, da mesma forma mencionada anteriormente. As proteínas foram reveladas usando o Kit *Western Lighting Western Blot Chemiluminescence* (Perkin Elmer). A tubulina (1:7000) foi usada para normalização das amostras para as subunidades  $\beta 1$  e  $\beta 5$  e a  $\beta$ -actina (1:1500) foi usada para normalização das amostras da subunidade  $\beta 2$ . As bandas foram visualizadas e quantificadas em um Fotodocumentador para quimioluminescência marca Kodak/Carestream modelo GL2200 (Da Silva *et al.*, 2013, adaptado de Fortin *et al.*, 2001).

Anticorpo antiubiquitina (*Anti-Ubiquitin antibody*):

As amostras de córtex contendo cada uma, 50 $\mu$ g de proteína e, as amostras de hipocampo contendo cada uma 100 $\mu$ g de proteína, foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 10% e subsequentemente transferidas para membranas de nitrocelulose (Perkin Elmer). As membranas foram bloqueadas com albumina (TRIS HCl 50mM pH7.5, NaCl 150 mM, albumina

bovina 2% e tween 20 0,05%) por 30 minutos à temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo primário antiubiquitina (1:500) (Abcam) *overnight* a 4°C (adaptado de Pilchova *et al.*, 2015). As membranas foram lavadas 5 vezes por 8 minutos cada com tampão TBST e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-rabbit (1:1500) (Abcam) sob agitação a 4°C. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas, da mesma forma mencionada anteriormente. As proteínas foram reveladas usando o Kit *Western Lighting Western Blot Chemiluminescence* (Perkin Elmer). A  $\beta$ -actina (1:1500) foi usada para normalização das amostras. As bandas foram visualizadas e quantificadas em um Fotodocumentador para quimioluminescência marca Kodak/Carestream modelo GL2200 (Da Silva *et al.*, 2013, adaptado de Fortin *et al.*, 2001).

#### 3.2.5.2 Expressão Gênica do UPS - *Real-Time* PCR quantitativo

##### *Extração de RNA total:*

Foram obtidas amostras para a realização do PCR *real-time* (RT-qPCR) de córtex cerebral e hipocampo de ratos. As amostras foram armazenadas com Trizol (Invitrogen) e homogeneizadas segundo indicações do produto. O RNA total foi isolado das estruturas cerebrais dos ratos. O tecido congelado foi triturado em gelo seco e uma porção do tecido foi disperso em tampão de desnaturação (solução de tiocianato de guanidina do RNA kit). O RNA total foi extraído usando fenol / clorofórmio e precipitado com isopropanol. O RNA foi então tratado com 10 unidades de DNase I por 20 $\mu$ g como recomendado pelo fabricante dos reagentes DNA-free™ para evitar a amplificação de DNA genômico falso, e posteriormente o RT-PCR foi realizado utilizando-se 2 $\mu$ L de RNA total em 20 $\mu$ L de reação padrão da GeneAmp™ RNA PCR kit.

### *Real-time PCR quantitativo (RT-qPCR):*

O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix* para RT-qPCR (Invitrogen) conforme instruções do produto.

O RT-qPCRs usou SYBR green qPCR supermix-UDG (Invitrogen) e Platinum TaqDNA 0.5U (Invitrogen). Foram usados primers contra as subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  do proteassoma, conforme mostra a tabela 2. Dois genes constitutivos *Gapd* e *Rpl13 $\alpha$*  foram usados para normalização das amostras. As reações foram realizadas em quadruplicatas no equipamento Applied Biosystems 7500 real-time PCR system.

Tabela 2: Sequências *forward* (F) e *reverse* (R) dos primers usados na análise de RT-qPCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Gapd</i> <sup>a</sup>	5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3'	5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3'
<i>Rpl13<math>\alpha</math></i> <sup>a</sup>	5'-ACAAGAAAAAGCGGATGGTG-3'	5'-TTCCGGTAATGGATCTTTGC-3'
$\beta 1$ <sup>b</sup>	5'-CGATTGCTGCAATGCTGTCT-3'	5'-AAGGGAAGAAACGCCGTGA-3'
$\beta 2$ <sup>b</sup>	5'-CCCCACAGCAGCAGCTAATT-3'	5'-CGAAGACAGTCGGCCAGGT-3'
$\beta 5$ <sup>b</sup>	5'-AGCCACGAATCGAAATGCTT-3'	5'-GAACTTGAAGGCCAGGGTG-3'

(Bonfeld *et al.*, 2008 e Yao *et al.*, 2008)

### 3.2.6 Análise estatística

Para a análise dos dados comportamentais, no teste de esquia inibitória, as comparações entre os grupos experimentais foram realizadas usando o teste U de Mann-Whitney. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. N=7 a 13 animais por grupo.



Para a análise dos dados comportamentais, no teste de reconhecimento de objeto, um índice de reconhecimento foi calculado para cada animal e expresso pela razão  $TB/(TA + TB)$  [TA = tempo gasto pelo animal explorando o objeto familiar A; TB = tempo gasto explorando o novo objeto B]. As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas usando o teste U de Mann-Whitney. Os dados foram expressos como média dos índices de reconhecimento  $\pm$  erro padrão. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. N=7 a 13 animais por grupo.

As comparações dos dados das análises moleculares foram realizadas por meio da análise de variância de duas vias (2-way-ANOVA) usando como fatores fixos o tratamento (grupo veículo ou ferro) e a idade (grupo neonatal ou adulto). Para análise da técnica de western-blot, anticorpo antiubiquitina, além da ANOVA de duas vias, foi realizado também, a ANOVA de uma via (1-way-ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey. Em todas as comparações, os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. N=3 a 6 animais por grupo.

## 4 ARTIGOS

### 4.1 Artigo 1

*Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies* (Journal of Alzheimer's Disease 2013;34(4):797-812. DOI:10.3233/JAD-121996)

## Review

---

# Role of Brain Iron Accumulation in Cognitive Dysfunction: Evidence from Animal Models and Human Studies

Nadja Schröder<sup>a,b,\*</sup>, Luciana Silva Figueiredo<sup>a</sup> and Maria Noêmia Martins de Lima<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup>*National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil*

Accepted 7 December 2012

**Abstract.** Over the last decades, studies from our laboratory and other groups using animal models have shown that iron overload, resulting in iron accumulation in the brain, produces significant cognitive deficits. Iron accumulation in the hippocampus and the basal ganglia has been related to impairments in spatial memory, aversive memory, and recognition memory in rodents. These results are corroborated by studies showing that the administration of iron chelators attenuates cognitive deficits in a variety of animal models of cognitive dysfunction, including aging and Alzheimer's disease models. Remarkably, recent human studies using magnetic resonance image techniques have also shown a consistent correlation between cognitive dysfunction and iron deposition, mostly in the hippocampus, cortical areas, and basal ganglia. These findings may have relevant implications in the light of the knowledge that iron accumulates in brain regions of patients suffering from neurodegenerative diseases. A better understanding of the functional consequences of iron dysregulation in aging and neurological diseases may help to identify novel targets for treating memory problems that afflict a growing aging population.

Keywords: Iron, memory, cognitive manifestations, neurodegenerative disorders, neonatal

## INTRODUCTION

Iron is the most abundant metal in the human body. The highest amounts of iron in the body are found in the liver (which is the major iron-storage organ), followed by the brain [1]. This metal is essential for many key biological processes related to the development of the nervous system, including myelination, neurotransmitter synthesis, and mitochondrial energy production [2]. Accordingly, over the last decades, many studies

in humans as well as in animal models have shown that iron deficiency during neurological development leads to permanent cognitive deficits [3, 4].

The biological functions of iron are based on its redox potential, which allows this metal to undergo interconversion between the divalent cationic, or ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ), and trivalent cationic, or ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ), states [5]. The ability to donate and accept electrons in these reactions not only contributes to iron's critical role in physiological processes, but can also lead to significant oxidative damage via free radical production within the brain when excess iron is present [6].

Iron accumulation in brain areas has been implicated in the pathogenesis of several neurodegenerative disorders, including Parkinson's (PD), Alzheimer's (AD),

---

\*Correspondence to: Nadja Schröder, Department of Physiological Sciences, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12D, Sala 340, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203545; Fax: +55 51 33203612; E-mail: nadja.schroder@pucrs.br.

and Huntington's diseases, among others. For example, postmortem studies have shown a selective and significant increase of total levels of iron (expressed as nmol iron/g dry weight of brain tissue) and a reduction in ferritin immunoreactivity in the substantia nigra of patients afflicted with PD [7–11]. In addition, it has been shown that iron-related oxidative stress induces aggregate formation of  $\alpha$ -synuclein *in vitro* [12, 13].

Evidence that patients with neurodegenerative disorders show high brain iron concentrations and the discovery of mutations in genes associated with iron metabolism in the brain suggests that iron dysregulation and iron-induced oxidative stress in the brain play a role in neuronal death associated with brain disorders [14]. Iron catalyzes the formation of highly reactive hydroxyl radicals through the Fenton reaction, and increased lipid peroxidation has been observed in the substantia nigra of patients with PD [8, 15].

Iron is involved in the pathophysiology of AD as suggested by its presence in senile plaques and neurofibrillary tangles in postmortem brains from AD patients [16–19]. Hydroxyl radicals not only affect cell molecules such as membrane lipids, proteins, and nucleic acids but also seem to contribute to amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) aggregation by promoting covalent binding between peptide monomers [20]. The association between A $\beta$  and transition metals may also lead to the generation of hydrogen peroxide, exacerbating the oxidative damage [21–23].

Given the importance of keeping a tight control of cellular iron levels, a number of proteins have been described to play a role in iron uptake, storage, and export, as well as management of intracellular iron distribution. In the blood, ferric iron can be coupled with transferrin (Tf), the main serum iron carrier. Transferrin receptors (TfR) on brain endothelial cells bind iron circulating in the form of iron-transferrin and this complex enters the brain by endocytosis. The expression of TfR and ferritin, the main iron storage protein, is coordinately and reciprocally controlled at the post-transcriptional level in response to the amount of iron. The mRNAs encoding TfR and ferritin contain hairpin structures known as “iron responsive elements” (IREs) in their untranslated regions (UTRs) which are recognized by IRPs, cytoplasmatic iron regulatory proteins. These proteins sense the iron concentration and modify the expression of TfR and ferritin by interacting with IREs according to the needs of each cell [24]. Evidence suggests that alterations in proteins involved in maintaining iron homeostasis might play a role in the degenerating brain. Tf was shown to be homogeneously distributed within senile plaques and

ferritin expressed within reactive microglial cells that are present both in and around the senile plaques [17]. A novel link between iron metabolism and AD pathogenesis has been proposed since the discovery of the presence of an IRE in the 5'UTR of the amyloid- $\beta$  protein precursor (A $\beta$ PP) transcript [25]. A recent study reported that A $\beta$ PP is a ferroxidase that couples with ferroportin to export iron, and in AD brains, A $\beta$ PP ferroxidase activity appears inhibited, thereby causing neuronal iron accumulation [26]. Heme oxygenases (HOs), the family of enzymes responsible for catalyzing the degradation of cellular heme, have also been suggested to be involved in brain aging and neurodegeneration. HO-1 has been shown to be over-expressed in the cerebral cortex and hippocampus, co-localizing with senile plaques in AD; and in the substantia nigra, particularly in Lewy bodies, in PD. It has been suggested that HO upregulation contributes to pathological iron deposition and energetic failure reported in AD and PD [27].

Neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) includes a set of heterogeneous hereditary conditions resulting from mutations that either have direct impact on the structure and function of proteins related to iron homeostasis (such as L-ferritin in neuroferritinopathy), or in which the link between the mutations leading to protein abnormalities and the development of NBIA remains unclear (such as in Pantothenate-kinase 2-associated neurodegeneration, PKAN). NBIA features progressive neurodegeneration with prominent deposition of iron in the brain. Clinical manifestations of NBIA may vary substantially along the course of the disease progression, and mostly include extrapyramidal and/or cerebellar signs and corresponding iron deposition in the basal ganglia and cerebellum (for a review, see [28]).

Evidence indicates that cognitive functions may be compromised in patients suffering from NBIA. For instance, problems with executive functioning, attention, spatial and verbal learning, memory, judgment, and persistence have been reported in PKAN. A study evaluating intellectual and adaptive behavior in PKAN patients, measured by standardized evaluation tools, indicated that general intellectual skills ranged from high average to markedly below average, and that there is an association between age of onset and severity of cognitive impairment [29]. Cognitive impairment have also been reported in patients suffering from loss of function mutations in calcium independent phospholipase A2 (PLA2G6) leading to PLA2G6-associated neurodegeneration, and in Kufor-Rakeb syndrome, which results from muta-

tions in the ATP13A2 gene, which codes for a putative lysosomal P-type transmembrane cation-transporting ATPase [30]. Remarkably, the main clinical features of neuroferritinopathy include extrapyramidal signs, such as chorea, focal dystonia, and parkinsonism, with intact cognitive functions until very late stages of the disease [31].

Taken together, these findings provide evidence that disruption of iron homeostasis, leading to its accumulation in brain regions, may be implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. However, the functional consequences of iron accumulation have only recently started to become unraveled. The effects of iron overload on cognitive functioning have been studied using animal models. Also, it has been demonstrated that iron loading exacerbates cognitive deficits observed in aging animals [32] as well as in animal models of AD [33, 34]. In humans, imaging studies have indicated that iron accumulation in brain areas is correlated with poorer performance in cognitive tests.

Studies evaluating the effects of orally administered iron on different endpoints of neurological deficits and neurodegeneration are warranted to establish the possible relationship between iron supplementation in the childhood and neurological diseases. Recently, a 10-year follow-up of a randomized controlled trial compared the long-term effects of two formulae containing different levels of iron (iron-fortified or low-iron) administered to healthy full term infants from Chilean urban areas. Subjects with higher hemoglobin levels at 6 months of age that were in the iron-fortified group, scored lower on all 10-year cognitive parameters measured, which included spatial memory and visuo-motor integration, arithmetic achievement, visual perception, and motor coordination [35]. These results strongly suggest that more studies to determine the risks and benefits of iron supplementation during development in humans are warranted. In this review, we will focus on the disruptive consequences of brain iron accumulation on memory function.

### IRON LOADING AS AN ANIMAL MODEL OF MEMORY DYSFUNCTION

The neonatal period is critical for the establishment of iron content and regional distribution in the adult brain [1]. Investigations have indicated that both iron transport and transferrin binding sites are maximal during the postnatal period of rapid brain growth, having a peak about the day 15 postpartum [36]. Additionally, Dwork and coworkers [37] showed that once iron is

absorbed by the brain during this period of development, it is retained in the brain without being returned to plasma. Based on these findings, we established an animal model of brain iron loading in the neonatal period, in which iron is given orally to rats or mice during the period of maximal uptake by the brain. Initially, we investigated the long-term effects of neonatal iron exposure on spatial memory in mice. NMRI mice received orally 0.0, 3.7, or 37.0 mg of  $\text{Fe}^{2+}$ /kg of body weight on postnatal days 10–12 and radial arm maze learning was tested when mice reached the age of 3 months. We found that the mice treated with the higher dose of  $\text{Fe}^{2+}$  (37.0 mg/kg) showed more errors in arm choices and longer latencies to acquire all eight pellets. Analysis of brain total iron content using atomic absorption spectroscopy indicated significantly increased levels (microgram/g) in the basal ganglia, but not in the frontal cortex, of mice in the higher dose group. This finding provided the first evidence that iron exposure during a specific period of the neonatal life was able to impair memory formation [38]. A lower dose (7.5 mg/kg) of iron administered at post-natal days 10–12, and to a lesser extent at days 3–5, caused similar deficits [39]. These results were also confirmed in rats receiving a wider range of iron doses (2.5, 7.5, 15.0, or 30.0 mg/kg). All four dose groups demonstrated deficits in acquisition performance from test days 3 to 5, in the radial arm maze. As previously found in mice, analysis of total iron content by atomic absorption spectroscopy indicated a dose-related increase in the substantia nigra of the 7.5, 15.0, and 30.0 mg/kg dose groups, but not in the 2.5 mg/kg dose group [40].

Although it is known that the neonatal period represents the more susceptible period for iron entering the brain, a study has shown that even a low dose (3.0 mg/kg) of ferrous sulfate administered to adult rats for 5 consecutive days significantly impaired spatial memory, tested using the Morris water maze. Interestingly, motor skills and procedural memory were not affected. Memory impairment was associated with increased total iron levels in the hippocampus and basal ganglia, assessed by atomic absorption spectrophotometry [41].

The effects of neonatal iron exposure on retention of inhibitory avoidance, a type of single-trial aversively motivated conditioning, were also evaluated. Inhibitory avoidance retention was blocked in rats administered 7.5 and 22.5 mg  $\text{Fe}^{2+}$ /kg (Fig. 1A), suggesting that postnatal iron administration induces long-lasting detrimental effects upon performance of negatively reinforced tests of memory [40].

Subsequently, the effects of iron treatment on object recognition, a non-spatial, non-aversive type of memory, were investigated. Male rats that received iron at postnatal days 5–7, 12–14, 19–21, or 30–32 showed impairments in long-term retention of object recognition memory, although only the group given iron from postnatal days 12 to 14 showed a complete memory blockade. In our early mouse studies, we have shown that iron-induced spatial memory impairment was more pronounced when iron was administered at postnatal days 10 to 12. In this study, recognition memory was impaired in all iron treated groups, suggesting that somehow the neural mechanisms involved in recognition memory formation are more susceptible to iron effects than those involved in spatial memory [42]. Interestingly, higher doses of iron, ranging from 15.0 to 75.0 mg/kg, produce similar results on recognition memory (Fig. 1B).

In previous studies we had demonstrated that aged rats present long-, but not short-term, recognition memory deficits when compared to young adult animals [43–45]. Interestingly, aged rats that received iron in the neonatal period showed a poorer performance in the short-term memory retention test when compared to rats that received vehicle in the neonatal period, in addition to the already expected impairment in the long-term retention test, suggesting that iron loading potentiates the naturally occurring age-associated memory impairment [32].

Another study was aimed to investigate the potential harmful synergistic effects of iron in an AD experimental model. Iron treatment ( $\text{FeCl}_3$ , 10 mg/mL in the drinking water, for 90 days) was shown to potentiate spatial memory deficits in  $\text{A}\beta\text{PP}$  and presenilin (PS1) double-transgenic mice. Although iron treatment induced increases in  $\text{A}\beta$  plaque distribution, and  $\text{A}\beta\text{PP}$  levels in the cortex and hippocampus, the concentration of total iron in the whole brain, measured by atomic absorption spectrophotometry, was not significantly different among groups [33]. One possible explanation for this finding might be that iron is differentially distributed across brain regions, and, based on previous studies, it is known that it accumulates selectively at some sites. Thus, these regional differences may not be evidenced by using the whole brain. The effects of increased iron supplementation in the drinking water, available to animals from 3 to 14 months of age, were also investigated in Tg2576 mice. Iron-treated Tg2576 mice performed poorer than controls in the Morris water maze. Brain iron concentrations were not measured in this study [34].

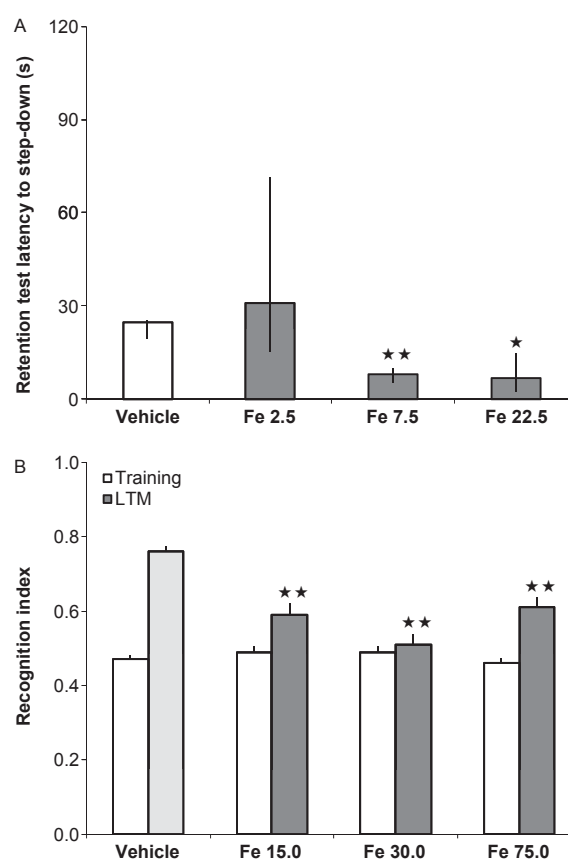


Fig. 1. Iron-induced memory deficits in rats. A) Retention of a step-down inhibitory avoidance task in 3-month-old Wistar rats treated neonatally with iron. Animals were treated orally with 0.0 (vehicle), 2.5, 7.5, or 22.5 mg  $\text{Fe}^{2+}$  per kg of body weight on postnatal days 10–12. Data are shown as median ( $\pm$ interquartile ranges) of the retention test latencies. Animals were trained in inhibitory avoidance and tested for retention 24 h after training. There was a significant difference in retention test performance among groups (Kruskal-Wallis analysis of variance,  $p=0.001$ );  $\star p<0.05$  and  $\star\star p<0.01$  compared with vehicle group, Mann-Whitney U-test (Adapted from [40]). B) Effect of neonatal iron treatment on object recognition memory. Animals were treated orally with 0.0 (vehicle), 15.0, 30.0, or 75.0 mg  $\text{Fe}^{2+}$  per kg of body weight on postnatal days 12–14. Behavioral testing was carried out when animals reached 3 months of age. Long-term memory (LTM) retention test was performed 24 h after training, as described in [63, 67]. The proportion of the total exploration time that the animal spent exploring the novel object was the “Recognition index” expressed by the ratio  $\text{TN}/(\text{TF}+\text{TN})$ , TF = time spent exploring the familiar object and TN = time spent exploring the novel object. Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. recognition index. There was a significant difference in retention test performance among groups (Kruskal-Wallis analysis of variance,  $p<0.0001$ ). Differences between vehicle versus iron-treated groups are indicated as:  $\star\star p<0.0001$ , Mann-Whitney U-test. Experimental procedures were performed in accordance 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 10/00143).

Table 1  
Iron-induced memory impairments in animal models

Species	Treatment (iron salt, effective dose, administration route, period of life)	Memory type (memory task)	References
Adult NMRI mice	Iron succinate, 37.0 mg/kg p.o., postnatal days 10–12	Spatial memory (Radial 8-arm maze)	38
Adult NMRI mice	Iron succinate, 7.5 mg/kg p.o., postnatal days 3–5 or 10–12	Spatial memory (Radial 8-arm maze)	39
Adult Wistar rats	Iron succinate, 2.5, 7.5, 15.0, and 30 mg/kg p.o., postnatal days 10–12	Spatial memory (Radial 8-arm maze)	40
Adult Wistar rats	Iron succinate, 7.5, and 22.5 mg/kg p.o., postnatal days 10–12	Aversive memory (Inhibitory avoidance)	40
Adult Wistar rats	FeSO <sub>4</sub> , 1.5, and 3.0 mg/kg i.p., adulthood	Spatial memory (Morris water maze)	41
Adult Wistar rats	Iron succinate, 10 mg/kg p.o., postnatal days 5–7, 12–14, 19–21 or 30–32	Recognition memory (Object recognition task)	42
Adult Wistar rats	Iron succinate, 10 mg/kg p.o., postnatal days 12–14	Recognition memory (Object recognition task)	45, 49, 53, 69
Adult Wistar rats	Iron carbonyl, 30 mg/kg p.o., postnatal days 12–14	Recognition memory (Object recognition task)	63, 67
Adult Wistar rats	Iron carbonyl, 30 mg/kg p.o., postnatal days 12–14	Aversive memory (Inhibitory avoidance)	67
Aged Wistar rats	Iron succinate, 10 mg/kg postnatal days 12–14	Potentialiation of age-associated recognition memory deficits (Object recognition task)	32
A $\beta$ PP/PS1 double-transgenic mice	FeCl <sub>3</sub> , 10 mg/ml in the drinking water, 6-month old mice, for 3 months	Potentialiation of spatial memory deficits (Morris water maze)	33
Tg2576 mice	FeNO <sub>3</sub> , 10 ppm in the drinking water, 3-month old mice, for 11 months	Potentialiation of spatial memory deficits (Morris water maze)	34

Taken together, the results from animal models show that iron overload induces memory deficits in a variety of learning and memory paradigms, which are designed to test memory types known to rely on distinct memory systems. We and others have shown that iron supplementation at different phases of rodents' lives impairs spatial memory [33, 34, 38–41], recognition memory [42, 45], and aversive memory [40], types of memories known to depend on hippocampal-cortical circuitry [46, 47]. It is noteworthy that one study reported that procedural memory, which is known to depend mainly on basal ganglia structures [48], was not affected [41], suggesting that the deleterious effects of iron on cognition are mainly related to forms of declarative memories. Interestingly, most of the studies have shown that iron content is increased in both hippocampus and basal ganglia structures (such as substantia nigra). More studies are warranted in order to confirm this selective effect of iron accumulation on the hippocampal-cortical system.

Table 1 summarizes studies describing iron-induced cognitive deficits in animal models.

## REVERSAL OF IRON-INDUCED MEMORY DEFICITS

Taken together, the findings described above have indicated that young adult and aged rats treated with

iron for three days during the neonatal period show consistent and reproducible neurofunctional deficits. We then decided to validate the use of this animal model as a tool to investigate the effects of drugs on protecting/reversing iron-associated memory impairments.

Selegiline, a monoamine oxidase inhibitor known to exhibit neuroprotective properties, was administered chronically to iron-treated rats at two different periods, either starting 24 hours before the first iron dosing, or when rats reached adulthood. Iron-treated rats given selegiline showed no deficits in recognition memory [49].

Cholinergic pathways are intimately involved in cognitive functions, such as learning and memory, and disruption of this system produces impairments in many learning and memory models [50]. The loss of cholinergic pathways, a hallmark of aging and AD, is demonstrated by decreased acetylcholinesterase (AChE) activity, which is related to impaired cognitive function [51, 52]. Thus, we examined the effects of a single injection of the AChE inhibitor galantamine, or the muscarinic receptor agonist oxotremorine, on iron-induced memory deficits in rats. The iron-induced long-term recognition memory impairment was reversed by systemic administration of galantamine immediately after training. In addition, iron-treated rats that received oxotremorine showed

enhanced memory retention. Rats given iron showed decreased AChE activity in the striatum, but not in the hippocampus or cortex, when compared to controls. Recognition memory has been suggested to be a hippocampus-dependent task, thus, it is possible that increased cholinergic neural transmission achieved in the hippocampal-cortical system may account for systemic galantamine-induced amelioration of memory in iron-treated rats [53].

We have also shown that a single systemic administration of rolipram, an inhibitor of the phosphodiesterase type 4 isoform (an enzyme that catalyzes hydrolysis of cAMP) attenuates recognition memory deficits associated with brain iron accumulation or aging in rats [45]. The cAMP/protein kinase A/cAMP regulatory element-binding protein (cAMP/PKA/CREB) signaling pathway is crucially involved in synaptic plasticity and memory consolidation [54–58], and drugs that increase cAMP levels are proposed as potential cognitive enhancers for the treatment of patients with memory dysfunction [59].

Observational studies have indicated that drugs that reduce cholesterol synthesis may reduce the risk of dementia and AD [60]. We found that chronic administration of rosuvastatin, a drug of the class of statins, reversed the age-associated long-term memory impairment as well as the short-term memory impairment produced by the combination of neonatal iron treatment and aging [32].

Cannabidiol, the main non-psychoactive constituent of *Cannabis sativa*, possesses a large number of pharmacological effects including neuroprotective properties, likely related to its antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties [61, 62]. In a recent study, we showed that acute or chronic treatment with cannabidiol was able to recover recognition memory in iron-treated rats [63].

Accumulating evidence indicates that chromatin remodeling through histone acetylation is a key epigenetic mechanism regulating gene transcription during memory formation. Histone deacetylases (HDACs) induce chromatin condensation and repress gene transcription. Memory formation has been associated with histone modifications including increased acetylation of H3 and H4 lysine residues [64, 65] whereas reduced H4K12 acetylation has been associated with memory impairment in aged mice [66]. Thus, we examined histone acetylation in the dorsal hippocampus and the effects of post-training systemic administration of sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor (HDACi), on the formation of object recognition memory and inhibitory avoidance in the neonatal iron

overload model in rats [67]. Sodium butyrate was able to completely reverse iron-induced recognition memory and inhibitory avoidance deficits. In addition, we found a reduction in H3K9 acetylation in the dorsal hippocampus of rats given neonatal iron. These findings suggest that brain iron overload might be related to alterations in chromatin plasticity and that a reduction in H3K9 acetylation might play a role in iron-induced memory impairment, supporting the view that HDACi can rescue memory dysfunction in models of brain disorders [67].

In summary, from the studies described above we can conclude that drugs that potentially exert neuroprotective effects, through diverse mechanisms, administered chronically, as well as drugs given acutely and known to enhance molecular mechanisms associated with cognitive processes, such as memory consolidation, may represent valid approaches to treat memory decline associated with iron accumulation.

#### **IRON CHELATION AS A POTENTIAL THERAPY FOR TREATING MEMORY DEFICITS**

In an early study published in 1996, Long and coworkers showed that intraperitoneal administration of the iron chelating agent deferoxamine produces a significant improvement in spatial memory, tested in the Morris water maze, in rats submitted to traumatic brain injury. The authors suggest that these beneficial effects of iron chelation could be related to protection against oxidative stress [68]. Since we had shown that iron, when administered in the neonatal period, leads to persistent cognitive deficits as well as oxidative stress in adulthood, we decided to verify whether deferoxamine could reverse those deficits when administered later in life. Rats treated neonatally with iron were divided in three experimental groups receiving intraperitoneal injections of deferoxamine (0.0, 30.0 or 300.0 mg/kg). Iron-treated rats that received the highest dose of deferoxamine showed normal recognition memory, indicating that iron chelation therapy in adulthood was able to reverse the cognitive impairment induced by neonatal iron loading in rats [69]. We have also shown that iron chelation with deferoxamine could reverse age-induced recognition memory deficits and decrease oxidative damage to proteins in cortex and hippocampus of aged rats [44]. In agreement with those findings, a recent study by Kupersmidt and coworkers showed that the chronic treatment with the iron chelator M30 significantly improved both short- and



long-term retention for the object recognition memory and reduced cerebral iron staining by Perl's histochemistry in cortical and hippocampal regions of aged mice [70].

The therapeutic potential of iron chelators were also tested in animal models of AD. For instance, M30 was also shown to improve memory in A $\beta$ PP/PS1 double-transgenic AD mice. Results have shown that M30, administered for 9 months, significantly ameliorated cognitive impairments, which included spatial learning and memory, and working memory. Besides inducing functional recovery, the compound was also proven to induce a significant reduction in several AD markers, including A $\beta$ PP levels, A $\beta$  levels and plaques, phospho-A $\beta$ PP, and phospho-tau. M30 significantly reduced iron staining by Perl's histochemistry in striatum, hippocampus, and cortex of A $\beta$ PP/PS1 mice [71].

Intranasal administration of deferoxamine was also shown to reverse iron-induced increases in A $\beta$  plaque distribution, and A $\beta$ PP levels in the cortex and hippocampus, as well as memory deficits in A $\beta$ PP/PS1 double-transgenic mice [33]. Fine and coworkers [72] have also shown that intranasal deferoxamine improves performance in the radial arm water maze in P310L tau transgenic mice.

In a clinical trial, performed in the 1990s, twice daily intramuscular injections of deferoxamine significantly reduced the rate of decline of daily living skills in patients with AD [73]. Recently, a six-month treatment with deferiprone, an orally active iron chelator able to cross the blood-brain barrier, was shown to reduce iron accumulation in the dentate nuclei of the cerebellum and to improve some neurological functions, such as manipulative dexterity and fluency of speech, in patients with Friedreich ataxia [74].

It is known that the route of administration and the blood-brain barrier, together with adverse side effects, represent major limitations to potential agents in the treatment of neurodegenerative disorders. However, metal chelation therapy may provide a potential therapeutic for treating and perhaps preventing cognitive deficits observed in neurodegenerative disorders and aging. Therefore, the search of chelating compounds that are able to readily cross the blood brain barrier is warranted.

Although animal models may be useful in the investigation of basic mechanisms related to iron dysregulation that may underlie the pathogenesis of neurodegenerative disorders, as well as in the search of novel therapeutic targets, there are several limitations for the translation of the findings to humans. For instance, it is well established that women have lower

systemic iron stores than men [75] and a study by Bartzokis and coworkers [76] have shown that women have lower ferritin iron in brain regions such as caudate, thalamus, and three white matter regions (frontal lobe, genu, and splenium of the corpus callosum) than men, measured *in vivo* with magnetic resonance imaging (MRI) by utilizing the field-dependent R2 increase (FDRI method, see the following section). A recent study observed significant gender differences in iron levels in BALB/c and DBA/2J mouse strains. Males had as much as 2- to 3-fold more brain, retinal pigment epithelium/choroid, and retinal iron while females had as much as 2- to 3-fold more liver iron [77]. Interestingly, Thulluri and coworkers [78], using Fischer 344/NNiaHSD x Brown Norway/BiNia (F344BN) rats, demonstrated that the expression of HO-1, ferritin-H, and IRP1 mRNAs is higher in the female hippocampus than that observed in male, regardless of age group.

Additionally, two highly prevalent gene variants involved in iron metabolism (hemochromatosis H63D, HFE H63D, and transferrin C2, TfC2) are associated with higher brain iron levels in healthy older men [79], and with higher risk of developing AD [80, 81]. Recently, studies have shown the genetic association of PICALM (phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) polymorphisms with late onset AD [82, 83]. PICALM has been shown to be critically involved in TfR internalization, playing a key role in iron homeostasis [84]. Those genetic variants have not been observed in rodent models. The diverse profile of gender- and age-related differences as well as genetics influencing iron regulation across species may contribute for the limitations of preclinical models of neurodegenerative disorders and may account, at least in part, for the high failure rate in clinical trials of drugs successfully used in animal models.

## CORRELATION BETWEEN COGNITIVE FUNCTIONS AND IRON STATUS: INSIGHT FROM HUMAN STUDIES

Over the last two decades there has been an increasing interest in assessing iron concentrations in the human brain *in vivo*. Different MRI methods of iron estimation have been employed, although no consensus on the best method has been reached so far. Due to its paramagnetic properties, brain iron can be measured through the effect of iron on transverse relaxation rates (R2), which is defined as the reciprocal of the proton transverse relaxation time, T2 ( $R2 = 1/T2$ ). Using

FDRI, that is the difference in measures of brain R2 obtained with two different field-strength MRI instruments, it is possible to obtain specific measures of the total iron contained in ferritin molecules (ferritin iron). The FDRI method has been validated, as mean FDRI measures from normal adults were correlated with brain iron levels reported by Hallgren and Sourander. High FDRI indexes indicate greater concentrations of ferritin iron [76]. Another technique is based on phase-shift imaging, which is known to be affected by tissue iron [85]. More recently, it has been proposed that local iron influences MR gradient-echo image phase, which is the basis for another method for iron quantification, Susceptibility-Weighted Imaging (SWI). A recent study by Bilgic and coworkers [86] compared SWI data, using two different choices of regularization, with FDRI. Results from all three methods consistently identified higher iron concentrations in striatum and basal ganglia of healthy elderly compared to a young adult group. It has been recognized that there is some degree of variability in sensitivity and specificity among the different methods [87]. Nonetheless, data from most of the studies, using different techniques, present correlation with histochemical measurements of iron in postmortem brains, obtained by Hallgren and Sourander [88, 89], which has been viewed as the gold standard methodology for iron levels determination in the brain.

A variety of techniques has been used to determine brain iron levels in postmortem tissue. These can be divided in methods involving the tissue digestion and bulk analysis of iron content, such as flame atomic absorption spectroscopy, inductively coupled plasma-mass spectrometry, and optical emission spectroscopy, and *in situ* analysis using histochemical methods. Considering that: (i) iron is involved in many biological functions, (ii) is highly prevalent in the environment, and (iii) the concentration of total iron in the brain ranges from 1 to 100  $\mu\text{g/g}$  of wet weight, according to the neuroanatomical region, some caution may be taken in measuring brain iron levels. Sample collection, storage conditions, and preparation steps of the samples must be considered when preparing postmortem tissue for brain iron determination, in order to minimize environmental contamination or iron leaching from the tissue. Selection of appropriate age-matched controls and exposure of samples to stable and similar storage conditions may compensate for contaminations and false elevation of iron levels. Interpretation of data may also require some caution, considering the technique utilized. Changes in iron cellular compartmentalization and regional distribution,

as well as in oxidation state, may occur during the storage period (reviewed in [90]).

Over the last decades, MRI has been used to investigate the relationship between brain iron levels and cognitive parameters in living individuals. A pioneer study from 1992, using iron-related signal loss on T2-weighted images, was designed to evaluate the relationship between age and iron deposition in the basal ganglia of healthy subjects, in a group whose age ranged from 8 months to 78 years. In a second group of healthy subjects, the authors sought to investigate a possible correlation between iron content in the globus pallidus and red nucleus and performance in motor skills and cognitive tasks. Results showed no association between iron content, expressed as calculated T<sub>2</sub> and corrected-signal intensity, and simple motor performance. Unexpectedly, they found a strong correlation between signal intensity, where signal loss is related to high iron concentration, and performance in incidental learning, evaluated by errors in the estimation of frequency on retrieval of previously presented words and in a dual task, the tapping-while-reading task [91].

Several years later, House and coworkers [92] performed a study aiming to evaluate changes in iron concentration in brain regions measuring R2 values in elderly participants with mild to severe cognitive impairment compared to healthy controls. Results showed that R2 values were higher in the temporal cortex gray matter in the group of participants with memory complaints, compared to subjects with no cognitive impairment. These results suggest that iron is increased in the temporal region of memory impaired subjects. The study also showed that there was a strong correlation between R2 values of control subjects and the results of iron concentrations reported by Hallgren and Sourander [88]. Another study showed that normalized T2 intensity was lower in caudate, globus pallidus, putamen, and thalamus gray matter, in multiple sclerosis patients compared to healthy controls. T2 hypointensity in the globus pallidus displayed a strong correlation with cognitive impairment in a neuropsychological composite score, which encompassed new learning, attention, working memory, spatial processing and executive function, after adjusting for the effect of MRI lesion and atrophy measures in patients with multiple sclerosis [93].

Recently, it was found that lower scores on the Dementia Rating Scale and longer reaction times on a two-choice attention test correlated with higher FDRI in the caudate nucleus and putamen in healthy, elderly individuals [94]. In 2011, Bartzokis and coworkers [95]

examined whether cognitive performance assessed by verbal memory, working memory/attention, and processing speed is associated with brain ferritin iron levels, assessed by FDRI in healthy older individuals. They also investigated the influence of gender and allelic variants in genes encoding for hemochromatosis H63D, HFE H63D; and transferrin C2, TfC2 in this association. Results showed that, independently of gene status, worse verbal-memory performance was associated with higher hippocampal iron in men, but not in women. Additionally, worse working memory/attention performance was associated with higher basal ganglia iron in gene variant non-carriers.

Lower memory scores, assessed by immediate and delayed recall measures from memory for names and logical memory tests, were also correlated to higher hippocampal iron concentration, measured by T2\* relaxation time, and reduced hippocampal volume in a study with 113 healthy adult subjects (age 19–83 years) of both sexes. No associations were seen between memory performance and iron content in the caudate nucleus or primary visual cortex [96]. Higher hippocampal iron was also associated with reduced hippocampal volume. The authors suggest that altered iron homeostasis and iron-induced oxidative stress may be involved in hippocampal tissue loss, leading to age-related cognitive decline.

Using MR corrected phase imaging, a recent study confirmed that iron content in hippocampus, parietal cortex, caudate and putamen, and dentate nucleus of the cerebellum was significantly higher in AD patients when compared to age- and gender-matched healthy controls. Results from healthy voluntary controls were also compared to postmortem iron concentrations reported by Hallgren and Sourander. Iron concentrations in the parietal cortex, hippocampus, and putamen were positively correlated with the severity of cognitive impairment in early stage AD patients [97]. A correlation between iron levels, obtained by corrected phase imaging, in the head of the hippocampus and Mini-Mental State Examination (MMSE) score was also found in a study with 26 AD patients. In addition, significantly lower phase values, suggesting increased iron concentrations in the basal ganglia and hippocampal regions, were found in AD patients compared to normal aging group [85].

Finally, another recent study suggests that brain iron content is associated with lower general cognitive ability [98]. One hundred and forty three nondemented subjects of the generally healthy Lothian Birth Cohort were tested for general cognitive ability (intelligence)

at mean ages of 11, 70, and 72 years. Results showed that about half of a healthy, elderly sample presented detectable iron deposits, spreading over a wide range, mostly in the basal ganglia. The group with detectable iron deposits ( $n=72$ ) had significantly lower general cognitive ability at ages 70 and 72, when compared with the group without detectable iron deposits ( $n=71$ ).

Brain iron deposition assessment *in vivo* and its correlation with functional cognitive data in the aging population might be viewed as a noninvasive early marker for the evaluation of potential risk factors for the development of neurodegenerative disorders, such as AD. Findings from human imaging studies correlating iron accumulation in brain regions with cognitive deficits are shown in Table 2.

In a postmortem study including cases representing four distinct diagnostic categories (control; preclinical; Clinical Dementia Rate = 0.5, very mild dementia; and Clinical Dementia Rate = 1.0, mild dementia), histochemistry for total iron and catalytic redox activity in sections of the cortex and cerebellum was performed. All groups of patients displayed significantly higher amounts of cortical and cerebellar iron and redox activity than controls [99]. Umur and coworkers [100] found significant increases in serum iron, transferrin saturation, ferritin, and malondialdehyde levels in 46 elderly subjects with cognitive dysfunction. Moreover, significant negative correlations were found between serum iron, transferrin saturation, ferritin, and malondialdehyde and MMSE. However, conflicting results were reported in a cross-sectional community study that examined the relationship between serum iron measures and cognitive status in 800 individuals 60 years or older. No relationships were found between serum iron or transferrin saturation and presence or absence of dementia. Additionally, no relationship was observed between ferritin and cognition for participants with possible or probable dementia [101].

It is possible that cognitive dysfunction related to iron accumulation could be an early marker of AD. While further studies are necessary to determine the usefulness of peripheral iron measures as markers for cognitive impairments or dementia status, brain imaging studies seem to present more consistent and promising results. The full characterization of iron changes in the brain during normal healthy aging as well as in disease states and its association with cognitive decline might have implications for the development of novel methods for diagnostics, accompanying disease progression, and monitoring the efficacy of treatments.

Table 2  
Human imaging studies correlating iron content in brain regions and cognitive impairment

Population characteristics	Brain region in which iron content correlated to cognitive impairment	Cognitive testing	References
25 healthy subjects, age ranging from 65 to 76 years	<i>Globus pallidus</i>	Incidental learning and a dual task, the tapping-while-reading task	91
12 elderly participants reporting memory problems (MC1, age $69.2 \pm 6.8$ mean $\pm$ SD; MC2 age $75.5 \pm 8.8$ mean $\pm$ SD) and 11 healthy volunteers (age $70.7 \pm 6.9$ , mean $\pm$ SD)	Temporal cortex	Verbal learning and memory (California Verbal Learning Test, CVLT)	92
33 patients with multiple sclerosis (age $42.3 \pm 9$ mean $\pm$ SD) and 14 healthy controls (age $38.7 \pm 7$ , mean $\pm$ SD)	<i>Globus pallidus</i>	Neuropsychological composite score (new learning, attention, working memory, spatial processing and executive function)	93
10 elderly subjects, (mean age = 72.2 years)	Caudate nucleus and putamen	Dementia Rating Scale and reaction times on a two-choice attention test	94
63 healthy older individuals (age = $67.0 \pm 6.1$ years, mean $\pm$ SD)	Hippocampus and basal ganglia	Declarative memory, working memory/attention, and processing speed	95
113 healthy adult subjects (age = $53.96 \pm 15.39$ 19–83 years, mean $\pm$ SD)	Hippocampus	Immediate and delayed recall measures from memory for names and logical memory tests	96
15 AD patients (mean age, 69.8 years; range, 52–81 years) 15 age- and gender-matched healthy control subjects (mean age, 70.0 years; range, 52–82 years)	Parietal cortex and hippocampus	MMSE scores	97
143 nondemented subjects of the generally healthy Lothian Birth Cohort (age range 71–72 years; $71.9 \pm 0.3$ , mean $\pm$ SD)	Iron deposits, most in the basal ganglia	General cognitive ability (measured by 6 subtests from the Wechsler Adult Intelligence Scale — Wais-IIIUK: Symbol Search, Digit Symbol, Matrix Reasoning, Letter-Number Sequencing, Digit Span Backwards)	98
26 AD patients (age = $70.96 \pm 8.55$ , mean $\pm$ SD) and 24 healthy age-matched controls (age = $69.40 \pm 11.38$ , mean $\pm$ SD)	Hippocampus	MMSE scores	85

MMSE, Mini-Mental State Examination; MC1, no cognitive impairment; MC2, mild cognitive impairment, using cutoff score of 24 on the MMSE.

## NEUROCHEMICAL AND CELLULAR ALTERATIONS INDUCED BY NEONATAL IRON OVERLOAD

### *Oxidative stress*

Increasing evidence suggest that iron-induced neurotoxicity is related to oxidative damage. Free iron can induce oxidative stress via the Fenton reaction [102]. Oxidative stress has been implicated as a pathogenic factor in many neurodegenerative diseases. In AD, evidence from experimental models [103] and from studies in patients [99, 104] indicates that oxidative damage precedes pathological changes.

We evaluated the long-term oxidative effects of iron exposure during the neonatal period assessed in rats treated orally with 0.0, 7.5, or 15.0 mg of Fe<sup>2+</sup>/kg of body weight on postnatal days 10–12. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS), protein carbonyl, and superoxide dismutase (SOD) activity were measured at

the age of 3 months. We found an increase in TBARS and protein carbonylation, as well as a decrease in SOD activity in the substantia nigra of iron-treated rats. This work was the first to report that iron supplementation in a critical neonatal period can induce oxidative stress in the substantia nigra in adult life [105]. Increased TBARS and superoxide production in sub-mitochondrial particles were also found in the hippocampus and cortex of rats treated neonatally with iron [42]. Taken together, these results showed that iron load in the early stages of life induces oxidative damage in the adult brain. We have also shown that selegiline, which was able to reverse iron-induced memory deficits [49], protected against iron-induced oxidative stress in brain regions. The results have shown that selegiline when administered early in life was able to protect the substantia nigra as well as the hippocampus against iron-induced oxidative stress. When selegiline was administered in the adulthood to iron-treated rats, oxidative stress was reduced only in the

substantia nigra. These findings suggest that, at least in part, selegiline ability to reverse iron-induced memory impairment might be related to the prevention of iron-induced oxidative damage in brain regions [106].

#### *Astroglial response*

Acute and chronic brain insults trigger a specific glial reaction, generally known as reactive astrogliosis, represented by a complex morphofunctional remodeling of astrocytes [107]. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression also increases with aging in the human brain; and it has been suggested that astrocytes may respond to preclinical AD molecular pathology [108]. In line with these observations in AD, recent studies have shown that the number of astrocytes is significantly increased in the hippocampus of A $\beta$ PP/PS1 mice compared with age- and gender-matched wild-type littermates [109]. Thus, our next goal was to investigate neuropathological changes in A $\beta$ PP/PS1 transgenic mice, subjected to iron administration in a critical postnatal period, in order to reveal the interaction of genetic and environmental risk factors in the pathogenesis of the disease. The results showed that transient iron intake during the neonatal period induces astrocytic gliosis in A $\beta$ PP/PS1 transgenic mice and in age-matched littermates at the age of six months [110]. Increased astrocytosis, revealed by densitometry of GFAP-immunoreactive astrocytes, was also found in the substantia nigra and striatum of aged iron-treated rats and in the hippocampus of adult iron-treated rats when compared to age-matching controls. Decreased densitometry of neurons, revealed by neuronal nucleus immunohistochemistry, was found in aged iron-treated rats in the substantia nigra and striatum when compared to age-matched controls. This study indicated that increased iron availability to the central nervous system at early stage of development in rats, results in significantly increased GFAP expression levels that are maintained later in life in different regions. These findings clearly show that excess of iron during the neonatal period also impacts in the cellular composition of the adult and aged brain [111].

#### *Apoptosis*

Neuronal death mediated by apoptosis is believed to underlie cognitive and behavioral symptoms of aging and neurodegenerative diseases in humans and animal models [112, 113]. Many signals can mediate apoptosis initiation, including neurotrophic factor

deprivation [114] and iron-induced oxidative stress [115]. We thus decided to examine whether neonatal iron overload was associated with apoptotic cell death in adult and old rats. The protease prostatic apoptosis response-4 (Par-4) and caspase-3 immunoreactivity were analyzed in specific brain areas including the hippocampal formation subareas CA1, CA3, and dentate gyrus, the adjacent cortex and the striatum in adult rats from control and neonatally iron-treated groups. Iron-treated animals presented significantly higher Par-4 and caspase-3 immunoreactivities in CA1, CA3, and cortex [116]. It has been suggested that oxidative stress/damage or neurotoxic byproducts of lipid peroxidation may lead to cell death through apoptosis or programmed cell death in AD [117], and there is evidence for the role of iron dysregulation in apoptosis [118]. Zhang and coworkers [119] demonstrated that iron increases caspase-3 activity and induces subsequent apoptosis in MPP<sup>+</sup>-treated MES23.5 cells. The iron chelator deferoxamine was able to completely abolish these effects.

Iron supplementation at early stages of development results in brain accumulation and subsequent toxicity, increasing oxidative damage up to a level that natural defenses fail and neuronal apoptotic rates are exacerbated during adulthood [116]. The mitotic responsiveness and more resistant nature of astrocytes may allow their proliferation in areas previously occupied by neurons [111]. These results may contribute to a better understanding of the damaging potential of iron accumulation to brain function and the resulting increased susceptibility to neuronal damage that may contribute to cognitive dysfunction (Fig. 2).

## CONCLUSION

Over the last decades, results from animal models in which iron was administered to mice or rats have consistently demonstrated that iron loading is implicated in cognitive deficits. Those results are corroborated by studies showing that iron chelation attenuates cognitive deficits in a variety of animal models of cognitive dysfunction related to aging, AD, iron loading, and traumatic brain injury. The availability of these animal models will increasingly allow the characterization of memory deficits produced by brain iron overload and the identification of potential targets and candidate therapies. Remarkably, more recent human studies using image techniques have also indicated a consistent correlation between iron deposition and cognitive dysfunction in humans.

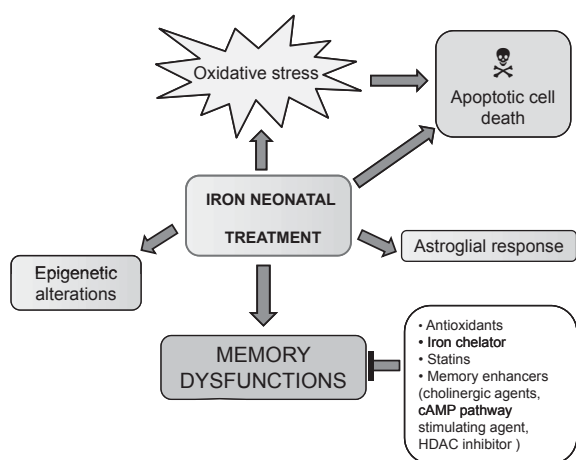


Fig. 2. Effects of neonatal iron overload on the central nervous system. Iron, administered to rats in the neonatal period, accumulates in brain regions [40], leading to oxidative damage [42, 105, 106], increased apoptotic markers [116], astroglial response [110, 111], and epigenetic alterations [67]. The combination of these already described mechanisms with other possible yet to be revealed alterations may contribute direct or indirectly to iron-induced cognitive dysfunction [40, 42]. Such an animal model of iron-induced memory deficits can allow the investigation of the role of iron overload in memory deficits observed in humans [85, 91–100] as well as contribute to the preclinical testing of new candidate therapies. Studies have shown that iron-induced memory deficits are reversed by antioxidants, iron chelator, statin, and memory enhancers such as cholinergic agonists, the cAMP pathway stimulating agent, rolipram, and the histone deacetylase inhibitor (HDACi), sodium butyrate [32, 45, 49, 53, 63, 67, 69].

It is important to point out that, while excess of iron has been unequivocally linked to cognitive dysfunction, the precise mechanisms underlying iron effects on cognition remain unknown. Iron contributes to oxidative stress, damaging the mitochondria, leading to a compromised energy production in neurons, which may result in impaired synaptic functioning. Oxidative stress may also trigger apoptosis, contributing to neuronal loss, which could ultimately lead to cognitive decline. Clearly, cognitive dysfunction is not exclusively related to iron accumulation. Many other mechanisms might be related to memory loss observed in aging and neurodegenerative disorders, including dysfunction in the ubiquitin-proteasome system [120–122] and protein aggregation [123], altered calcium homeostasis [124], NMDA receptor-mediated excitotoxicity [125], and toxicity related to small soluble A $\beta$  oligomeric structures in AD [126]. Decreased neurotrophic factors [127], epigenetic mechanisms [128], and disruption of glutamate receptor-mediated synaptic plasticity [129] have also been recently considered as critically involved in the

disruption of cognition associated to aging and neurodegenerative disorders. Additionally, a severe loss of cortical cholinergic innervations [130] has been consistently associated to cognitive deficits observed in AD, as well as in other neurological diseases such as PD, Down syndrome, progressive supranuclear palsy, Creutzfeldt–Jakob disease, Korsakoff’s syndrome, and traumatic brain injury.

It is likely that a multifactorial interaction of neuronal dysfunctions, including oxidative stress, energy failure, synaptic loss, and cell death, results in cognitive decline. Although iron may not be the only trigger, its accumulation possibly interacts and contributes to these neuropathological processes. Thus, a better understanding of the functional consequences of iron dysregulation in aging and neurological diseases may help to identify novel targets for treating memory problems that afflict a growing aging population.

## ACKNOWLEDGMENTS

L.S.F. is supported by a CAPES/MEC fellowship. N.S. is CNPq Research fellow.

Authors’ disclosures available online (<http://www.j-alz.com/disclosures/view.php?id=1604>).

## REFERENCES

- [1] Connor JR, Pavlick G, Karli D, Menzies SL, Palmer C (1995) A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol* **355**, 111–123.
- [2] Sian-Hülsmann J, Mandel S, Youdim MB, Riederer P (2011) The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *J Neurochem* **118**, 939–957.
- [3] Lozoff B (2011) Early iron deficiency has brain and behavior effects consistent with dopaminergic dysfunction. *J Nutr* **141**, 740S–746S.
- [4] Fretham SJ, Carlson ES, Georgieff MK (2011) The role of iron in learning and memory. *Adv Nutr* **2**, 112–121.
- [5] Papanikolaou G, Pantopoulos K (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **202**, 199–211.
- [6] Gaasch JA, Lockman PR, Geldenhuys WJ, Allen DD, Van der Schyf CJ (2007) Brain iron toxicity: Differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells. *Neurochem Res* **32**, 1196–1208.
- [7] Dexter DT, Wells FR, Agid F, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD (1987) Increased nigral iron content in postmortem Parkinsonian brain. *Lancet* **2**, 1219–1220.
- [8] Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD (1991) 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.
- [9] Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MB (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* **52**, 515–520.

- [10] Sofic E, Paulus W, Jellinger K, Riederer P, Youdim MB (1991) Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem* **56**, 978-982.
- [11] Hirsch EC, Brandel J-P, Galle P, Javoy-Agid F, Agid Y (1991) Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: An X-ray microanalysis. *J Neurochem* **56**, 446-451.
- [12] Hashimoto M, Hsu LJ, Xia Y, Takeda A, Sisk A, Masliah E (1999) Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation on NACP/alpha-synuclein *in vitro*. *Neuroreport* **10**, 717-721.
- [13] Paik SR, Shin HJ, Lee JH, Chang CS, Kim J (1999) Cooper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein. *Biochem J* **340**, 821-828.
- [14] Zecca L, Youdim MBH, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* **5**, 863-873.
- [15] Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, Marsden CD (1994) Increased nigral iron content and alteration in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* **52**, 1830-1836.
- [16] Good PF, Perl DP, Bierer LM, Schmeidler J (1992) Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: A laser microprobe (LAMMA) study. *Ann Neurol* **31**, 286-292.
- [17] Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Mufson EJ (1992) A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains. *J Neurosci Res* **31**, 75-78.
- [18] Bishop GM, Robinson SR, Liu Q, Perry G, Atwood CS, Smith MA (2002) Iron: A pathological mediator of Alzheimer disease? *Dev Neurosci* **24**, 184-187.
- [19] Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* **158**, 47-52.
- [20] Barnham KJ, Haeflner GD, Ciccotosto GD, Curtain CC, Tew D, Mavros C, Beyreuther K, Carrington D, Masters CL, Cherny RA, Cappai R, Bush AI (2004) Tyrosine gated electron transfer is key to the toxic mechanism of Alzheimer's disease beta-amyloid. *FASEB J* **18**, 1427-1429.
- [21] Schubert D, Chevion M (1995) The role of iron in beta amyloid toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **216**, 702-707.
- [22] Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI (1999) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* **38**, 7609-7616.
- [23] Squitti R (2012) Metals in Alzheimer's disease: A systemic perspective. *Front Biosci* **17**, 451-472.
- [24] Batista-Nascimento L, Pimentel C, Menezes RA, Rodrigues-Pousada C (2012) Iron and neurodegeneration: From cellular homeostasis to disease. *Oxid Med Cell Longev* **2012**, 128647.
- [25] Rogers JT, Randall JD, Cahill CM, Eder PS, Huang X, Gunshin H, Leiter L, McPhee J, Sarang SS, Utsuki T, Greig NH, Lahiri DK, Tanzi RE, Bush AI, Giordano T, Gullans SR (2002) An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *J Biol Chem* **277**, 45518-45528.
- [26] Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, James SA, Robb E, Wikke K, Leong SL, Perez K, Johanssen T, Greenough MA, Cho HH, Galatis D, Moir RD, Masters CL, McLean C, Tanzi RE, Cappai R, Barnham KJ, Ciccotosto GD, Rogers JT, Bush AI (2010) Iron-export ferroxidase activity of beta-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell* **142**, 857-867.
- [27] Schipper HM, Song W, Zukor H, Hasclovici JR, Zeligman D (2009) Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: Expanding frontiers of engagement. *J Neurochem* **110**, 469-485.
- [28] Schipper HM (2012) Neurodegeneration with brain iron accumulation - clinical syndromes and neuroimaging. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 350-360.
- [29] Freeman K, Gregory A, Turner A, Blasco P, Hogarth P, Hayflick S (2007) Intellectual and adaptive behaviour functioning in pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *J Intellect Disabil Res* **51**, 417-426.
- [30] Paisán-Ruiz C, Guevara R, Federoff M, Hanagasi H, Sina F, Elahi E, Schneider SA, Schwingenschuh P, Bajaj N, Emre M, Singleton AB, Hardy J, Bhatia KP, Brandner S, Lees AJ, Houlden H (2010) Early-onset L-dopa-responsive parkinsonism with pyramidal signs due to ATP13A2, PLA2G6, FBXO7 and spatacsin mutations. *Mov Disord* **25**, 1791-1800.
- [31] Lehn A, Boyle R, Brown H, Airey C, Mellick G (2012) Neuroferritinopathy. *Parkinsonism Relat Disord* **18**, 909-915.
- [32] Rech RL, De Lima MN, Dornelles A, Garcia VA, Alcalde LZ, Vedana G, Schröder N (2010) Reversal of age-associated memory impairment by rosuvastatin in rats. *Exp Gerontol* **45**, 351-356.
- [33] Guo C, Wang T, Zheng W, Shan ZY, Teng WP, Wang ZY (2013) Intranasal deferoxamine reverses iron-induced memory deficits and inhibits amyloidogenic APP processing in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **34**, 562-575.
- [34] Railey AM, Groeber CM, Flinn JM (2011) The effect of metals on spatial memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **24**, 375-381.
- [35] Lozoff B, Castillo M, Clark KM, Smith JB (2012) Iron-fortified vs low-iron infant formula: Developmental outcome at 10 years. *Arch Pediatr Adolesc Med* **166**, 208-215.
- [36] Taylor EM, Morgan EH (1990) Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* **55**, 35-42.
- [37] Dwork AJ, Lawler G, Zybert PA, Durkin M, Osman M, Willson N, Barkai AI (1990) An autoradiographic study of the uptake and distribution of iron by the brain of the young rat. *Brain Res* **518**, 31-39.
- [38] Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T (1999) Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice. *Toxicol App Pharmacol* **159**, 25-30.
- [39] Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T (2000) Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period. *Brain Res Dev Brain Res* **119**, 65-74.
- [40] Schröder N, Fredriksson A, Vianna M, Roesler R, Izquierdo I, Archer T (2001) Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav Brain Res* **124**, 77-85.
- [41] Maaroufi K, Ammari M, Jeljeli M, Roy V, Sakly M, Abdelmelek H (2009) Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult Wistar rats by ferrous sulfate. *Physiol Behav* **96**, 343-349.
- [42] De Lima MN, Polydoro M, Laranja DC, Bonatto F, Bromberg E, Moreira JC, Dal-Pizzol F, Schröder N (2005) Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur J Neurosci* **21**, 2521-2528.
- [43] De Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schröder N (2005) Reversal of age-related deficits in

- object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol* **40**, 506-511.
- [44] De Lima MN, Dias CP, Presti-Torres J, Dornelles A, Garcia VA, Scalco F, Guimarães MR, Petry RC, Bromberg E, Constantino L, Budni P, Dal-Pizzol F, Schröder N (2008) Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol Aging* **29**, 1052-1059.
- [45] De Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimarães MR, Scalco FS, 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.
- [46] Squire LR (2004) Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* **82**, 171-177.
- [47] Squire LR, Wixted JT, Clark RE (2007) Recognition memory and the medial temporal lobe: A new perspective. *Nat Rev Neurosci* **8**, 872-883.
- [48] Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* **25**, 563-593.
- [49] De Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Grazziotin MM, Garcia VA, Dal-Pizzol F, Bromberg E, Schröder N (2005) Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp Neurol* **196**, 177-183.
- [50] De Mello N, Souza-Junior IQ, Carobrez AP (2005) Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. *Behav Brain Res* **158**, 263-268.
- [51] Iyo M, Namba H, Fukuski K, Shinotoh H, Nagatsuka S, Suhara T, Sudo Y, Suzuki K, Irie T (1997) Measurement of acetylcholinesterase by positron emission tomography in the brains of healthy controls and patients with Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 1805-1809.
- [52] Bohnen NI, Kaufer DI, Hendrickson R, Ivance L, Lopresti B, Davis J, Constantine G, Mathis C, Moore R, DeKosky S (2005) Cognitive correlates of alterations in acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **380**, 127-132.
- [53] Perez VP, De Lima MN, Da Silva RS, Dornelles AS, Vedana G, Bogo MR, Bonan CD, Schröder N (2010) Iron leads to memory impairment that is associated with a decrease in acetylcholinesterase pathways. *Curr Neurovasc Res* **10**, 1567-2026.
- [54] Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourchouladze R (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* **88**, 615-626.
- [55] Bevilaqua L, Ardenghi P, Schröder N, Bromberg E, Schmitz PK, Schaeffer E, Quevedo J, Bianchin M, Walz R, Medina JH, Izquierdo I (1997) Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signaling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. *Behav Pharmacol* **8**, 331-338.
- [56] Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, Mansuy I, Hawkins RD, Kandel ER (1999) Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation *in vitro* and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5280-5285.
- [57] Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE (1999) Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem* **6**, 97-110.
- [58] Quevedo J, Vianna MR, Martins MR, Barichello T, Medina JH, Roesler R, Izquierdo I (2004) Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behav Brain Res* **154**, 339-343.
- [59] Arnsten AF, Ramos BP, Birnbaum SG, Taylor JR (2005) Protein kinase A as a therapeutic target for memory disorders: Rationale and challenges. *Trends Mol Med* **11**, 121-128.
- [60] Middleton LE, Yaffe K (2009) Promising strategies for the prevention of dementia. *Arch Neurol* **66**, 1210-1215.
- [61] Cassol-Jr OJ, Comim CM, Silva BR, Hermani FV, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Hallak JE, De Martinis BS, Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J, Dal-Pizzol F (2010) Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Res* **1348**, 128-138.
- [62] Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA (2004) Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* **89**, 134-141.
- [63] Fagherazzi EV, Garcia VA, Maurmann N, Bervanger T, Halmenschlager LH, Busato SB, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Schröder N (2012) Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. *Psychopharmacology (Berl)* **219**, 1133-1140.
- [64] Barrett RM, Wood MA (2008) Beyond transcription factors: The role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn Mem* **15**, 460-467.
- [65] Mikaelsson MA, Miller CA (2011) The path to epigenetic treatment of memory disorders. *Neurobiol Learn Mem* **96**, 13-18.
- [66] Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A (2010) Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* **328**, 753-756.
- [67] Da Silva PF, Garcia VA, Dornelles AS, Da Silva VK, Maurmann N, Portal BCD, Ferreira RDP, Piazza FC, 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.
- [68] Long DA, Ghosh K, Moore AN, Dixon CE, Dash PK (1996) Deferoxamine improves spatial memory performance following experimental brain injury in rats. *Brain Res* **717**, 109-117.
- [69] De Lima MN, Presti-Torres J, Caldana F, Grazziotin MM, Scalco F, Guimarães MR, Bromberg E, Franke SI, Henriques JA, Schröder N (2007) Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* **570**, 111-114.
- [70] Kupersmidt L, Amit T, Bar-Am O, Youdim MB, Weinreb O (2012) Neuroprotection by the multitarget iron chelator M30 on age-related alterations in mice. *Mech Ageing Dev* **133**, 267-274.
- [71] Kupersmidt L, Amit T, Bar-Am O, Youdim MB, Weinreb O (2012) The novel multi-target iron chelating-radical scavenging compound m30 possesses beneficial effects on major hallmarks of Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal* **17**, 860-877.
- [72] Fine JM, Baillargeon AM, Renner DB, Hoerster NS, Tokarev J, Colton S, Pelleg A, Andrews A, Sparley KA,

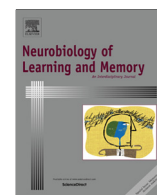


- Krogh KM, Frey WH, Hanson LR (2012) Intranasal deferroxamine improves performance in radial arm water maze, stabilizes HIF-1 $\alpha$ , and phosphorylates GSK3 $\beta$  in P301L tau transgenic mice. *Exp Brain Res* **219**, 381-390.
- [73] Crapper McLachlan DR, Dalton AJ, Kruck TP, Bell MY, Smith WL, Kalow W, Andrews DF (1991) Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. *Lancet* **337**, 1304-1308.
- [74] Boddaert N, Le Quan Sang KH, Rötig A, Leroy-Willig A, Gallet S, Brunelle F, Sidi D, Thalabard JC, Munnich A, Cabantchik ZI (2007) Selective iron chelation in Friedreich ataxia: Biologic and clinical implications. *Blood* **110**, 401-408.
- [75] Whitfield JB, Treloar S, Zhu G, Powell LW, Martin NG (2003) Relative importance of female-specific and non-female-specific effects on variation in iron stores between women. *Br J Haematol* **120**, 860-866.
- [76] Bartzokis G, Tishler TA, Lu PH, Villablanca P, Altshuler LL, 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.
- [77] Hahn P, Song Y, Ying GS, He X, Beard J, Dunaief JL (2009) Age-dependent and gender-specific changes in mouse tissue iron by strain. *Exp Gerontol* **44**, 594-600.
- [78] Thulluri S, Wu M, Blough ER, Manne ND, Litchfield AB, Wang B (2012) Regulation of iron-related molecules in the rat hippocampus: Sex- and age-associated differences. *Ann Clin Lab Sci* **42**, 145-151.
- [79] Bartzokis G, Lu PH, Tishler TA, Peters DG, Kosenko A, Barrall KA, Finn JP, Villablanca P, Laub G, Altshuler LL, Geschwind DH, Mintz J, Neely E, Connor JR (2010) Prevalent iron metabolism gene variants associated with increased brain ferritin iron in healthy older men. *J Alzheimers Dis* **20**, 333-341.
- [80] Connor JR, Lee SY (2006) HFE mutations and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **10**, 267-276.
- [81] Lehmann DJ, Schuur M, Warden DR, Hammond N, Belbin O, Kölsch H, Lehmann MG, Wilcock GK, Brown K, Kehoe PG, Morris CM, Barker R, Coto E, Alvarez V, Deloukas P, Mateo I, Gwilliam R, Combarros O, Arias-Vásquez A, Aulchenko YS, Ikram MA, Breteler MM, van Duijn CM, Oulhaj A, Heun R, Cortina-Borja M, Morgan K, Robson K, Smith AD (2012) Transferrin and HFE genes interact in Alzheimer's disease risk: The Epistasis Project. *Neurobiol Aging* **33**, 202.e1-13.
- [82] Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvin V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsis P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **41**, 1088-1093.
- [83] Corneveaux JJ, Myers AJ, Allen AN, Pruzin JJ, Ramirez M, Engel A, Nalls MA, Chen K, Lee W, Chewning K, Villa SE, Meechoovet HB, Gerber JD, Frost D, Benson HL, O'Reilly S, Chibnik LB, Shulman JM, Singleton AB, Craig DW, Van Keuren-Jensen KR, Dunckley T, Bennett DA, De Jager PL, Heward C, Hardy J, Reiman EM, Huentelman MJ (2010) Association of CR1, CLU and PICALM with Alzheimer's disease in a cohort of clinically characterized and neuropathologically verified individuals. *Hum Mol Genet* **19**, 3295-3301.
- [84] Scotland PB, Heath JL, Conway AE, Porter NB, Armstrong MB, Walker JA, Klebig ML, Lavau CP, Wechsler DS (2012) The PICALM protein plays a key role in iron homeostasis and cell proliferation. *PLoS One* **7**, e44252.
- [85] Ding B, Chen KM, Ling HW, Sun F, Li X, Wan T, Chai WM, Zhang H, Zhan Y, Guan YJ (2009) Correlation of iron in the hippocampus with MMSE in patients with Alzheimer's disease. *J Magn Reson Imaging* **29**, 793-798.
- [86] Bilgic B, Pfefferbaum A, Rohlfing T, Sullivan EV, Adalsteinsson E (2012) MRI estimates of brain iron concentration in normal aging using quantitative susceptibility mapping. *Neuroimage* **59**, 2625-2635.
- [87] Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Rohlfing T, Sullivan EV (2009) MRI estimates of brain iron concentration in normal aging: Comparison of field-dependent (FDRI) and phase (SWI) methods. *Neuroimage* **47**, 493-500.
- [88] Hallgren B, Sourander P (1958) The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem* **3**, 41-51.
- [89] Yan SQ, Sun JZ, Yan YQ, Wang H, Lou M (2012) Evaluation of brain iron content based on magnetic resonance imaging (MRI): Comparison among phase value, R2\* and magnitude signal intensity. *PLoS One* **7**, e31748.
- [90] Hare DJ, Gerlach M, Riederer P (2012) Considerations for measuring iron in post-mortem tissue of Parkinson's disease patients. *J Neural Transm* **119**, 1515-1521.
- [91] Pujol J, Junqué C, Vendrell P, Grau JM, Martí-Vilalta JL, Olivé C, Gili J (1992) Biological significance of iron-related magnetic resonance imaging changes in the brain. *Arch Neurol* **49**, 711-717.
- [92] House MJ, St Pierre TG, Foster JK, Martins RN, Clarnette R (2006) Quantitative MR imaging R2 relaxometry in elderly participants reporting memory loss. *AJNR Am J Neuroradiol* **27**, 430-439.
- [93] Brass SD, Benedict RH, 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.
- [94] Sullivan EV, Adalsteinsson E, Rohlfing T, Pfefferbaum A (2009) Relevance of iron deposition in deep gray matter brain structures to cognitive and motor performance in healthy elderly men and women: Exploratory findings. *Brain Imaging Behav* **3**, 167-175.
- [95] Bartzokis G, Lu PH, Tingus K, Peters DG, Amar CP, Tishler TA, Finn JP, Villablanca P, Altshuler LL, Mintz J, Neely E, Connor JR (2011) Gender and iron genes may modify associations between brain iron and memory in healthy aging. *Neuropsychopharmacology* **36**, 1375-1384.
- [96] Rodrigue KM, Daugherty AM, Haacke EM, Raz N (2012) The role of hippocampal iron concentration and hippocampal volume in age-related differences in memory. *Cereb Cortex*, in press.

- [97] Zhu WZ, Zhong WD, Wang W, Zhan CJ, Wang CY, Qi JP, Wang JZ, Lei T (2009) Quantitative MR phase-corrected imaging to investigate increased brain iron deposition of patients with Alzheimer disease. *Radiology* **253**, 497-504.
- [98] Penke L, Valdés Hernández MC, Maniega SM, Gow AJ, Murray C, Starr JM, Bastin ME, Deary IJ, Wardlaw JM (2012) Brain iron deposits are associated with general cognitive ability and cognitive aging. *Neurobiol Aging* **33**, 510-517.
- [99] Smith MA, Zhu X, Tabaton M, Liu G, McKeel DW Jr, Cohen ML, Wang X, Siedlak SL, Dwyer BE, Hayashi T, Nakamura M, Nunomura A, Perry G (2010) Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* **19**, 363-372.
- [100] Umur EE, Oktenli C, Celik S, Tangi F, Sayan O, Sanisoglu YS, Ipcioglu O, Terekeci HM, Top C, Nalbant S, Kucukardali Y (2011) Increased iron and oxidative stress are separately related to cognitive decline in elderly. *Geriatr Gerontol Int* **11**, 504-509.
- [101] Milward EA, Bruce DG, Knuiman MW, Divitini ML, Cole M, Inderjeeth CA, Clarnette RM, Maier G, Jablensky A, Olynyk JK (2010) A cross-sectional community study of serum iron measures and cognitive status in older adults. *J Alzheimers Dis* **20**, 617-623.
- [102] Berg D, Gerlach M, Youdim MBH, Double KL, Zecca L, Riederer P, Becker G (2001) Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* **79**, 225-236.
- [103] Belkacemi A, Ramassamy C (2012) Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid- $\beta$  cascade. *Free Radic Biol Med* **52**, 593-600.
- [104] Deibel MA, Ehmann WD, Markesbery WR (1996) Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: Possible relation to oxidative stress. *J Neurol Sci* **143**, 137-142.
- [105] Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota ML, Andrades ME, Caregnato FF, Vianna M, Schröder N, Quevedo J, Izquierdo I, Archer T, Moreira JC (2001) Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult wistar rat. *Brain Res Dev Brain Res* **130**, 109-114.
- [106] Budni P, De Lima MN, Polydoro M, Moreira JC, Schröder N, Dal-Pizzol F (2007) Antioxidant effects of selegiline in oxidative stress induced by iron neonatal treatment in rats. *Neurochem Res* **32**, 965-972.
- [107] Rodríguez JJ, Olabarria M, Cchvatal A, Verkhratsky A (2009) Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Diff* **16**, 378-385.
- [108] Wharton SB, O'Callaghan JP, Savva GM, Nicoll JA, Matthews F, Simpson JE, Forster G, Shaw PJ, Brayne C, Ince PG (2009) MRC cognitive function and ageing neuropathology study group. Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: Relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* **27**, 465-473.
- [109] Manaye KF, Wang PC, O'Neil JN, Huang SY, Xu T, Lei DL, Tizabi Y, Ottinger MA, Ingram DK, Mouton PR (2007) Neuropathological quantification of dtg APP/PS1: Neuroimaging, stereology, and biochemistry. *Age* **29**, 87-96.
- [110] Fernandez LL, Carmona M, Portero-Otin M, Naudi A, Pamplona R, Schröder N, Ferrer I (2010) Effects of increased iron intake during the neonatal period on the brain of adult A $\beta$ PP/PS1 transgenic mice. *J Alzheimers Dis* **19**, 1069-1080.
- [111] Fernandez LL, De Lima MN, Scalco F, Vedana G, Miwa C, Hilbig A, Vianna M, Schröder N (2011) Early post-natal iron administration induces astroglial response in the brain of adult and aged rats. *Neurotox Res* **20**, 193-199.
- [112] Morrison JH, Hof PR (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science* **278**, 412-419.
- [113] Mattson MP (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 120-129.
- [114] Stefanis L (2005) Caspase-dependent and -independent neuronal death: Two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist* **11**, 50-62.
- [115] Polla AS, Polla LL, Polla BS (2003) Iron as the malignant spirit in successful ageing. *Ageing Res Rev* **2**, 25-37.
- [116] Miwa CP, De Lima MN, Scalco F, Vedana G, Mattos R, Fernandez LL, Hilbig A, Schröder N, Vianna M (2011) Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. *Neurotox Res* **19**, 527-535.
- [117] Lovell MA, Markesbery WR (2006) Amyloid beta peptide, 4-hydroxynonenal and apoptosis. *Curr Alzheimer Res* **3**, 359-364.
- [118] Kell DB (2010) Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch Toxicol* **84**, 825-889.
- [119] Zhang S, Wang J, Song N, Xie J, Jiang H (2009) Up-regulation of divalent metal transporter 1 is involved in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+))-induced apoptosis in MES23.5 cells. *Neurobiol Aging* **30**, 1466-1476.
- [120] Zabel C, Nguyen HP, Hin SC, Hartl D, Mao L, Klose J (2010) Proteasome and oxidative phosphorylation changes may explain why aging is a risk factor for neurodegenerative disorders. *J Proteomics* **73**, 2230-2238.
- [121] Fioravante D, Byrne JH (2011) Protein degradation and memory formation. *Brain Res Bull* **85**, 14-20.
- [122] van Tijn P, Hobo B, Verhage MC, Oitzl MS, van Leeuwen FW, Fischer DF (2011) Alzheimer-associated mutant ubiquitin impairs spatial reference memory. *Physiol Behav* **102**, 193-200.
- [123] Klyubin I, Cullen WK, Hu NW, Rowan MJ (2012) Alzheimer's disease A $\beta$  assemblies mediating rapid disruption of synaptic plasticity and memory. *Mol Brain* **5**, 25.
- [124] Zündorf G, Reiser G (2011) Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* **14**, 1275-1288.
- [125] Hardingham GE (2009) Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* **37**, 1147-1160.
- [126] Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012) The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* **15**, 349-357.
- [127] Nagahara AH, Tuszynski MH (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 209-219.
- [128] Portela A, Esteller M (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* **28**, 1057-1068.
- [129] Hu NW, Ondrejcek T, Rowan MJ (2012) Glutamate receptors in preclinical research on Alzheimer's disease: Update on recent advances. *Pharmacol Biochem Behav* **100**, 855-862.
- [130] Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* **221**, 555-563.

#### 4.2 Artigo 2

*Two waves of proteasome-dependent protein degradation in the hippocampus are required for recognition memory consolidation* (Neurobiology of Learning and Memory 2015;120:1-6)



## Two waves of proteasome-dependent protein degradation in the hippocampus are required for recognition memory consolidation



Luciana S. Figueiredo<sup>a,b,1</sup>, Arethusa S. Dornelles<sup>b,c,d,1</sup>, Fernanda S. Petry<sup>b,c,d</sup>, Lucio Falavigna<sup>a</sup>, Vinicius A. Dargél<sup>a</sup>, Luiza M. Köbe<sup>a</sup>, Cristiano Aguzzoli<sup>a</sup>, Rafael Roesler<sup>b,c,d</sup>, Nadja Schröder<sup>a,b,\*</sup>

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

<sup>b</sup> National Institute for Translational Medicine, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 August 2014

Revised 21 January 2015

Accepted 6 February 2015

Available online 14 February 2015

#### Keywords:

Proteasome

Lactacystin

Protein degradation

Hippocampus

Object recognition

Recognition memory

### ABSTRACT

Healthy neuronal function and synaptic modification require a concert of synthesis and degradation of proteins. Increasing evidence indicates that protein turnover mediated by proteasome activity is involved in long-term synaptic plasticity and memory. However, its role in different phases of memory remains debated, and previous studies have not examined the possible requirement of protein degradation in recognition memory. Here, we show that the proteasome inhibitor, lactacystin (LAC), infused into the CA1 area of the hippocampus at two specific time points during consolidation, impairs 24-retention of memory for object recognition in rats. Administration of LAC after retrieval did not affect retention. These findings provide the first evidence for a requirement of proteasome activity in recognition memory, indicate that protein degradation in the hippocampus is necessary during selective time windows of memory consolidation, and further our understanding of the role of protein turnover in memory formation.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The formation and storage of new memories involve synapse remodeling. It is currently well established that gene expression and protein synthesis triggered by learning events mediate changes in synapse structure and activity associated with memory formation (Alberini, 2009; Costa-Mattioli, Sossin, Klann, & Sonenberg, 2009; Kandel, Dudai, & Mayford, 2014; McGaugh, 2000). However, normal neuronal function and synaptic modification depend not only on synthesis, but also on the degradation of proteins (Bingol & Sheng, 2011). Thus, increasing attention has been devoted to understanding the role of protein turnover in synaptic plasticity and memory. Protein turnover in neurons is regulated at multiple levels. One major mechanism is the attachment of multiple ubiquitin molecules to lysine residues in a protein, which signals for protein degradation by the proteasome, a proteolytic organelle (Bingol & Sheng, 2011; Yi & Ehlers, 2005).

Proteasome inhibition leads to protein accumulation, ultimately resulting in alterations in intracellular signaling and synapse function and reorganization (Ehlers, 2003; Patrick, 2006).

A growing number of studies have shown a role for the ubiquitin–proteasome system (UPS) in mammalian synaptic plasticity and memory. The proteasome inhibitor MG132 inhibits the early and late phases of long-term potentiation (LTP) in the CA1 area of the rat dorsal hippocampus (Karpova, Mikhaylova, Thomas, Knöpfel, & Behnisch, 2006), whereas another, more specific inhibitor, lactacystin (LAC), enhances early-phase but blocks late-phase hippocampal LTP (Dong, Upadhyaya, Ding, Smith, & Hegde, 2008; Fonseca, Vabulas, Hartl, Bonhoeffer, & Nägerl, 2006). LAC given after behavioral training in rats impairs the consolidation of memory for inhibitory avoidance when infused into the CA1 area (Lopez-Salon et al., 2001), taste aversion when administered into either the amygdala or the insular cortex (Rodríguez-Ortiz, Balderas, Saucedo-Alquicira, Cruz-Castañeda, & Bermudez-Rattoni, 2011), cued and contextual fear conditioning when given into the amygdala (Jarome, Werner, Kwapis, & Helmstetter, 2011), and trace fear conditioning when infused into the prefrontal cortex (Reis, Jarome, & Helmstetter, 2013). In addition, LAC administration into the CA3 hippocampal region hinders the consolidation of spatial memory in

\* Corresponding author at: Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12D, Sala 340, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 33203612.

E-mail address: [nadja.schroder@pucrs.br](mailto:nadja.schroder@pucrs.br) (N. Schröder).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

mice (Artinian et al., 2008). The levels of ubiquitinated synaptic proteins increase in different brain areas after either inhibitory avoidance training (Lopez-Salon et al., 2001) or fear conditioning (Jarome et al., 2011; Reis et al., 2013) in rats.

In spite of this evidence, there is still controversy regarding the need for proteasome activity in the formation of new memories. One study found that LAC infusion into the CA1 area of the hippocampus blocked the extinction of fear conditioning and prevented the memory-impairing effect of the protein synthesis inhibitor anisomycin when given after retrieval, but did not affect memory formation when administered after training. Thus, it was proposed that protein degradation plays a specific role in the destabilization of preexisting memories, allowing their modification by reconsolidation or extinction, but may not be required for the consolidation of memories for novel learning experiences (Lee et al., 2008). A role for protein degradation in memory extinction and reconsolidation is also supported by other studies (Artinian et al., 2008; Lee et al., 2012; Ren et al., 2013). Thus, the characterization of the involvement of protein degradation in memory consolidation, as opposed to its modification after retrieval, warrants further investigation.

Moreover, previous studies have not examined the possible role of protein degradation in recognition memory. Over the past years, the object recognition task has been extensively used in the investigation of the biological basis of memory in healthy rodents, as well as in studies focusing on memory dysfunction associated with brain disorders and the effects of potential therapeutic agents (Dere, Huston, & De Souza Silva, 2007; Ennaceur, 2010; Ennaceur & Delacour, 1988; Lyon, Saksida, & Bussey, 2012). Formation of memory for object recognition requires the dorsal hippocampus (Broadbent, Gaskin, Squire, & Clark, 2010; Clark, Zola, & Squire, 2000; Cohen et al., 2013; de Lima, Luft, Roesler, & Schröder, 2006; Gaskin, Tremblay, & Mumby, 2003), however the molecular pathways involved remain relatively poorly described. Here, we examined the requirement of proteasome activity for the consolidation of object recognition.

## 2. Methods

### 2.1. Subjects

Adult male Wistar rats (225–340 g at time of surgery) were obtained from the institutional breeding facility (CREAL, ICBS, UFRGS). Animals were housed five per cage in plastic cages with sawdust bedding, and maintained on a 12 h light/dark cycle at a room temperature of  $22 \pm 1$  °C. The rats were allowed *ad libitum* access to standardized pellet food and water. All experiments took place between 9 AM and 6 PM. All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI) and were approved by the institutional animal care committee (CEUA-HCPA).

### 2.2. Surgery

Animals were implanted under anesthesia with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (25 mg/kg) with bilateral 14-mm or 9.0-mm, 23-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus, as described in previous studies (de Lima et al., 2006; Jobim et al., 2012). Coordinates anteroposterior,  $-4.3$  mm from bregma; mediolateral,  $\pm 3.0$  mm from bregma; ventral,  $-2.0$  mm from skull surface were obtained from the atlas of Paxinos and Watson (2007). Animals were allowed to recover at least 7 days after surgery.

### 2.3. Drug infusions

General procedures for intrahippocampal infusions were described in previous reports (de Lima et al., 2006; Jobim et al., 2012). At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at the CA1 area. LAC or vehicle (VEH; 2% dimethylsulfoxide, DMSO, in saline) were infused during a 30-s period. The infusion needle was left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the needle tip.

Immediately after, 1.5, 3, or 6 h after object recognition memory training, or immediately after retrieval, rats received a bilateral 1.0- $\mu$ l infusion of VEH or LAC (200  $\mu$ M; Sigma–Aldrich, St. Louis, USA). The dose of LAC was chosen on the basis of previous studies (Artinian et al., 2008; Rodriguez-Ortiz et al., 2011). Drug solutions were freshly prepared before each experiment.

### 2.4. Object recognition

Training and testing took place in a 40 cm  $\times$  50 cm open field surrounded by 50 cm high walls made of plywood with a frontal glass wall. The floor was covered with sawdust. The objects used for exploration were made of plastic Duplo Lego Toys and had a height of about 10 cm (de Lima, Laranja, Bromberg, Roesler, & Schröder, 2005; de Lima et al., 2006; 2011; Dornelles et al., 2007). Objects presented similar textures, colors and sizes, but distinctive shapes. The different objects and their positions were counterbalanced across experiments and behavioral trials, and all objects had a height of about 10 cm. The objects were washed with a 70% ethanol solution between trials. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws, sitting on the object was not considered exploration. General training and test procedures followed the methods described in previous reports (de Lima et al., 2005; 2006; 2011; Jobim et al., 2012; Reolon et al., 2011). Rats were left to explore the empty arena for 5 min in the first day (habituation). Twenty-four hours after habituation, training was conducted by placing individual rats into the field, in which two identical objects (objects A1 and A2) were positioned in two adjacent corners, 10 cm from the walls. Animals were left to explore the objects during 5 min and the time exploring each object was recorded. On memory retention test trials given 24 h after training, rats explored the open field for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. In the experiment using post-retrieval infusions, the 24-h test trial (Test 1) was used as a memory reactivation session, and a second test trial (Test 2) was given 24 h after reactivation. Rats were exposed to a novel object C during Test 2 (Jobim et al., 2012).

### 2.5. Histology

Twenty-four to 72 h after behavioral testing, a 1.0- $\mu$ l infusion of a 4% methylene blue solution was given into the dorsal hippocampus. Rats were sacrificed by decapitation 15 min later, and their brains were removed and stored in 10% formalin for at least 72 h. The brains were sectioned and examined for cannulae placement in the hippocampus. The extension of the methylene blue dye was taken as an approximation of diffusion of the drugs given to each rat. Animals included in the final analysis (123 rats) had bilaterally placed cannula in the intended sites. Infusion placements into the dorsal hippocampus, as revealed by the diffusion of methylene blue, was similar to those described in previous reports (de Lima et al., 2006; Jobim et al., 2012) (data not shown).

## 2.6. Statistics

A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio  $TB/(TA + TB)$  [TA = time spent exploring the familiar object A; TB = time spent exploring the novel object B]. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. exploratory preferences. Comparisons of recognition indexes and total time exploring objects were performed using two-way analysis of variance (ANOVA), with group (VEH or LAC) and time of infusion (immediately, 1.5, 3, and 6 h posttraining) as fixed factors. Tukey HSD *post hoc* tests were carried out when necessary. Independent samples *t* test was used to compare test recognition indexes of groups within a time point. In the experiment using post-retrieval infusions, recognition indexes and total time exploring both objects in training, Test 1 and Test 2 were compared by repeated measures ANOVA. In all comparisons,  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## 3. Results

### 3.1. Proteasome inhibition in the hippocampus impairs consolidation of recognition memory at two specific time windows after training

The first experiment was designed to examine the effects of LAC, infused at different time points after training, on the consolidation of object recognition memory. Rats were trained and given an infusion of VEH or LAC into the CA1 hippocampal area immediately, 1.5, 3, or 6 h after training. A retention test was carried out 24 h later. Two-way ANOVA showed no statistically significant differences when comparing the total time exploring both objects in training and testing sessions (Table 1) or training recognition indexes. However, there was a significant main effect of group ( $F_{(1, 91)} = 17.66, p < 0.0001$ ) and time of infusion ( $F_{(3, 91)} = 16.61, p < 0.0001$ ). Also, an interaction between group and time of infusion ( $F_{(3, 91)} = 5.67, p = 0.001$ ) was observed. *Post hoc* tests comparing recognition indexes of different time points of LAC infusions have indicated that groups that received infusions immediately posttraining were not significantly different from the groups that received infusions 3 h after training ( $p = 0.73$ ). However, these groups were significantly different from the groups that received infusions at 1.5 and 6 h after training ( $p = 0.010$  and  $p < 0.0001$ , respectively).

Further comparisons between groups at each infusion time point using *t*-tests indicated that LAC ( $N = 15$ ), when injected immediately after training, significantly impaired retention compared to VEH-injected controls ( $N = 13$ ), as shown by a reduced test performance assessed by the recognition index ( $t_{(26)} = 4.7, p < 0.0001$ ) (Fig. 1A). No effect of LAC was observed when LAC was infused 1.5 h after training (comparisons between LAC- and VEH-treated groups ( $N = 12$  and  $N = 11$  respectively;  $t_{(21)} = -0.19, p = 0.80$ , Fig. 1B). However, LAC impaired 24-h retention when given 3 h after training (test performance compared to VEH-treated controls,  $t_{(19)} = 3.13, p = 0.006$ ; VEH,  $N = 9$ , LAC,  $N = 12$ ; Fig. 1C). When injected 6 h after training, LAC again failed to alter retention (VEH,  $N = 13$ , LAC,  $N = 14$ ;  $t_{(25)} = 0.29, p = 0.77$ ; Fig. 1D). These results indicate that LAC-induced inhibition of hippocampal proteasome induces a biphasic impairment of recognition memory, acting in two specific time windows during consolidation.

### 3.2. Hippocampal proteasome inhibition after retrieval does not affect recognition memory

In order to verify whether LAC would affect processes related to the reconsolidation of memory for object recognition (Jobim et al., 2012), rats were trained and tested for retention 1 day later (Test

**Table 1**

Total time (mean  $\pm$  S.E.M. s) exploring both objects during object recognition training and 24-h test, in rats given infusions of vehicle (VEH) or lactacystin (LAC) into the hippocampus immediately or 1.5, 3, or 6 h after training.

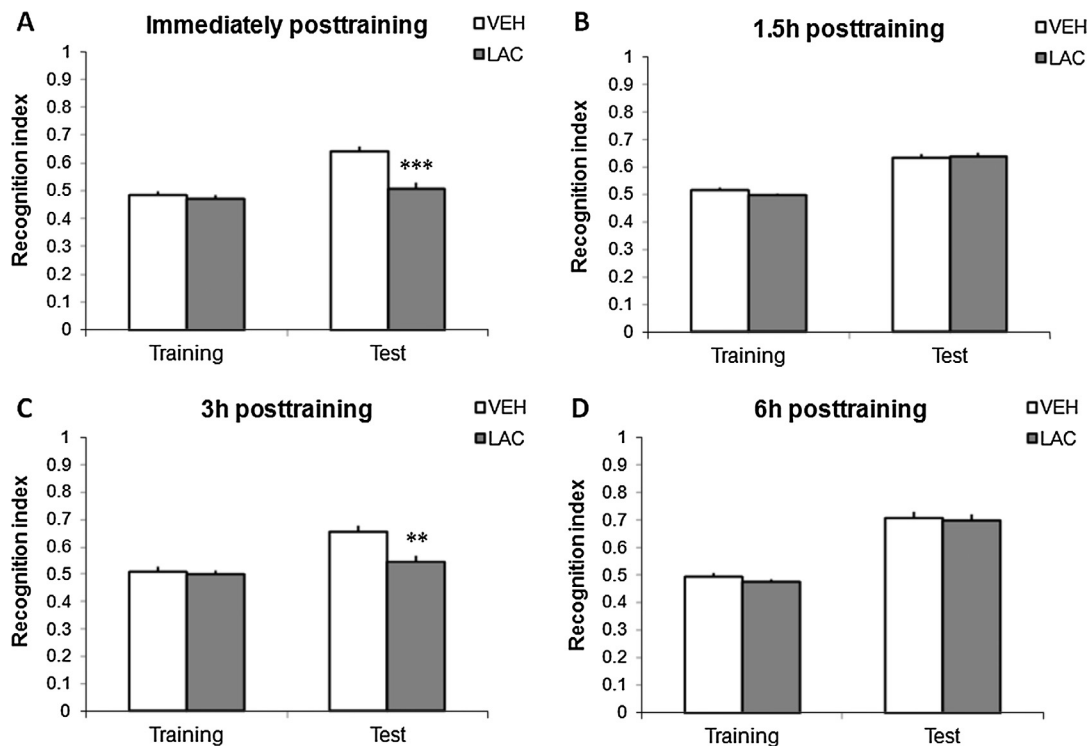
Group	Mean $\pm$ S.E.M. total time (s) exploring both objects		
<i>Immediately posttraining</i>			
	N	Training	24 h test
VEH	13	44.97 $\pm$ 3.48	49.59 $\pm$ 4.09
LAC	15	39.84 $\pm$ 2.68	42.67 $\pm$ 4.11
<i>1.5 h posttraining</i>			
	N	Training	24 h test
VEH	12	42.99 $\pm$ 2.93	33.92 $\pm$ 2.29
LAC	11	48.75 $\pm$ 2.91	35.85 $\pm$ 2.95
<i>3 h posttraining</i>			
	N	Training	24 h test
VEH	9	47.59 $\pm$ 3.28	38.29 $\pm$ 2.68
LAC	12	42.07 $\pm$ 2.09	35.25 $\pm$ 4.37
<i>6 h posttraining</i>			
	N	Training	24 h test
VEH	13	54.82 $\pm$ 4.90	46.56 $\pm$ 3.81
LAC	14	48.19 $\pm$ 4.52	47.93 $\pm$ 4.45

1). Immediately after Test 1, an infusion of VEH ( $N = 11$ ) or LAC ( $N = 11$ ) was given into the hippocampus. Retention was tested again 1 day after the infusion (Test 2) (Fig. 2). Repeated measures ANOVA revealed no significant effect of drug infusion, and no interaction between drug infusion (VEH or LAC) and behavioral trials (training  $\times$  test 1  $\times$  test 2). However, a significant main effect of sessions was observed ( $F_{(1.33, 13.34)} = 33.05, p < 0.0001$ ). Pairwise comparisons indicated that recognition indexes of both Test 1 and Test 2 were statistically different from training session's recognition index (both  $p$ 's  $< 0.0001$ ). Moreover, statistical comparison of Test 1 and Test 2 recognition indexes revealed no significant difference. There were no significant differences in total exploration times (Table 2). These results indicate that groups presented memory retention at both testing sessions, and proteasome inhibition after retrieval did not affect recognition memory.

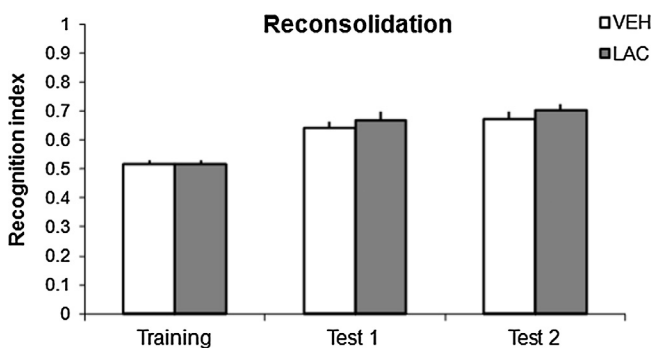
## 4. Discussion

Our findings suggesting a role for protein degradation in memory consolidation are in line with increasing evidence indicating a critical role for UPS activity in synaptic modifications related to the establishment of long-lasting neural plasticity and memory (Artinian et al., 2008; Chain, Hegde, Yamamoto, Liu-Marsh, & Schwartz, 1995; Dong et al., 2008; Fonseca et al., 2006; Hegde et al., 1997; Jarome et al., 2011; Karpova et al., 2006; Lopez-Salon et al., 2001; Reis et al., 2013; Rodriguez-Ortiz et al., 2011). According to the current model, a balance between the synthesis of "positive" effector proteins and degradation of "negative" effector proteins is necessary for successful synaptic plasticity and memory formation. Protein degradation is regulated by neuronal activity, so that the induction of plasticity may increase proteasome activity and target "negative" proteins for degradation, allowing the synthesis of "positive" proteins (Bingol & Sheng, 2011; Ehlers, 2003; Fonseca et al., 2006).

Perhaps the most interesting aspect of our findings is the determination of two periods for sensitivity to proteasome inhibition during consolidation. Remarkably, these periods parallel the pattern of sensitivity to protein synthesis inhibitors during formation of memory for fear-motivated tasks. Twenty-four-h memory of contextual fear in mice trained with a weak conditioning protocol is impaired by anisomycin injections given immediately or 4 h, but not 1 h, after training (Bourtchouladze et al., 1998). When anisomycin is infused into the CA1 area, it impairs 24-h retention of inhibitory avoidance if given before or 3 h after training, but not



**Fig. 1.** Proteasome inhibition in the dorsal hippocampus impairs recognition memory consolidation. Rats were trained and tested for retention 24 h later. Vehicle (VEH) or lactacystin (LAC) was infused into the CA1 area of the hippocampus (A) immediately, (B) 1.5 h, (C) 3 h, or (D) 5 h after training. Data are expressed as recognition index, defined as mean  $\pm$  S.E.M. ratio TB/(TA + TB) [TA = time spent exploring the familiar object A; TB = time spent exploring the novel object B]. The number of rats in each group and total exploration times are shown in Table 1. Rats given LAC immediately or 3 h after training, but not at 1.5 or 6 h after training, showed significantly impaired retention compared to controls (t test comparisons; for complete statistical analysis, please see the Results section); \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.0001$  compared to control rats in the same trial.



**Fig. 2.** Proteasome inhibition in the dorsal hippocampus after retrieval does not affect recognition memory. Rats were trained and tested (Test 1) 24 h later. Vehicle (VEH) or lactacystin (LAC) was infused into the CA1 area of the hippocampus immediately after Test 1. Retention was measured in a second test trial (Test 2) carried out 24 h after Test 1. Data are expressed as exploratory preferences, defined as mean  $\pm$  S.E.M. ratio TB/(TA + TB) [TA = time spent exploring the familiar object A; TB = time spent exploring the novel object B]. The number of rats in each group and total exploration times are shown in Table 2. There were no significant differences between groups.

**Table 2**

Total time (mean  $\pm$  S.E.M. s) exploring both objects during object recognition training, 24-h test (Test 1), and 48-h test (Test 2), in rats given infusions of vehicle (VEH) or lactacystin (LAC) into the hippocampus immediately after Test 1.

Group	N	Mean $\pm$ S.E.M. total time (s) exploring both objects		
		Training	Test 1	Test 2
VEH	11	53.54 $\pm$ 3.19	48.98 $\pm$ 2.75	49.79 $\pm$ 3.91
LAC	11	48.81 $\pm$ 8.26	53.66 $\pm$ 7.61	48.25 $\pm$ 14.26

1.5 or 6 h after training (Quevedo et al., 1999). A similar two-window pattern is observed for sensitivity to histone deacetylase (HDAC) inhibition, which regulates gene expression related to memory formation, infused into the hippocampus after training (Blank et al., 2014). In experiments using the object recognition task, intrahippocampal anisomycin was shown to produce memory impairment when infused immediately or 3 h, but not 6 h, after training (Rossato et al., 2007). These findings are consistent with the interesting possibility that the temporal requirement for hippocampal gene expression and protein synthesis during memory consolidation is coincident with the need for protein degradation. Such a requirement for orchestrated synthesis and degradation of proteins at exactly the same time windows warrants further characterization. One possible mechanism is that initiation of protein synthesis requires degradation of proteins that act as negative regulators of translation and inhibitory constraints on synaptic plasticity (Ashraf, McLoon, Scarsic, & Kunes, 2006; Bingol & Sheng, 2011). For example, proteasome-dependent degradation leads to loss of inhibitory proteins and stimulation of gene expression and translation, thus enhancing the initiation and consolidation of long-term facilitation in *Aplysia* (Chain et al., 1995; Hegde et al., 1997).

It has been proposed that proteasome-dependent protein degradation could be selectively involved in destabilizing preexisting memories, thus allowing their modification through reconsolidation (Kaang & Choi, 2011; Lee et al., 2008; 2012). Postsynaptic proteins in the hippocampus after retrieval of contextual fear have been found to be degraded by polyubiquitination, and proteasome inhibition in the CA1 area immediately after retrieval prevented anisomycin-induced impairment of reconsolidation (Lee et al., 2008). These data suggest that retrieval can trigger a destabilization process involving active loss of components maintaining the

memory, followed by reconsolidation requiring new protein synthesis (Kaang & Choi, 2011). In the light of this evidence, the lack of effect of post-retrieval LAC in the present study does not necessarily indicate that proteasome activity is not involved in reconsolidation. Instead, it might be viewed as consistent with a requirement for protein degradation in a destabilization phase that precedes memory reorganization. Under proteasome blockade by LAC, the retrieved memory remains stable and is not modified after recall.

Although well established in spatial and contextual memories, the role of the hippocampus in nonspatial object recognition remains controversial. In spite of many studies showing that reversible inhibition of the hippocampus leads to recognition memory disruption, it has been proposed, mostly on the basis of evidence from studies using permanent lesions, that these effects could be related to the spatial or contextual aspects associated with the task rather than the recognition component per se (Ainge et al., 2006; Barker & Warburton, 2011; Duva et al., 1997; Forwood, Winters, & Bussey, 2005; Mumby, Gaskin, Glenn, Schramek, & Lehmann, 2002). However, it is becoming increasingly evident that hippocampal activity is crucial for enabling specific stages during recognition memory formation, even when the contextual and spatial components of the task are removed. For example, a recent study using muscimol-induced temporary inactivation of the hippocampus at different time points during object recognition memory formation and retrieval in mice showed that hippocampal activity is required when the objects are presented in different contexts (Cohen et al., 2013). Object recognition learning is accompanied by alterations in hippocampal function, including transient potentiation of CA3–CA1 synapses (Clarke, Cammarota, Gruart, Izquierdo, & Delgado-García, 2010), increased neuronal firing rates, and extracellular levels of glutamate (Cohen et al., 2013). Together with these and several other previous studies (Broadbent et al., 2010; Clark et al., 2000; de Lima et al., 2006; Gaskin et al., 2003; Hammond, Tull, & Stackman, 2004; Jobim et al., 2012), the present findings support a critical role for the dorsal hippocampus in mediating the consolidation of object recognition memory.

The hippocampus has also been implicated in reconsolidation of recognition memory. Intrahippocampal infusion of a mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) prior to retrieval impairs retention (Kelly, Laroche, & Davis, 2003). In addition, administration of anisomycin into the CA1 area immediately after a retrieval trial in which rats were exposed to a novel and a familiar object resulted in impaired retention (Rossato et al., 2007). Furthermore, we have previously shown, under experimental conditions similar to the ones used in the present study, that recognition memory reconsolidation is impaired by rapamycin inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR), a central regulator of neuronal mRNA translation and protein synthesis, in either the CA1 hippocampal area or the amygdala (Jobim et al., 2012). In light of these findings, as well as the role of proteasome-dependent protein degradation in reconsolidation processes reported for other tasks (Artinian et al., 2008; Lee et al., 2008; Ren et al., 2013), the lack of effect of LAC when given after retrieval in the present study is somewhat surprising. Further experiments will be required to clarify whether there is no requirement of proteasome activity for the reconsolidation of object recognition or, alternatively, its role can be revealed under different experimental conditions.

In summary, the present findings provide the first evidence for a requirement of proteasome activity in recognition memory, and indicate that protein degradation in the hippocampus is necessary during two specific time windows during memory consolidation.

## Acknowledgments

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Grant Numbers 308144/2012-0 to N.S., 484185/2012-8 and 303276/2013-4 to R.R.); PNPd CAPES/HCPA 0130110 (to R.R. and A.S.D.); the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM); and the HCPA institutional research fund (FIPE/HCPA). L.F. is recipient of a PRO-BIC/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.

## References

- Ainge, J. A., Heron-Maxwell, C., Theofilas, P., Wright, P., de Hoz, L., & Wood, E. R. (2006). The role of the hippocampus in object recognition in rats: Examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behavioural Brain Research*, *167*, 183–195.
- Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, *89*, 121–145.
- Artinian, J., McGauran, A. M., De Jaeger, X., Mouldedous, L., Frances, B., & Roulet, P. (2008). Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. *European Journal of Neuroscience*, *27*, 3009–3019.
- Ashraf, S. I., McLoon, A. L., Sclarsic, S. M., & Kunes, S. (2006). Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell*, *124*, 191–205.
- Barker, G. R., & Warburton, E. C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *Journal of Neuroscience*, *31*, 10721–10731.
- Bingol, B., & Sheng, M. (2011). Deconstruction for reconstruction: The role of proteolysis in neural plasticity and disease. *Neuron*, *69*, 22–32.
- Blank, M., Dornelles, A. S., Werenicz, A., Velho, L. A., Pinto, D. F., Fedi, A. C., et al. (2014). Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *111*, 1–8.
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., & Kandel, E. R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learning & Memory*, *5*, 365–374.
- Broadbent, N. J., Gaskin, S., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2010). Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory*, *17*, 5–11.
- Chain, D. G., Hegde, A. N., Yamamoto, N., Liu-Marsh, B., & Schwartz, J. H. (1995). Persistent activation of cAMP-dependent protein kinase by regulated proteolysis suggests a neuron-specific function of the ubiquitin system in *Aplysia*. *Journal of Neuroscience*, *15*, 7592–7603.
- Clark, R. E., Zola, S. M., & Squire, L. R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *20*, 8853–8860.
- Clarke, J. R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., & Delgado-García, J. M. (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, *107*, 2652–2657.
- Cohen, S. J., Munchow, A. H., Rios, L. M., Zhang, G., Asgeirsdóttir, H. N., & Stackman, R. W. Jr. (2013). The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Current Biology*, *23*, 1685–1690.
- Costa-Mattioli, M., Sossin, W. S., Klann, E., & Sonenberg, N. (2009). Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*, *61*, 10–26.
- de Lima, M. N., Laranja, D. C., Bromberg, E., Roesler, R., & Schröder, N. (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research*, *156*, 139–143.
- de Lima, M. N., Luft, T., Roesler, R., & Schröder, N. (2006). Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neuroscience Letters*, *405*, 142–146.
- de Lima, M. N., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Scalco, F. S., Roesler, R., Garcia, V. A., et al. (2011). Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *95*, 305–310.
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *31*, 673–704.
- Dong, C., Upadhyay, S. C., Ding, L., Smith, T. K., & Hegde, A. N. (2008). Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. *Learning & Memory*, *15*, 335–347.
- Dornelles, A., de Lima, M. N., Graziotin, M., Presti-Torres, J., Garcia, V. A., Scalco, F. S., et al. (2007). Adrenergic enhancement of consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *88*, 137–142.
- Duva, C. A., Floresco, S. B., Wunderlich, G. R., Lao, T. L., Pineda, J. P., & Phillips, A. G. (1997). Disruption of spatial but not object-recognition memory by neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus in rats. *Behavioral Neuroscience*, *111*, 1184–1196.
- Ehlers, M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin–proteasome system. *Nature Neuroscience*, *6*, 231–242.



- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215, 244–254.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31, 47–59.
- Fonseca, R., Vabulas, R. M., Hartl, F. U., Bonhoeffer, T., & Nägerl, U. V. (2006). A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron*, 52, 239–245.
- Forwood, S. E., Winters, B. D., & Bussey, T. J. (2005). Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus*, 15, 347–355.
- Gaskin, S., Tremblay, A., & Mumby, D. G. (2003). Retrograde and anterograde object recognition in rats with hippocampal lesions. *Hippocampus*, 13, 962–969.
- Hammond, R. S., Tull, L. E., & Stackman, R. W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82, 26–34.
- Hegde, A. N., Inokuchi, K., Pei, W., Casadio, A., Ghirardi, M., Chain, D. G., et al. (1997). Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. *Cell*, 89, 115–126.
- Jarome, T. J., Werner, C. T., Kwapis, J. L., & Helmstetter, F. J. (2011). Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala. *PLoS ONE*, 6, e24349.
- Jobim, P. F., Pedroso, T. R., Werenicz, A., Christoff, R. R., Maurmann, N., Reolon, G. K., et al. (2012). Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation. *Behavioural Brain Research*, 228, 151–158.
- Kaang, B. K., & Choi, J. H. (2011). Protein degradation during reconsolidation as a mechanism for memory reorganization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 2.
- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157, 163–186.
- Karpova, A., Mikhaylova, M., Thomas, U., Knöpfel, T., & Behnisch, T. (2006). Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *Journal of Neuroscience*, 26, 4949–4955.
- Kelly, A., Laroche, S., & Davis, S. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Journal of Neuroscience*, 23, 5354–5360.
- Lee, S. H., Choi, J. H., Lee, N., Lee, H. R., Kim, J. I., Yu, N. K., et al. (2008). Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*, 319, 1253–1256.
- Lee, S. H., Kwak, C., Shim, J., Kim, J. E., Choi, S. L., Kim, H. F., et al. (2012). A cellular model of memory reconsolidation involves reactivation-induced destabilization and restabilization at the sensorimotor synapse in Aplysia. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 109, 14200–14205.
- Lopez-Salon, M., Alonso, M., Vianna, M. R., Viola, H., Mello e Souza, T., Izquierdo, I., et al. (2001). The ubiquitin–proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *European Journal of Neuroscience*, 14, 1820–1826.
- Lyon, L., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2012). Spontaneous object recognition and its relevance to schizophrenia: A review of findings from pharmacological, genetic, lesion and developmental rodent models. *Psychopharmacology*, 220, 647–672.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory: A century of consolidation. *Science*, 287, 248–251.
- Mumby, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E., & Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: Memory for objects, places, and contexts. *Learning & Memory*, 9, 49–57.
- Patrick, G. N. (2006). Synapse formation and plasticity: Recent insights from the perspective of the ubiquitin proteasome system. *Current Opinion in Neurobiology*, 16, 90–94.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.). San Diego: Academic Press.
- Quevedo, J., Vianna, M. R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., & Rose, S. P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learning & Memory*, 6, 600–607.
- Reis, D. S., Jarome, T. J., & Helmstetter, F. J. (2013). Memory formation for trace fear conditioning requires ubiquitin–proteasome mediated protein degradation in the prefrontal cortex. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 150.
- Ren, Z. Y., Liu, M. M., Xue, Y. X., Ding, Z. B., Xue, L. F., Zhai, S. D., et al. (2013). A critical role for protein degradation in the nucleus accumbens core in cocaine reward memory. *Neuropsychopharmacology*, 38, 778–790.
- Reolon, G. K., Maurmann, N., Werenicz, A., Garcia, V. A., Schröder, N., Wood, M. A., et al. (2011). Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behavioural Brain Research*, 221, 329–332.
- Rodriguez-Ortiz, C. J., Balderas, I., Saucedo-Alquicira, F., Cruz-Castañeda, P., & Bermudez-Rattoni, F. (2011). Long-term aversive taste memory requires insular and amygdala protein degradation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95, 311–315.
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Myskiw, J. C., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning & Memory*, 14, 36–46.
- Yi, J. J., & Ehlers, M. D. (2005). Ubiquitin and protein turnover in synapse function. *Neuron*, 47, 629–632.

#### 4.3 Artigo 3

*Iron loading selectively increases hippocampal levels of ubiquitinated proteins and impairs hippocampus-dependent memory* (Molecular Neurobiology) (SUBMETIDO em 29 de julho)

Manuscript  
[Click here to download Manuscript: Figueiredo et al 2015.doc](#)

*Molecular Neurobiology*

Iron loading selectively increases hippocampal levels of ubiquitinated proteins and impairs hippocampus-dependent memory

Luciana Silva Figueiredo · Betânia Souza de Freitas · Vanessa Alhaide Garcia · Vinicius Ayub Dargél · Luiza Machado Köbe · Luiza Wilges Kist · Mauricio Reis Bogo · Nadja Schröder

L. S. Figueiredo · B. S. de Freitas · V. A. Garcia · V. A. Dargél · L. M. Köbe  
Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences,  
Pontifical Catholic University, Porto Alegre, RS, Brazil

M. R. Bogo · L. W. Kist  
Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia  
Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul - PUCRS, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto  
Alegre, RS, Brazil.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, Avenida Ipiranga, 6690,  
90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

N. Schröder (✉)  
Faculty of Biosciences  
Pontifical Catholic University  
Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12D, Sala 301  
90619-900  
Porto Alegre, RS, Brazil  
Phone number: +55 51 3353 4743      Email: [nadja.schroder@pucrs.br](mailto:nadja.schroder@pucrs.br)

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças neurodegenerativas compartilham uma característica comum, a agregação e deposição de proteína anormal. Os neurônios são particularmente vulneráveis aos efeitos tóxicos das proteínas mal formadas. Essa característica comum das doenças neurodegenerativas sugere tratamentos semelhantes, baseados no mecanismo de eliminação de proteínas mutantes e mal formadas, potencialmente nocivas (Taylor *et al*, 2002; Jellinger, 2009).

O UPS é a principal via responsável pela degradação extralissossomal altamente regulada de proteínas e está envolvido na regulação da sinalização celular, plasticidade sináptica e, na aprendizagem e na memória. O mau funcionamento do UPS resulta em graves alterações celulares e, se persistente, pode levar à morte celular (Wong and Cuervo, 2011; Hegde and Upadhy, 2011).

A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos no hipocampo e outras estruturas cerebrais que compreendem diversas fases e requerem entre 3 a 8 horas. Enquanto esses processos não estiverem concluídos, as memórias de longa duração são lábeis. Essa formação de memórias de longo prazo ocorre em etapas, envolvendo aquisição e consolidação. Sem dúvida, a transcrição gênica e a tradução são necessárias, mas resultados recentes indicam que a degradação de proteínas pode ser igualmente importante. Juntamente com a síntese proteica, as proteínas de degradação regulam a força de modulação sináptica e plasticidade e, em última análise, a formação da memória (Fioravante and Byrne, 2011). Analisando os resultados, podemos sugerir que a LAC inibiu o UPS, bloqueando a formação de LTM em dois momentos após o treino no teste de reconhecimento do objeto, mostrando-se necessário para a consolidação da memória sugerindo que o uso do inibidor do proteassoma induz a uma inibição temporária do

proteassoma nos períodos de consolidação da memória. Foi, pela primeira vez demonstrado, que o UPS está envolvido na memória de reconhecimento.

A proteólise pelo UPS é reconhecida como um mecanismo molecular que controla inúmeras funções normais do sistema nervoso. Além disso, esta via está intimamente ligada a muitas doenças e distúrbios do cérebro (Hegde and Upadhya, 2011). Estudos indicam que a atividade do proteassoma é prejudicada no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer e, é provável que essa perda de atividade ocorra em outras doenças neurodegenerativas (Keller *et al*, 2000). A patologia de doenças neurodegenerativas é caracterizada pelo depósito anormal de agregados proteicos insolúveis ou corpos de inclusão dentro dos neurônios. Acredita-se que os agregados de proteínas ubiquitinadas resultam de disfunções no funcionamento do UPS ou de mudanças estruturais nos substratos de proteínas que impedem o seu reconhecimento e degradação pela UPS (Hegde and Upadhya, 2011).

O modelo animal de sobrecarga de ferro neonatal usado no estudo, permite demonstrar que a deposição neonatal de ferro no cérebro produz disfunção cognitiva na vida adulta. Nesse modelo, também já foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa, que ocorre acúmulo de ferro cerebral, aumento do estresse oxidativo, aumento de marcadores apoptóticos, gliose reativa e alterações sinápticas e mitocondriais. Nesse trabalho, confirmamos resultados anteriores de que o ferro administrado no período neonatal, afeta tanto a memória de reconhecimento, verificada no teste de reconhecimento do objeto, quanto à memória, verificada no teste de esquia inibitória, uma tarefa aversiva, motivada pelo medo (artigo submetido). Esses dois tipos de memória são hipocampo-dependentes (Izquierdo and Medina, 1997). No entanto, a aquisição da memória não é afetada, visto que não há diferença significativa entre o índice de reconhecimento e o tempo total na exploração do objeto (artigo submetido). Ao se analisar os resultados dos experimentos em conjunto pode-se inferir que a administração de baixas quantidades de ferro por um período curto em uma fase suscetível da

vida é capaz de produzir efeitos comportamentais que podem estar relacionados com processos neurodegenerativos manifestados na fase adulta.

A fim de compreender melhor os mecanismos envolvidos nos déficits de memória induzidos pelo ferro e, a fim de confirmar se o envolvimento do UPS na memória poderia ser um dos mecanismos afetados no modelo animal de sobrecarga neonatal, nós investigamos os efeitos imediatos e a longo prazo da sobrecarga de ferro nos níveis de proteínas poliubiquitinadas no hipocampo e no córtex. Os níveis de proteína poliubiquitinadas no hipocampo se mostraram aumentados nos animais adultos, tratados com ferro no período neonatal, o que sugere que o ferro impede a degradação de proteína através do UPS. Parece ser um dano seletivo no hipocampo, já que no córtex não foi encontrada esta diferença, isto pode estar relacionado com as alterações em memórias dependentes do hipocampo. Recentemente, foi sugerido que a exposição a níveis elevados de ferro durante um período crítico pode resultar em acúmulo e/ou redistribuição de ferro no cérebro que continua com o processo de envelhecimento (Hare *et al*, 2015). Assim, o dano oxidativo de proteínas induzido pelo ferro pode estar relacionado com o aumento dos níveis de proteínas poliubiquitinadas observados no presente estudo (artigo submetido).

Com relação aos efeitos relacionados à idade, também no hipocampo, houve um aumento na expressão proteica da subunidade  $\beta 2$  do proteassoma nos animais adultos. Com relação à expressão gênica no hipocampo, as subunidades  $\beta 1$  e  $\beta 5$  se mostraram aumentadas nas fases iniciais do desenvolvimento. O tratamento com ferro não teve efeito sobre os níveis de expressão proteica ou gênica das subunidades do proteassoma no hipocampo. Os nossos resultados sugerem que o ferro, administrado no período neonatal prejudica seletivamente o UPS no hipocampo na idade adulta, mas não imediatamente após o tratamento (artigo submetido). Esses achados corroboram com resultados anteriores relatados por nosso grupo

de pesquisa, que mostram que os aumentos do estresse oxidativo e marcadores apoptóticos no hipocampo induzidos pelo ferro ocorrem na idade adulta.

Com relação aos níveis de proteína das subunidades do proteassoma no córtex, não houve diferenças entre os grupos de tratamento quando analisados no período neonatal ou na idade adulta. A expressão gênica das três subunidades foi maior no córtex dos animais adultos se comparado com o período neonatal. Tomados em conjunto, estes dados sugerem fortemente que há uma expressão diferencial das subunidades catalíticas do proteassoma durante o desenvolvimento, quando se comparam os períodos neonatal e adulto, tanto no córtex quanto no hipocampo (artigo submetido).

O efeito relacionado à idade nos níveis de proteínas poliubiquitinadas e das subunidades do proteassoma aqui observado, foi anteriormente relatado. Muitos estudos mostram que a atividade do UPS diminui com a idade, provavelmente devido a alterações na expressão do proteassoma, alterações nas moléculas modulatórias e mudanças nos substratos do proteassoma (Martinez Vicente *et al*, 2005). A maioria dos estudos compara ratos adultos com idosos (20-24 meses de idade). Podemos, portanto, supor que a comparação da atividade do UPS entre ratos neonatais e adultos poderiam apresentar o mesmo padrão, onde os ratos mais velhos mostram níveis mais elevados de proteínas ubiquitinadas. Seria interessante incluir em nosso estudo, um terceiro ponto de tempo em que cérebros de ratos idosos fossem analisados. Este é o primeiro estudo a investigar o UPS em cérebros de ratos neonatos e também, o primeiro estudo a investigar as subunidades do proteassoma comparando as idades neonatal e adulta. À medida que não observaram nenhum efeito do tratamento com ferro na expressão de subunidades de proteassoma, podemos sugerir que o ferro conduz seletivamente ao mau funcionamento do UPS no hipocampo, como observado pelos níveis mais elevados das proteínas de poliubiquitina, sem interferir na expressão das subunidades da proteassoma (artigo submetido).

Em conclusão, os nossos resultados indicam que a exposição de ferro por um curto período numa janela crítica do desenvolvimento prejudica de forma duradoura o funcionamento do proteassoma sem afetar a expressão das suas subunidades catalíticas. Foram observadas em nosso modelo, a presença de proteínas poliubiquitinadas no hipocampo juntamente com déficits de memória. Dado que a degradação de proteínas via UPS tem sido considerada um passo fundamental na consolidação da memória, o seu mau funcionamento pode estar relacionado a déficits cognitivos associados com doenças neurodegenerativas, fornecendo evidências de que o UPS pode ser considerado como um alvo para o tratamento de déficits de memória. Este estudo também mostra evidências de que a exposição de ferro no início da vida pode ter consequências a longo prazo, contribuindo como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

## 6 BIBLIOGRAFIA

Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaudet AL (1997) Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons. **Nature Genetics**, 17:75-78.

Anderson C, Crimmins S, Wilson JA, Korbel GA, Ploegh HL, Wilson SM (2005) Loss of Usp14 results in reduced levels of ubiquitin in ataxia mice. **Journal of Neurochemistry**, 95:724-731.

Arnaud L, Robakis NK, Figueiredo-Pereira ME (2006) It may take inflammation, phosphorylation and ubiquitination to 'tangle' in Alzheimer's disease. **Journal of Neurodegenerative Diseases**, 3:313-319.

Artinian J, McGauran AMT, De Jaeger X, Mouldous L, Frances B, Roulet P (2008) Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. **European Journal of Neuroscience**, 27:3009-3019.

Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilacqua LR, Izquierdo I, Medina JH (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, 53:261-277.

Betarbet R, Canet-Aviles RM, Sherer TB, Mastroberardino PG, McLendon C, Kim JH, Lund S, Na HM, Taylor G (2006) Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1,  $\alpha$ -synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. **Neurobiology of Disease**, 22:404-420.

Bishop GM, Robinson SR, Liu Q, Perry G, Atwood CS, Smith MA (2002) Iron: a pathological mediator of Alzheimer disease?. **Journal of Developmental Neuroscience**, 24:184-187.



Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G (2008) Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. **Synapse**, 62:302-309.

Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathologica**, 82:239-259.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254.

Budni P, De Lima MN, Polydoro M, Moreira JC, Schröder N, Dal-Pizzol F (2007) Antioxidant effects of selegiline in oxidative stress induced by iron neonatal treatment in rats. **Experimental Neurology**, 32:965-972.

Chari A, Mazumder A, Jagannath S (2010) Proteasome inhibitor and its therapeutic potential in multiple myeloma. **Biologics**, 28(4)273-287.

Cherny RA, Legg JT, Mc Lean CA, Fairlie DP, Huang X, Atwood CS, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI (1999) Aqueous dissolution of Alzheimer's disease A $\beta$  amyloid deposits by biometal depletion. **Journal of Biological Chemistry**, 274(33)23223-23228.

Ciechanover A, Brundin P (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. **Neuron**, 40:427-446.

Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-Garcia JM (2010) Plastic modifications induced by object recognition memory processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 107:2652-2657.

COBEA, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - Estatuto (2008). Disponível em: <http://www.cobea.org.br> Acesso em: 30 de Setembro de 2011.

Collard K (2011) Iron homeostasis in the neonate. **Pediatrics**, 123:1208-1216.

Da Silva VK, De Freitas BS, Da Silva AD, Roesler LN, Falavigna L, Dal Ponte RF, Bogo MR, Hallak JEC, Zuardi AW, Crippa JAS, Schröder N (2013) Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin and mitochondrial fission protein DNM1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection. **Molecular Neurobiology**, 49(1):222-33.

Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota Jr ML, Andrades ME, Caregnato FF, Vianna MR, Schröder N, Quevedo J, Izquierdo I, Archer T, Moreira JC (2001) Neonatal iron exposure oxidative stress in adult wistar rat. **Developmental Brain Research**, 130:109-114.

De Lima MN, Dias CP, Torres JP, Dornelles A, Garcia VA, Scalco FS, Guimarães MR, Petry RC, Bromberg E, Constantino L, Budni P, Dal-Pizzol F, Schröder N (2008) Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. **Neurobiology of Aging**, 29:1052-1059.

De Lima MN, Polydoro M, Laranja DC, Bonatto F, Bromberg E, Moreira JC, Dal-Pizzol F, Schröder N (2005a) Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. **European Journal of Neuroscience**, 21:2521-2528.

De Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Graziotin MM, Garcia VA, Dal-Pizzol F (2005b) Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. **Experimental Neurology**, 196:177-183.

Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD (1991) Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. **Brain Research**, 114:1953-1975.

Dornelles AS, Garcia VA, De Lima MN, Vedana G, Alcade LA, Bogo MR, Schröder N (2010) mRNA expression of proteins involved in iron homeostasis in brain regions is altered by age and by iron overloading in the neonatal period. **Neurochemical Research**, 35:564-571.

Dwork AJ, Lawler G, Zybert PA, Durkin M, Osman M, Willson N, Barkai AI (1990) An autoradiographic study of the uptake and distribution of iron by the brain of the young rat. **Brain Research**, 518:31-39.

Eichenbaum H (2006) The secret life of memories. **Neuron**, 50(3):350-352.

Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioural Brain Research**, 31:47-59.

Fagherazzi EV, Garcia VA, Maurmann N, Bervanger T, Halmenschlager LH, Busato SB, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Schröder N (2011) Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. **Psychopharmacology**, 219(4):1133-40.

Fernandez LL, Carmona M, Portero-Otin M, Naudi A, Pamplona R, Schröder N, Ferrer I (2010) Effects of increased iron intake during the neonatal period on the brain of adult A $\beta$ PP/PS1 transgenic mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, 19:1-12.

Fernandez LL, De Lima MN, Scalco F, Vedana G, Miwa C, Hilbig A, Vianna MR, Schröder N (2011) Early post-natal iron administration induces astroglial response in the brain of adult and aged rats. **Neurotoxicity Research**, 20:193-199.

Fioravante D, Byrne JH (2011) Protein degradation and memory formation. **Brain Research**, 85:14-20.

Fiorenza NG, Sartor D, Myskiw JC, Izquierdo I (2011) Treatment of fear memories: interactions between extinction and reconsolidation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 83(4):1363-1372.

Fortin A, Gregan SP, MacLaurin JG, Kushwaha N, Hickman ES, Thompson CS, Hakim A, Albert PR, Cecconi F, Helin K, Park D, Slack RS (2001) APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. **The Journal of Cell Biology**, 155:207-216.

Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T (1999) Neonatal iron exposure induces neurobehavioral dysfunctions in adult mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 159:25-30.

Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T (2000) Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period. **Developmental Brain Research**, 119:65-74.

Furini CRG, Myskiw JC, Benetti F, Izquierdo I (2013) New frontiers in the study of memory mechanisms. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 35:173-177.

Gaasch JA, Lockmann PR, Geldenhuys WJ, Allen DD, Van der Schyf CJ (2007) Brain iron toxicity: differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells. **Neurochemical Research**, 32:1196-1208.

Gruart A, Muñoz MD, Delgado-García JM (2006) Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. **Journal Neuroscience**, 26:1077-1087.

*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health*, Edição Revisada (1996). The National Academies Press, Washington, DC.

Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y (2007) Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. **Journal of Neurochemistry**, 101(2):566-76.

Hare DJ, Arora M, Jenkins NL, Finkelstein DI, Doble PA, Bush AI (2015) Is early-life iron exposure critical in neurodegeneration? **Nature Reviews Neurology**, doi:10.1038/nrneurol.2015.100 [Epub ahead of print]

Hegde AN (2004) Ubiquitin-proteasome-mediated local protein degradation and synaptic plasticity. **Progress in Neurobiology**, 73:311-357.

Hegde AN, Upadhy SC (2007) The ubiquitin-proteasome pathway in health and disease of the nervous system. **Trends in Neurosciences**, 30(11):587-595.

Hegde AN, Upadhy SC (2011) Role of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in nervous system disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1809:128-140.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, 117:285-297.

Hirsch EC, Brandel JP, Galle P, Javoy-Agid F, Agid Y (1991) Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. **Journal of Neurochemistry**, 56:446-451.

Hoffman EK, Wilcox HM, Scott RW, Siman R (1996) Proteasome inhibition enhances the stability of mouse Cu/Zn superoxide dismutase with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, 139:15-20.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. **EMBO Journal**, 10:4129-4135.

Izquierdo I (2011) Memória. **Artmed**, 2<sup>nd</sup> Ed., Porto Alegre.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH (1998) Mechanisms for memory types differ. **Nature**, 393:635-636.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Lima RH, Clarke JH, da Costa JCC, Cammarota M (2008) Extinction learning: neurological features, therapeutic applications, and effect of aging. **Future Neurology**, 3:133-141.

Izquierdo I, Bevilaqua L, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. **Trends in Neurosciences**, 29:496-505.

Izquierdo I, Medina JH (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, 68:285-316.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MRM, Izquierdo LA, Barros DM (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, 103:1-11.

Jadhav T, Wooten MW (2009) Defining an embedded code for protein ubiquitination. **Journal of Proteomics and Bioinformatics**, 2:316-333.

Janetzky B, Reichmann H, Youdim MBH, Riederer P (1997) Iron, oxidative damage in neurodegenerative diseases. **Willey-Liss**, New York.

Jellinger KA (2009) Recent advances in our understanding of neurodegeneration. **Journal of Neural Transmission**, 116:1111-1162.

Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD, Beaudet AL (1998) Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. **Neuron**, 21:799-811.

Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. **Journal of Cell Biology**, 143:1883-1898.

Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR (2000) Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97:12571-12576.

Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D (2009) Nutrition, brain aging and neurodegeneration. **Journal of Neuroscience**, 29(41):12795-12801.

Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, Viswanath V, Jacobs R, Beal MF, Yang L, DiMonte D, Volitaskis I, Ellerby L, Cherny RA (2003) Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. **Neuron**, 37:899-909.

Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR (2000) Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, 75(1):436-439.

Khalil M, Teunissen C, Langkammer C (2010) Iron and neurodegeneration in Multiple Sclerosis. **Multiple Sclerosis International**, 606807:6 pages.

Kuhne C, Banks L (1998) E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. **Journal of Biological Chemistry**, 273:34302-34309.

Kumar S, Talis AL, Howley PM (1999) Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination. **Journal of Biological Chemistry**, 274:18785-18792.

Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ (1988) Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. **Journal of Pathology**, 155:9-15.

Mani A, Gelmann EP (2005) The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 23(21):4776-4789.

McGaugh JL (2000) A century of consolidation. **Science**, 287:248-351.

Myskiw J, Izquierdo I (2012) Posterior parietal cortex and long-term memory: some data from laboratory animals. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, 6(8):1-7.

Meller CA, Henriques JA, Schwartzmann G, Roesler R (2004) The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. **Peptides**, 25:585-588.

Merlo E, Romano A (2007) Long-term memory consolidation depends on proteasome activity in the crab *Chasmagnathus*. **Neuroscience**, 147:46-52.

Mills E, Dong X, Wang F, Xu H (2010) Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. **Future Medicinal Chemistry**, 2:1-51.



Miwa CP, De Lima MN, Scalco F, Vedana G, Mattos R, Fernandez LL, Hilbig A, Schröder N, Vianna MR (2011) Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. **Neurotoxicity Research**, 19:527-535.

Nader K, Schafe GE, Ledoux JE (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdale for reconsolidation after retrieval. **Nature**, 416:722-726.

Nader R (2012) The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. **Molecular Cancer Therapeutics Reviews**, 11(3)538-548.

Paine S, Bedford L, Thorpe JR, Mayer RJ, Cavey JR, Bajaj N, Sheppard PW, Lowe J, Layfield R (2009) Immunoreactivity to Lys63-linked polyubiquitin is a feature of neurodegeneration. **Neuroscience Letters**, 460:205-208.

Papanikolaou G, Pantopoulos K (2005) Iron metabolism and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 202:199-211.

Parfitt GM, Barbosa AK, Campos RC, Koth AP, Barros DM (2012) Moderate stress enhances memory persistence: are adrenergic mechanisms involved? **Behavioural Neuroscience**, 126:729-734.

Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V, (1987) Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 84:3033-3036.

Pilchova I, Klacanova K, Chomova M, Tatarkova Z, Dobrota D, Racay P, (2015) Possible contribution of proteins of Bcl-2 family in neuronal death following transient global brain ischemia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 35: 23-31.

Rech RL, De Lima MN, Dornelles AS, Garcia VA, Alcalde LA, Vedana G, Schröder N (2010) Reversal of age-associated memory impairment by rosuvastatin in rats. **Experimental Gerontology**, 45:351-356.

Reolon GK, Reinke A, de Oliveira MR, Braga LM, Camassola M, Andrades ME, Moreira JC, Nardi NB, Roesler R, Dal-Pizzol F (2009) Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 29:(4)443-448.

Rice ME (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends in Neurosciences**, 23(5):209-216.

Riederer BM, Leuba G, Vernay A, Riederer IM (2011) The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease. **Experimental Biology and Medicine**, 236:268-276.

Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt D, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MB (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. **Journal of Neurochemistry**, 52:515-520.

Rodriguez-Ortiz CJ, Balderas I, Saucedo-Alquicira F, Cruz-Castañeda P, Bermudez-Rattoni F (2011) Long-term aversive taste memory requires insular and amygdala protein degradation. **Neurobiology of Learning and Memory**, 95:311-315.

Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G (2003a) Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. **Peptides**, 24:(7)1069-1074.

Roesler R, Schröder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB (2003b) Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. **Brain Research**, 975(1-2):207-213.

Ross CA, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. **Nature Medicine**, Suppl:S10-S17.

Salazar J, Mena N, Hunot S, Prigent A, Alvarez-Fischer D, Arredondo M, Duyckaerts C, Sazdovitch V, Zhao L, Garrick LM, Nuñez MT, Garrick MD, Raisman-Vozari R, Hirsch ET (2008) Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105(47):18578-18583.

Salvador GA, Uranga RM, Giusto NM (2010) Iron and mechanisms of neurotoxicity. **International Journal of Alzheimer's Disease**, 2011:9 pages.

Sara SJ (2000) Strengthening the sharky trace through retrieval. **Nature Reviews Neuroscience**, 1:212-213.

Schröder N, Figueiredo LS, De Lima MN (2013) Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: Evidence from animal models and human studies. **Journal of Alzheimer's Disease**, 34:797-812.

Schröder N, Fredriksson A, Vianna MR, Roesler R, Izquierdo I, Archer T (2001) Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. **Behavioral Brain Research**, 124:77-85.

Sengstock GJ, Olanow CW, Dunn AJ, Barone Jr S, Arendash GW (1994) Progressive changes in striatal dopaminergic markers, nigral volume, rotational behavior following iron infusion into the rat substantia nigra. **Experimental Neurology**, 130(1):82-94.

Seo H, Sonntag KC, Kim W, Cattaneo E, Isacson O (2007) Proteasome activator enhances survival of Huntington's disease neuronal model cells. **PloS ONE**, 2(2):e238.

Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Yi H, Akao Y, Tribl F, Gerlach M, Osawa T, Riederer P, Naoi M (2006) Neuromelanin induces oxidative stress in mitochondria through release of iron:

mechanism behind the inhibition of 26S proteasome. **Journal of Neural Transmission**, 113:633-644.

Shinbo Y, Niki T, Taira T, Ooe H, Takahashi-Niki K, Maita C, Seino C, Iguchi-Ariga SM, Ariga H (2006) Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. **Cell Death and Differentiation**, 13:96-108.

Sian-Hülsmann J, Mandel S, Youdim MB, Riederer P (2011) The relevance of iron pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, 118:939-957.

Smith MA, Tabaton M, Perry G (1996) Early contribution of oxidative glycation in Alzheimer disease. **Neuroscience Letters**, 217(2-3)210-211.

Smith MA, Harris PR, Sayre LM, Perry G (1997) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94(18)9866-9868.

Smith MA, Zhu X, Tabaton M (2010) Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Journal of Alzheimer's Disease**, 19(1):363-372.

Sofic E, Paulus W, Jellinger K, Riederer P, Youdim MBH (1991) Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of Parkinsonian brains. **Journal of Neurochemistry**, 56:978-982.

Sofic E, Riederer P, Heinsen H, Beckmann H, Reynolds GP, Hebenstreit G, Youdim MB (1988) Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. **Journal of Neural Transmission**, 74:199-205.

Tai HC, Schuman EM (2008) Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, 9(11):826-38.

Taylor EM, Morgan EH (1990) Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat. **Developmental Brain Research**, 55:35-42.

Taylor EM, Crowe A, Morgan EH (1991) Transferrin and iron uptake by the brain: effects of altered iron status. **Journal of Neurochemistry**, 57:1584-1592.

Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. **Science**, 296:1991-1995.

Uversky VN, Li J, Fink AL (2001) Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. **Journal of Biological Chemistry**, 276:44284-44296.

Van Gelder W, Huijskes-Heins MIE, Cleton-Soeteman MI, Van Dijk JP, Van Eijk HG (1998) Iron uptake in blood-brain barrier endothelial cells cultured in iron-depleted and iron-enriched media. **Journal of Neurochemistry**, 71:1134-1140.

Vernon AC, Johansson SM, Modo MM (2010) Non-invasive evaluation of nigrostriatal neuropathology in a proteasome inhibitor rodent model of Parkinson's disease. **BMC Neuroscience**, 11:1-18.

Vernon AC, Crum WR, Johansson SM, Modo MM (2011) Evolution of extra-nigral damage predicts behavioural deficits in a rat proteasome inhibitor model of Parkinson's disease. **PLoS ONE**, 6(2):e17269

Vrij FM, Fischer DF, Van Leeuwen FW, Hol EM (2004) Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. **Progress in Neurobiology**, 74:249-270.

Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, 5:863-873.

Zhang X, Xie W, Qu S, Pan T, Wang X, Le W (2005) Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 333:544-549.

Watson RE, Desesso JM, Hurtt ME, Cappon GD (2006) Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. **Birth Defects Research**, 77(5):471-484.

Williams CA (2005) Neurological aspects of the Angelman syndrome. **Brain and Development**, 27:88-94.

Wilson SM, Bhattacharyya B, Rachel RA, Coppola V, Tessarollo L, Householder DB, Fletcher CF, Miller RJ, Copeland NG, Jenkins NA (2002) Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease. **Nature Genetics**, 32:420-425.

Wong E, Cuervo AM (2011) Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2:a006734.

Wood MA, Kaplan MP, Bresinger CM, Guo W, Abel T (2005) Ubiquitin C-terminal hydrolase L3 (Uchl3) is involved in working memory. **Hippocampus**, 15:610-621.

Yamamoto A, Shin RW, Hasegawa K, Naiki H, Sato H, Yoshimasu F, Kitamoto T (2002) Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, 82:1137-1147.

Yao X, Liu J, McCabe JT (2008) Alterations of cerebral cortex and hippocampal proteasome subunit expression and function in a traumatic brain injury rat model. **Journal of Neurochemistry**, 104:353-363.