

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

GUSTAVO DALTO BARROSO MACHADO

**PAPEL DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ACOPLADO À PROTEÍNA G (GPER)
EM UM MODELO DE DISFUNÇÃO COGNITIVA INDUZIDA PELA
SOBRECARGA NEONATAL DE FERRO E OVARECTOMIA EM RATAS**

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Ficha Catalográfica

M149p Machado, Gustavo Dalto Barroso

Papel do Receptor de Estrogênio Acoplado à Proteína G (GPER) em um Modelo de Disfunção Cognitiva induzido pela sobrecarga neonatal de ferro e ovariectomia em ratas / Gustavo Dalto Barroso Machado . – 2017.

100 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Nadja Schröder.

1. Memória. 2. Ferro. 3. Neurodeneração. 4. Ovariectomia. 5. GPER. I. Schröder, Nadja. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
Área de Concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular
MESTRADO

GUSTAVO DALTO BARROSO MACHADO

Papel do Receptor de Estrogênio Acoplado à Proteína G (GPER) em um Modelo de Disfunção Cognitiva induzido pela sobrecarga neonatal de ferro e ovariectomia em ratas

Prof^ª. Dr^ª. Nadja Schröder
Orientadora

Porto Alegre
2017

GUSTAVO DALTO BARROSO MACHADO

Papel do Receptor de Estrogênio Acoplado à Proteína G (GPER) em um Modelo de Disfunção Cognitiva induzido pela sobrecarga neonatal de ferro em ratas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde; Área de Concentração em Farmacologia Bioquímica e Molecular sob orientação da Prof.^a Dr.^a Nadja Schröder, como requisito para a obtenção do Título de Mestre

Aprovada em 28 de dezembro de 2017

BANCA EXAMINADORA:

1. Dr. Maurício Bogo – PUCRS
2. Dr. Elke Bromberg – PUCRS
3. Dr. Rafael Roesler – UFRGS

À Dorinha.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jesus e aos espíritos de luz que me guiam e me inspiram diariamente.

À minha orientadora Profa. Nadja pelo apoio durante todas as etapas da realização deste projeto, pelos conhecimentos compartilhados, pelos momentos de descontração e, principalmente, pelo exemplo pessoal e profissional.

À Betânia, minha parceira nesse novo projeto e que me recebeu no Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central de braços e mente abertos.

À profa. Maria Martha Campos, tu és o nosso exemplo de professora e pesquisadora! Obrigado por nos ensinar Farmacologia, mas principalmente por nos exemplificar que sermos éticos, bondosos e estudioso é o jeito mais rápido de vivermos no mundo que queremos.

Agradeço aos colegas Dra. Paula Juliana Seadi Pereira, Dra. Natália Cignachi, MSc Raquel Dal Sasso Freitas, Dr. Rodrigo Braccini e Dr. Izaque Maciel com quem aprendi os princípios do trabalho em pesquisa experimental e que me acolheram em seus projetos de pesquisa.

Obrigado aos colegas do Instituto de Farmacologia e Toxicologia da PUCRS e colegas do Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.

À minha mãe Maria Doraci Barroso Machado, meu pai Estevão Francisco Oliveira Machado, meu irmão Estevo Manoel Barroso Machado e o sr. Júlio Barreto Vianna que me possibilitaram alcançar vãos mais altos que os seus próprios, sempre sob a égide da humildade, respeito e honestidade. Obrigado tia Rosaly Barroso e prima Yolanda Maria.

Ao Antônio, com quem o convívio tem me tornado um ser humano cada vez mais pleno.

Agradeço às entidades fomentadoras da pesquisa em nosso país e à Escola de Medicina da PUCRS.

Finalmente, agradeço a todos os “nãos” que tenho encontrado pelo caminho graças a vocês hoje estou aqui...

Para além da curva da estrada

(Fernando Pessoa – heterônimo de Alberto Caeiro)

Para além da curva da estrada
Talvez haja um poço, e talvez um castelo,
E talvez apenas a continuação da estrada.
Não sei nem pergunto.
Enquanto vou na estrada antes da curva.
Só olho para a estrada antes da curva,
Porque não posso ver senão a estrada antes da curva.
De nada me serviria estar olhando para outro lado
E para aquilo que não vejo.
Importemo-nos apenas com o lugar onde estamos.
Há beleza bastante em estar aqui e não noutra parte
qualquer.
Se há alguém para além da curva da estrada,
Esses que se preocupem com o que há para além da curva da estrada.
Essa é que é a estrada para eles.
Se nós tivermos que chegar lá, quando lá chegarmos
saberemos
Por ora só sabemos que lá não estamos.
Aqui há só a estrada antes da curva, e antes da curva
Há a estrada sem curva nenhuma.

RESUMO

Este estudo investigou se o modelo de disfunção cognitiva induzido pela sobrecarga de ferro, somente testado em ratos machos até o momento, induz déficits de memória em ratas, objetivando validá-lo como um método experimental que auxilie na compreensão das diferenças fisiopatológicas entre os sexos em relação às doenças neurodegenerativas. Também avaliamos, de maneira inédita, os efeitos da ativação receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER), nesse modelo combinado com o modelo de menopausa experimental. Além disso, especulamos o papel da via da PKA/CREB na ativação do GPER, através da inibição farmacológica da PKA. Foram realizados quatro experimentos para atingir esses objetivos: I – ratas tratadas com ferro (via oral – v.o.) ou veículo (sorbitol – v.o.) foram ovariectomizadas ou submetidas à cirurgia falsa (SHAM) na idade adulta, após três semanas do protocolo cirúrgico foram submetidas às tarefas de reconhecimento de objetos (RO), localização de objetos (LO) e esquivia inibitória (EI); II – ratas tratadas com ferro no período neonatal foram ovariectomizadas ou submetidas à cirurgia SHAM, após recuperação da cirurgia (3 semanas) foram tratadas anteriormente aos treinos das tarefas de LO e EI com G-1 (agonista seletivo do GPER, 10mg/kg, sc.) ou veículo (óleo de girassol, sc.) e testadas 24h após o treino; III – ratas *naive* receberam diferentes doses do composto H-89 (inibidor da PKA) para avaliar seu potencial amnésico (0.1mg/kg, 0.25mg/kg e 0.5mg/kg; ip.) e IV – ratas submetidas à sobrecarga neonatal de ferro e OVX, após 3 semanas do protocolo cirúrgico receberam quinze minutos antes dos treinos das tarefas de LO e EI o composto H-89 (0.25mg/kg, ip.) ou veículo (salina, ip.) e imediatamente após o treino G-1 (10mg/kg, sc.) ou veículo (óleo de girassol, sc.), as ratas foram testadas após 24h dos treinos. Os efeitos do protocolo de sobrecarga neonatal de ferro associado ou não a privação de estradiol variou em dependência da tarefa comportamental avaliada. Na tarefa de LO os grupos submetidos à sobrecarga neonatal de ferro e ovariectomia apresentaram os menores índices de reconhecimento. O tratamento com o agonista do GPER – G1 - foi capaz de melhorar os déficits cognitivos induzidos pela sobrecarga neonatal de ferro e/ou pela ovariectomia em ratas no teste de LO e EI, esses efeitos foram inibidos pela administração do inibidor da PKA anteriormente ao treino das tarefas. Demonstramos que o modelo de sobrecarga neonatal de ferro associado à ovariectomia é um modelo útil para o estudo dos efeitos

deletérios da diminuição dos níveis séricos de estradiol na menopausa, auxiliando como modelo fenotípico do que ocorre na clínica, onde as mulheres pós-menopausa apresentam prevalência maior de Doença de Alzheimer que homens. Além disso, demonstramos de maneira inédita os efeitos do composto G-1 na tarefa de esquila inibitória. Nossos dados comportamentais também sugerem que o composto G-1 depende da ativação da PKA para exercer seus efeitos sobre a consolidação da memória.

Palavras-chave: memória; ferro; neurodegeneração; Doença de Alzheimer; GPER; G-1.

ABSTRACT

The present study investigated if the model of memory dysfunction induced by iron overload, so far only tested in male rats, would be able to induce cognitive decline in female rats, aiming to validate it as an experimental model to study gender differences in neurodegenerative diseases. We also evaluated the effects of the activation of the G protein coupled estrogen receptor (GPER) on iron- and ovariectomy-induced memory deficits and the role of the PKA/CREB pathway as a mediator of its physiologic effects. Four experiments were performed: I – female rats received iron (30mg/kg, per oral, p.o.) or vehicle (sorbitol, p.o.) in the neonatal period and after, in adulthood, they were submitted to the surgical protocol: ovariectomy (OVX) or false-surgery (SHAM), after 3 weeks, behavioral tasks were performed using the object recognition (RO); object location (OL) and inhibitory avoidance (IA) tasks; II – the same two protocols cited before and behavioral tasks 3 weeks from the surgeries, but, immediately after the training sessions the animals received the selective agonist of the GPER, G1 (10mg/kg, subcutaneously, sc.) or vehicle (veh, oil, sc.), the long-term memory was assessed 24h after the training sessions; III – dose-response curve in order to determine the effects of the PKA-inhibitor (H-89) on memory retention of inhibitory avoidance task, the following doses were administered intraperitoneally to naïve adult female rats: 0.1 mg/kg; 0.25mg/kg or 0.5mg/kg; and finally the experiment IV in which the memory of iron overloaded-ovariectomized female rats was assessed 24h after that they had received H-89 (0.25mg/kg, ip.) or veh 15 minutes previous to the training sessions and G1 (10mg/kg, sc.) or veh immediately after their training in the OL and IA tasks. We observed that the effects of iron overload in female, associated or non-associated to OVX varied according to the behavioral test that the animals were submitted. The lowest recognition index level in OL task was observed in the animals exposed to the iron overload and, subsequently, to the lack of estrogens secondary to ovariectomy. The acute post-training treatment with G-1 increased the recognition index in the OL task and it was also associated with an increasing in the latency to step down ifrom the platform to the grid in the IA task. Finally, all these positive results obtained with the post-training administration of G-1 were abolished when the animals received the pre-training treatment of H-89. Our study opens new avenues in the field of memory and estrogens once it introduces the association of lack of estradiol and iron overload as a pre-clinical phenotypical model of the aging process in women. Besides, from the best

of our knowledge, it is the first evidence of the role of the G1 in the consolidation of the emotional memory as well as the first study connecting the GPER directly to the PKA/CREB pathway.

Keywords: memory; iron, neurodegeneration; Alzheimer's Disease; GPER; G-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de memória de longo prazo e áreas encefálicas envolvidas.

Figura 2 – Vias de Sinalização Intracelular do Estradiol.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 17 β -HSD** - 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase
- AMPC** – Monofosfato cíclico de adenosina
- A β** - Peptídeo β -amiloide
- BBB** – Barreira hematoencefálica
- Cp** – Ceruloplasmina
- CREB** – Elemento de resposta ao AMPC
- DA** – Doença de Alzheimer
- DP** – Doença de Parkinson
- E2** – 17- β Estradiol
- EAE** - Encefalomielite autoimune experimental
- EM** – Esclerose múltipla
- ER** – Receptor de estrogênio
- ER α** – Receptor de estrogênio do subtipo alfa
- ER β** – Receptor de estrogênio do subtipo beta
- ERK** - Extracellular signal–regulated kinases
- Fe** – Ferro
- FPN** - Ferroportina exportadora de ferro
- FSH** – Hormônio folículo estimulante
- G-1** - $[\pm]$ -1-[(3aR*,4S*,9bS*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]- ethanona
- GPER** - Receptor de estrogênio acoplado à proteína G
- HIF- α** - Fatores induzidos por hipóxia do tipo 1- α
- iNOS** - Óxido nítrico sintase induzida
- IFN- γ** - Interferon gama
- IUPHAR** – União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica
- MCP-1** - Quimioproteína atrativa de monócitos
- OVX** – Ovariectomia
- PKA** – Proteína quinase A
- PI3K/Akt** - Phosphatidylinositol-3-kinases/ Protein kinase B

SHAM – Falso operados

TNF - Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO | 17 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| OBJETIVOS | 41 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 43 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |
| ANEXOS | |
| ANEXO A – Carta de Aprovação CEUA | 58 |
| ANEXO B – Manuscrito do Trabalho Experimental | 59 |
| ANEXO C – Comprovante de Submissão do Artigo | 99 |

INTRODUÇÃO

A transição demográfica mundial marcada pelo aumento do número de idosos traz como grande desafio a compreensão das alterações relacionadas ao processo de envelhecimento bem como a busca por alternativas que associem longevidade e qualidade de vida. Na América Latina, a Organização das Nações Unidas (ONU) projeta que a proporção da população de idosos triplicará de 6,3% em 2005 para 18,5% em 2050 (World Population Prospects: The 2016 Revision).

Alguns mecanismos podem ser enumerados como candidatos na compreensão do processo de envelhecimento: a senescência celular; a exaustão das células-tronco; alterações na comunicação intercelular; instabilidade genômica; o desgaste dos telômeros; modificações epigenéticas; perda da homeostase proteica; desregulações no senso nutricional e a disfunção mitocondrial. Cada um desses fatores quando exacerbados levam ao aumento da velocidade do envelhecimento e, quando tratados, no retardo desse. Eles poderiam explicar o comprometimento dos sistemas e órgãos na dinâmica do envelhecer e a relação entre idade e aparecimento de doenças osteodegenerativas, risco aumentado de doença aterosclerótica, autoimunidade, doenças neoplásicas, e, obviamente, doenças neurodegenerativas, como as Doenças de Parkinson e Alzheimer (Lopez-Otin, 2013).

A partir dessa observação em relação ao envelhecimento populacional é de se pensar que a prevalência de doenças neurodegenerativas irá aumentar de maneira bastante importante nas próximas décadas. No caso da doença de Alzheimer, sabe-se que seus maiores fatores de risco são sexo e idade. Em relação à idade, parece que os processos associados ao envelhecimento do sistema nervoso central, alterações no funcionamento na barreira hematoencefálica e, estresse oxidativo, explicariam essa razão. Já, no que diz respeito ao sexo como fator de risco para o aparecimento da doença, os estudos apontam para um papel fundamental dos estrogênios, em especial o 17 β -estradiol (E2), uma vez que a partir de sua diminuição após a menopausa, as taxas dessas doenças em mulheres passam a se elevar (Viña et al., 2010).

Porém, apenas a terapia de reposição hormonal não é capaz de reverter os déficits de memória associados com a menopausa, como demonstrado por um braço do ensaio clínico (The Women's Health Initiative que avaliou a memória de mulheres

tratadas com estrogênios e/ou progesterona associados). Esse estudo foi interrompido em 2002, por demonstrar que a terapia de reposição hormonal aumentaria a incidência de doenças cardiovasculares e aparecimento de câncer de mama.

Apesar dos resultados não favoráveis desse estudo clínico, algumas importantes limitações podem ser atribuídas a eles. Entre elas, o uso de terapia de reposição hormonal não específica aos subtipos de receptores de estrogênio. A ativação dos receptores clássicos alfa e beta é controversa dependendo do tecido e, cada um deles apresenta funções específicas. Com um número cada vez maior de estudos elucidando o papel do GPER (sigla do inglês, *G Protein coupled Estrogen Receptor*) nos processos fisiológicos e devido à vasta gama de distribuição desse receptor em estruturas do sistema nervoso central associadas à cognição e memória, especulamos com esse estudo se a ativação desse receptor de maneira exclusiva seria capaz de melhorar os danos cognitivos em um modelo de sobrecarga de ferro durante o período neonatal, sem os efeitos indesejáveis da ativação dos demais subtipos de receptores de estrogênio (Hammond e Gibbs, 2011). A escolha desse modelo experimental é baseada nas experiências anteriores do nosso grupo, que relacionam a sobrecarga de ferro com importantes pioras cognitivas e a validação desse método na compreensão das alterações que são observadas em patologias neurodegenerativas que afetam as capacidades cognitivas, como a doença de Alzheimer e o comprometimento cognitivo leve. Além, disso, os estudos de MRI têm cada vez mais demonstrado que os níveis de ferro em diversas regiões cerebrais afetam o desempenho das mais variadas tarefas cognitivas, de atenção e memória de trabalho (, para uma revisão ver Schröder et al., 2013).

Como os achados epidemiológicos e clínicos orientam para uma diferença significativa entre o processo de dano neuronal em homens e mulheres, o presente trabalho pretende também avaliar se essa diferença é observada quando se utiliza o modelo de sobrecarga de ferro (já validado utilizando ratos) em fêmeas por si só e combinado com um modelo de menopausa, dessa forma, buscar a sua validação para o estudo do declínio cognitivo nas mulheres.

REVISÃO DE LITERATURA

Estrogênios: um horizonte além das funções de reprodução

Os estrogênios são hormônios derivados do colesterol que desempenham papel crucial em ambos os sexos. São responsáveis por diversos processos fisiológicos como o crescimento celular, reprodução, desenvolvimento e diferenciação sexual, bem como estão envolvidos em processos patológicos como neoplasias, inflamação, neurodegeneração, doenças cardiovasculares e metabólicas, além de osteoporose (Jia et al., 2015). O local de síntese de estrogênios varia de acordo com o gênero e, no caso das mulheres, com a idade. Na menacme, período fértil da vida da mulher, os ovários representam o sítio primário de síntese do estrógeno 17β -estradiol (E2) o qual é o mais predominante e potente (Coleen et al., 2008).

Na fase folicular do ciclo menstrual, a síntese de estrógenos é realizada a partir dos folículos, enquanto na fase lútea é o corpo lúteo o responsável por essa síntese. A síntese de E2 depende de dois tipos celulares diferentes: as células da teca e da granulosa, dentro dos folículos, e as células tecaluteínicas e as granulosas-luteínicas, dentro do corpo lúteo. As células da teca e as tecaluteínicas obtêm o colesterol e produzem androstenediona os quais se difundem até a camada granulosa (Guyton et al., 2011). Nas células da granulosa, o hormônio folículo estimulante (FSH), através da via da adenilatociclase, estimula as células a produzirem aromatase. A aromatase é a enzima que converte a androstenediona em estrona. A estrona, então, por ação da enzima 17β -hidroxiesteroide desidrogenase (17β -HSD) é convertida em E2. Uma via alternativa é a conversão da mesma androstenediona em testosterona pela 17β -HSD e, em seguida, a conversão da testosterona em E2 pela aromatase (Coleen et al., 2008).

Toda a síntese de estradiol descrita anteriormente ocorre em resposta ao FSH secretado de forma pulsátil pela hipófise anterior e por meio da atividade catalítica da aromatase P450, convertem testosterona em E2 (Guyton et al., 2011). No período pós-menopausa e nos homens, o E2 é convertido a partir da testosterona e da androstenediona também pela aromatase P450 porém em sítios extra-ovarianos, como a mama, cérebro, músculo esquelético e tecido adiposo. A partir da sua fonte, esses

hormônios irão exercer atividades parácrinas e endócrinas, ligando-se a diferentes tipos de receptores (Jia et al., 2015)

Estrogênio, menopausa e memória

O que é memória?

De acordo com o dicionário Merriam-Webster, a palavra memória pode ser compreendida como o “poder ou processo de reproduzir ou lembrar o que foi aprendido e de reter especialmente através de mecanismos de associação”. Além do que lembramos, nossa memória também é formada por aquilo que decidimos consciente ou inconscientemente esquecer. Essa dinâmica de formar memórias é responsável pelo aprendizado, o qual manifesta-se na forma como o homem comporta-se perante si, o outro e o meio onde vive. Daí a importância de compreender a memória como peça fundamental na evolução da nossa espécie, uma vez que esse processo de adquirir, armazenar e recuperar informações é extremamente útil no processo de tomada de decisões e geração de novas ideias.

De forma didática, a memória pode ser classificada de acordo com o tempo de duração do seu armazenamento e a natureza da informação a ser registrada.

As categorias temporais da memória ainda são debatidas por diferentes linhas de pesquisa, porém, de maneira geral três classes temporais são aceitas: memória de curto prazo – definida como a capacidade diária de manter na consciência experiências que estão ocorrendo, com duração de segundos; memória de trabalho – capacidade de manutenção e manipulação de informações na consciência durante segundos a minutos, para atingir determinado objetivo comportamental e memória de longa duração – compreende a retenção de informações por um período permanente, que pode durar de dias até a vida toda (Purves et al., 2010)

Baseado na natureza da informação registrada, partimos para a divisão da memória de longo prazo em implícita (ou não declarativa) e explícita (ou declarativa). A memória implícita se manifesta de forma automática, com pouco processamento consciente por parte do indivíduo e pode ser produzida por processos como o priming, o aprendizado de habilidades motoras, a memória de hábitos e os condicionamentos. A evocação de maneira consciente de conhecimentos a respeito de lugares, pessoas e objetos é entendida como memória explícita (Purves et al., 2010 e Kandel et al., 2014)

A memória explícita pode se apresentar nas formas semântica (utilizada para aprender o significado de novas palavras ou conceitos) e episódica (memória de eventos autobiográficos). O processamento da memória explícita envolve, basicamente, as seguintes operações (Kandel et al., 2014):

- (1) *Codificação* – envolve a maneira como novos dados são observados e relacionados com conhecimentos preexistentes. A codificação da memória parece estar intimamente relacionada ao grau de motivação para lembrar;
- (2) *Consolidação e armazenamento* – são os meios responsáveis por reter informações e estabilizar memórias lábeis, refere-se ao aparato neural associado a retenção da memória de longo prazo. Esse processo depende de expressão de genes e síntese de proteínas.
- (3) *Evocação* – processo responsável por lembrar memórias que foram consolidadas. A evocação de memórias é um processamento sujeito a distorções e é mais eficiente na presença de “dicas”.

Mecanismos celulares da formação da memória de longa duração

O processo de armazenamento e a formação da memória de longo prazo depende do tipo de memória (implícita ou explícita) e envolve regiões encefálicas distintas (vide **figura 1**).

A *Aplysia* é um molusco marinho que possui um sistema nervoso simples e, portanto, foi utilizado para o estudo da formação da memória implícita, nesse modelo a sensibilização de longa duração foi a forma de memória de longa duração mais estudada (Kandel et al., 2014 e Wang & Peng, 2016).

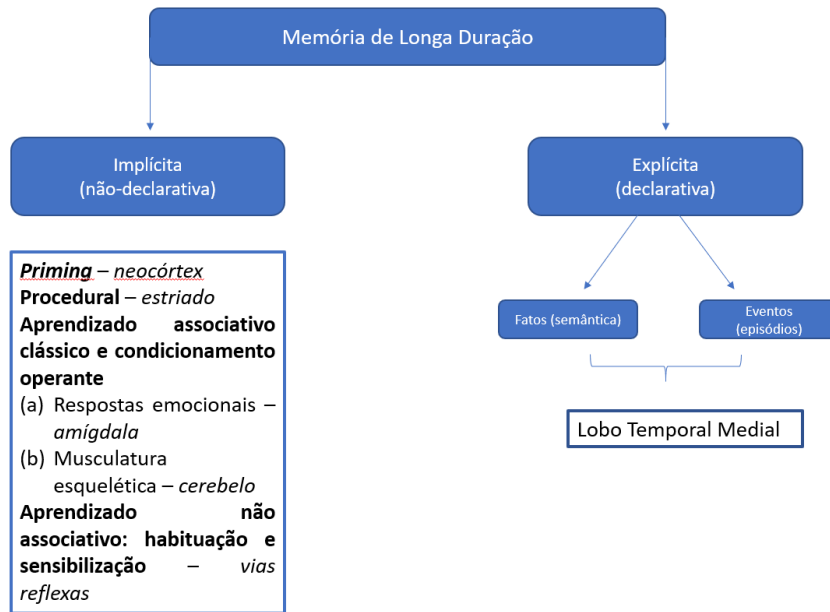


Figura 1 – Tipos de memória de longo prazo e áreas encefálicas envolvidas.

O processo de consolidação requer a síntese de RNA mensageiro (mRNA) e de proteínas nos neurônios do circuito. Dessa forma, a expressão de determinados genes é necessária para a formação de memória de longo prazo. O fenômeno de transição da memória de curto prazo para memória de longo prazo envolve um aumento prolongado de AMPc, levando a uma ativação prolongada da PKA, permitindo que a subunidade catalítica da quinase seja translocada para o núcleo do neurônio sensorial. Além disso, ocorre indiretamente a ativação da MAPK. Dentro do núcleo, a subunidade catalítica da PKA fosforila e ativa o fator de transcrição CREB-1 (abreviação do inglês *cAMP response element binding protein 1*), que se liga ao promotor chamado CRE (elemento reconhecedor de AMPc, de *cAMP responsive element*) (Kandel et al., 2014 e Wang & Peng, 2016).

A ativação da transcrição gênica depende do recrutamento da proteína de ligação do CREB (CBP, de *CREB-binding protein*) para a região promotora pela CREB-1 fosforilada. A CBP facilita a ativação da fosforilação por recrutar a RNA-polimerase II e por acetilar resíduos de lisina em seus substratos proteicos, entre eles as histonas. A acetilação de histonas leva a mudanças estruturais e funcionais dos nucleossomas (Kandel et al., 2014 e Wang & Peng, 2016).

A ativação da transcrição pela PKA também depende de sua capacidade de ativar indiretamente a via da MAPK. A ação inibidora do fator de transcrição CREB-2 é desfeita pela MAPK fosforilada e a combinação dessa ação com a ativação do CREB-1

induz uma cascata de expressão de novos genes que são fundamentais no processo de aprendizagem e memória (Kandel et al., 2014 e Wang & Peng, 2016).

A regulação da transcrição por um fator repressor (CREB-2) e um fator ativador (CREB-1) no primeiro passo da facilitação de longa duração determina a facilidade na transferência de uma memória de curto para longo prazo (Kandel et al., 2014 e Wang & Peng, 2016).

Para a ativação da CREB-1 são importantes os genes da enzima hidrolase da porção carboxiterminal da ubiquitina e o gene da proteína intensificadora de ligação à caixa CAAT (C/EBP, de *CAAT box enhancer binding protein*) – envolvido no crescimento de novas conexões sinápticas. A hidrolase aumenta a ativação da PKA. A PKA possui duas subunidades catalíticas e duas subunidades reguladoras, que reprimem a ação das primeiras. O treinamento de longa duração e a ativação da hidrolase degradam 25% das unidades reguladoras. Dessa forma, mesmo depois de os níveis de AMPc estarem em seus níveis basais, as subunidades catalíticas livres fosforilam proteínas, como a CREB-1, resultando em aumento da liberação de neurotransmissores e fortalecimento das conexões sinápticas (Kandel et al., 2014 e Wang & Peng, 2016).

Ainda, a ativação da CREB-1 leva a ativação do fator de transcrição C/EBP. O C/EBP ativado forma um homo ou um heterodímero (com o fator de ativação) e, junto, atuam em genes que desencadeiam o crescimento de novas conexões sinápticas, sustentando a memória de longa duração (Kandel et al., 2014 e Wang & Peng, 2016).

O envolvimento da família de proteínas cAMP/PKA/CREB na formação de memória de longo prazo foi estabelecido através de estudos em diferentes espécies, desde a *Aplysia*, passando pelas drosófilas e ratos (Bernabeu et al., 2007). Em camundongos knockout para CREB, há prejuízo na consolidação de memórias de longo prazo, tanto em tarefas aversivas, como em tarefas que envolvem a memória espacial, sem alterar a aquisição e a memória de curto prazo (Bourtchuladze et al., 1994). É importante citar que a ativação da sinalização cAMP no hipocampo, também é dependente de outros receptores, como os dopaminérgicos (D1/D5) (Bernabeu et al., 2007).

Os mecanismos citados acima conduzem a processos que facilitam a ativação sináptica e conduzem ao fortalecimento e crescimento de novas conexões sinápticas, resultando na efetividade do processo de sensibilização de longa duração.

Diversos testes clínicos são utilizados para avaliação da memória em seres humanos, uma vez que a alteração nesse domínio cognitivo é utilizada como critério diagnóstico e diferencial entre as síndromes demenciais. Nos estudos pré-clínicos, vários testes foram desenvolvidos para avaliar a participação de diferentes áreas encefálicas no processamento da memória. Como descrito anteriormente, dependendo do tipo de memória formada e do estímulo que a condiciona, diferentes áreas parecem estar mais ou menos envolvidas. Longe de estarem completamente compreendidos do ponto de vista funcional, esses modelos pré-clínicos são amplamente usados por pesquisadores na área das neurociências, apresentando benefícios e limitações.

Em nosso estudo utilizamos dois testes considerados neutros, ou seja, a sua realização não implica ao animal um contexto de medo, ameaça à vida ou resposta condicionada a estímulos externos – memória de reconhecimento de objetos e memória de localização de objetos. Também utilizamos um teste de memória aversiva – teste de esquiva inibitória – no qual o animal “aprende” que determinada atitude por sua parte é responsável por uma “consequência” que lhe impõe ameaça. Nos itens seguintes iremos discutir brevemente cada um desses testes e dos substratos neurais envolvidos nos mesmos.

Teste de Reconhecimento de Objetos e de Localização de Objetos – Memória Neutra

Descrito por Ennaceur & Delacour em 1988, o teste de reconhecimento de objetos (RO) utiliza o instinto exploratório inato dos roedores. Esse teste apresenta algumas características que o tornam bastante interessante: (1) semelhança com testes de reconhecimento visuo-espaciais utilizados em primatas não-humanos, permitindo comparações interespecies; (2) é inteiramente baseado em um comportamento espontâneo dos roedores, podendo ser utilizado para avaliação de diferentes categorias temporais de memória em dependência do tempo entre o treino e o teste; (3) não envolve reforços primários (como alimento e/ou choques), isso o torna comparável aos testes de memória utilizados na clínica (Ennaceur & Delacour 1988). Essas características descritas para o RO podem ser transladadas para o teste de LO. Ressaltando, ainda, que o teste de LO testa exclusivamente capacidades relacionadas à memória espacial dos roedores (Cohen & Stackman, 2015).

Esse teste de memória avalia, basicamente, o envolvimento do hipocampo na formação da memória e o córtex perirrinal. O hipocampo é particularmente importante na memória de localização de objetos (Cohen & Stackman, 2015).

Teste de Esquiva Inibitória – Memória aversiva

A tarefa de esquiva inibitória é frequentemente utilizada com roedores para estudar memórias aversivas ou de medo, ela envolve a capacidade do roedor de aprender a inibir uma resposta natural (instinto), para evitar um estímulo aversivo (choque). Áreas corticais envolvidas na tarefa incluem o hipocampo dorsal e a amígdala (Perez et al., 2010).

Estrogênios e Memória

O papel do estrogênio na função cognitiva e na memória é confirmado pela observação que mulheres pós-menopausa ou submetidas à ooforectomia passam a apresentar prejuízo cognitivo. Interessantemente, alguns desses déficits melhoram após a terapia de reposição hormonal, especialmente quando esta é iniciada imediatamente após a perda dos hormônios ovarianos (Sherwin et al., 2009).

O modelo considerado padrão ouro para estudar os efeitos da privação dos hormônios gonadais, em estudos pré-clínicos, é a ovariectomia (OVX). A excisão bilateral dos ovários em roedores é o melhor modo de avaliar os efeitos da privação hormonal e também para compreender os efeitos do tratamento com hormônios exógenos no cérebro e também na periferia (Koebele et al., 2016). Os estudos em roedores utilizando o modelo de OVX demonstraram que a capacidade do estradiol em melhorar o desempenho dos animais quando submetidos às tarefas de aprendizado e de memória espacial, dependem da idade do animal, da dose de estradiol e do momento em que a reposição hormonal é iniciada. Ainda, a relação entre a dose de estradiol e a memória pode ser descrita como uma curva em formato de “U” invertido, pois, quando os níveis de estradiol ultrapassam os valores fisiológicos há prejuízo à memória semelhante ao observado no hipoestrogenismo (Bean et al., 2014).

O uso do modelo de OVX na literatura para avaliação do papel da ausência de estradiol provocado pelo mesmo é amplo. O trabalho de Talboom *et al* (2008) realizou o procedimento cirúrgico em ratas jovens (quatro meses de idade) e de meia idade

(dezesseis semanas de idade) e, após a recuperação da cirurgia, submeteu um dos grupos a terapia de reposição hormonal com estradiol utilizando pellets que liberavam 0.25 mg ou 0.50 mg de estradiol por 60 dias. Os animais foram submetidos, então, ao labirinto de Morris para avaliação da memória espacial. Esse trabalho demonstrou que as ratas jovens ovariectomizadas e submetidas ao tratamento de reposição hormonal apresentaram um desempenho melhor no desempenho dessa tarefa que as ratas ovariectomizadas que não receberam estradiol, demonstrando o papel do E2 na memória espacial. Além disso, esse efeito foi dose dependente, os animais que receberam maiores doses de estradiol apresentaram um desempenho ainda melhor no labirinto de Morris (Talboom et al., 2008).

Rodgers *et al* (2010) utilizou a terapia de reposição hormonal breve (por 10 dias) em ratas com dez a onze meses de idade ovariectomizadas, esses animais apresentaram também melhora em tarefas de memória espacial bem como uma expressão de ER α aumentada no hipocampo. Além disso, o tratamento curto com estradiol foi capaz de atenuar efeitos amnésicos induzidos pela administração de escopolamina. O grupo de animais ovariectomizados e exposto a um período maior de terapia de reposição hormonal apresentou o mesmo desempenho dos animais expostos brevemente (Rodgers et al., 2010).

No que diz respeito ao GPER, Hawley *et al* (2014) utilizou o modelo de OVX e, então, submeteu os animais a um tratamento agudo com o agonista do GPER, G-1 (25 ug, por via subcutânea), imediatamente após o treinamento no labirinto em Y. Após 24h e 48h os animais apresentaram uma preferência significativamente maior por explorar o novo ambiente do labirinto que os animais submetidos à ovariectomia que receberam tratamento com veículo. Dessa forma, evidenciando que o tratamento com o agonista do GPER melhora a memória de reconhecimento espacial em ratas, assim como o E2 havia demonstrado nos dois trabalhos citados anteriormente (Hawley et al., 2014).

O estradiol está envolvido em diversas funções de neuroproteção, como a manutenção da homeostasia da barreira hematoencefálica, proteção cerebral contra acidentes vasculares e controle da neuroinflamação (Jones e Brewer et al., 2009). O estradiol promove, ainda, o crescimento de sinapses glutamatérgicas e influencia a função mitocondrial. Essas ações são fundamentais para a manutenção da função cognitiva, memória e proteção contra danos celulares associados ao estresse cognitivo (Foster et al., 2016).

Na formação da memória, as alterações celulares envolvendo o estradiol dependem do tipo de receptor ativado. Apesar do receptor de estradiol clássico mais expresso no hipocampo ser o ER β , o ER α parece ser mais ativo no que diz respeito à transcrição gênica (Bean et al., 2014). Isso se deve, em parte, à maior afinidade do estradiol por esse receptor. Entretanto, na presença de níveis baixos de estradiol, o ER β pode formar um heterodímero com o ER α e atuar como um regulador negativo da sua função. Dessa maneira o ER β tem um importante papel na regulação da ativação do ER α (Foster et al., 2012). A sinalização rápida que ocorre no hipocampo na presença de estradiol é dependente da ativação do GPER e da interação dos ER α e ER β com receptores metabotrópicos (Pettersson et al., 2000).

O uso de agonistas de GPER, através de infusão intrahipocampal ou sistêmica, é associado com um melhor desempenho de roedores submetidos à ovariectomia, quando estes são submetidos a testes para avaliação de reconhecimento de objetos e de memória espacial. Isso se dá através da ativação da via da c-Jun-Kinase e não depende da ativação da via das quinases reguladas por sinalização extracelular (ERK, abreviação do inglês do termo *extracellular signal-regulated kinases*) e/ou da via da fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt, abreviação em inglês do termo *phosphatidylinositol-3-kinases/ Protein kinase B*) (Kim et al., 2016). Estas duas últimas vias estão envolvidas na sinalização intracelular dependentes dos receptores ER α e ER β . Isto confere ao GPER uma ativação hipocampal independente dos demais receptores de estrogênio, tornando-o assim, um alvo farmacológico bastante interessante (Foster et al., 2016).

Receptores de estrogênio

Embora ultrapassado, o conceito farmacológico clássico de um ligante associando-se a um receptor e exercendo seus efeitos biológicos como um perfeito encaixe “chave-fechadura” talvez sirva para a compreensão da vasta gama de efeitos genômicos e não-genômicos que se descortina a partir da ativação dos diferentes tipos de receptores para estrogênios.

Já em 1958, o pesquisador Elwood Jensen demonstrou a existência dos receptores de estrogênio (ER, sigla dos termos em inglês, *estrogen receptor*). No ano de 1966, o subtipo alfa (ER α) teve seu gene clonado e, somente trinta anos depois, clonou-se o subtipo beta (ER β), a partir da próstata e ovário de ratos (Nakao et al., 1966). Ambos são considerados receptores clássicos de estrogênio e são expressos em diferentes tecidos. O ER α predomina nos tecidos reprodutivos (ovário, útero), além de estar presente em mamas, rins, ossos, tecido adiposo e fígado. É associado aos efeitos feminilizantes estrogênicos e, o gene que codifica para este ER está localizado no cromossomo 6. Os ER β estão presentes nos ovários, no sistema nervoso central, sistema cardiovascular, pulmões, órgãos sexuais masculinos, próstata, cólon, rins e no sistema imune (Jia et al., 2015). O gene que codifica para este ER está localizado no cromossomo 14. Ambos receptores fazem parte da família de receptores nucleares e, portanto, são encontrados predominantemente no citoplasma, podendo estar localizados nas mitocôndrias. Os efeitos celulares do estrogênio, mediados pelos receptores alfa e beta, são conhecidos como genômicos e envolvem: (1) a formação de homo ou heterodímeros de ER no citosol, após a ligação de E2; (2) a migração do complexo ligante-homo/heterodímero em direção ao núcleo da célula; (3) a ligação específica a elementos responsivos ao estrogênio (ERE) em regiões promotoras e reguladoras dos genes alvo. A ligação do estrogênio leva à interação com fatores de transcrição e proteínas modificadoras do DNA (**Figura 2**). Qualquer uma dessas vias vai resultar na modificação da resposta celular, bem como de suas funções (Khan et al., 2016).

Em 1990, o receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER), com sete domínios transmembrana, foi identificado por diversos laboratórios, inicialmente como um receptor órfão, sendo denominado de GPR30 (Khan et al., 2016). Em 2005, após uma série de estudos visando a busca do ligante para o GPR30, este foi identificado como um receptor de estrogênio acoplado à proteína G, recebendo o nome de GPER, pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR, abreviação da sigla em inglês *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) (Revankar et al., 2005). A localização do GPER permanece controversa; inicialmente, foi descrito como localizado na membrana plasmática extracelular, comportando-se como um clássico receptor acoplado à proteína G (GPCR) (Filardo et al., 2002). Porém, estudos demonstraram que em vários tecidos, quando em estado de repouso, esse receptor pode

ser encontrado em membranas intracelulares (incluindo o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi) (Revankar et al., 2005b).

Em 2014, Cheng e colaboradores descreveram novamente a localização do GPER na superfície da membrana celular, pelo menos em determinados tipos celulares (Cheng et al., 2014). Uma solução para a controversa localização do receptor pode ser encontrada a partir de descobertas recentes que demonstram que o GPER pode sofrer internalização mediada por clatrin, sendo assim, transportado da superfície celular para membranas intracelulares. Isso poderia explicar a não detecção ou a detecção de baixa expressão desse receptor em diversas superfícies celulares (Bean et al., 2014).

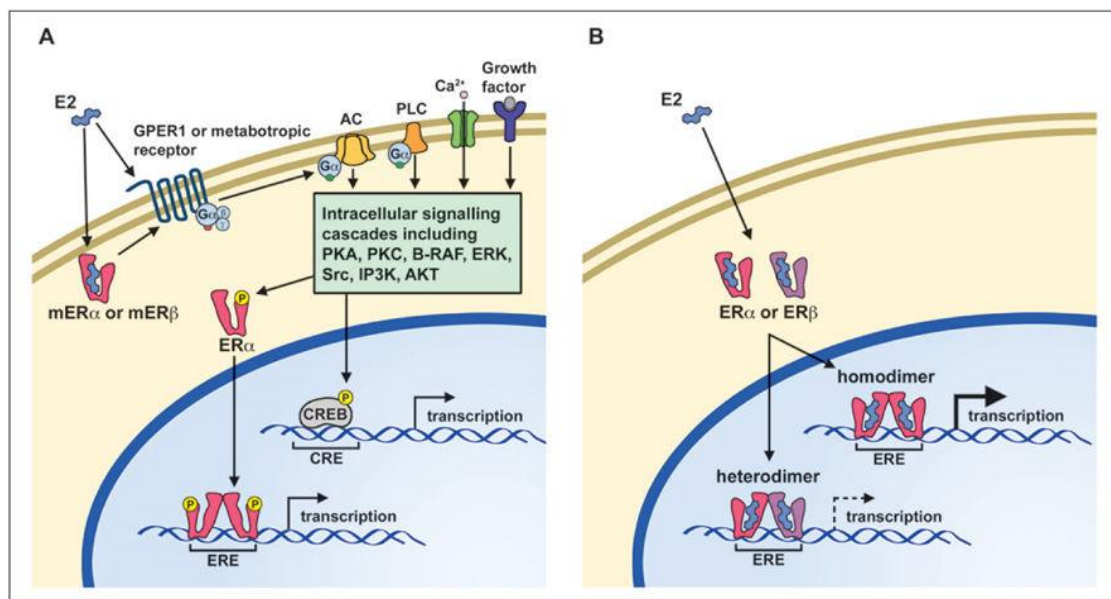


Figura 2 – Vias de Sinalização Intracelular do Estradiol. (A) Via de sinalização rápida do estradiol através do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) e dos receptores de membrana ativados por estradiol (mER α ou mER β), essa sinalização rápida é dependente de diferentes cascatas intracelulares que levam a alterações fisiológicas rápidas ou levam à fosforilação do receptor de estrogênio do tipo alfa (ER α) e do fator de transcrição CREB. (B) A via de sinalização clássica ou genômica, na qual a ligação dos estrógenos aos ER α ou ER β ocorre no citoplasma ou no núcleo celular, levando a formação de um complexo homo ou heterodímero o qual se liga no elemento responsivo ao estrogênio (ERE) dentro do DNA (Bean et al., 2014).

Através do uso de animais *knockout* e de agonistas e antagonistas seletivos para o GPER, sua função foi descrita em praticamente todos os órgãos e sistemas, mediando tanto funções fisiológicas, como tendo participação em condições patológicas

(Revankar et al., 2005). Essa grande gama de atuação e participação gera bastante expectativa no desenvolvimento de drogas e terapias que tenham o GPER como alvo.

GPER e Sistema Nervoso Central e Periférico

Os estrogênios exercem diversos efeitos, tanto no sistema nervoso central, quanto periférico, tanto por via endócrina (produção ovariana), quanto parácrina (esteroidogênese central). Regulam o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, o comportamento sexual e, estão envolvidos na plasticidade sináptica, comportamento, memória, cognição e dor (Zhang et al., 2014). Evidências recentes sugerem uma grande importância do GPER em muitas dessas funções, uma vez que necessitam de uma resposta rápida, que apenas poderia ser explicada por um receptor não-genômico. A expressão do GPER (proteína e o mRNA) já é bem descrita, em roedores machos e fêmeas, em diversos locais do sistema nervoso central e periférico, incluindo o córtex, hipocampo, hipotálamo, núcleos específicos da ponte, núcleo trigeminal, cerebelo, na medula espinhal e no gânglio dorsal da medula (Brailoiu et al., 2007; Dun et al., 2009 e Hazell et al., 2009).

O GPER, assim como os demais membros da superfamília de GPCR, está acoplado a proteínas heterotriméricas as quais ativam uma variada gama de cascatas intracelulares (Cheng et al., 2014). Evidências apontam que o GPER está ligado tanto à proteína Gi/o quanto à Gs. A ativação do receptor, leva à ativação da ERK1/2, da via da PI3K/Akt, c-AMP/MAPK e ativação da eNOS. Estudos complementares também relatam a mobilização de cálcio por uma via dependente do GPER, bem como, a regulação de canais de potássio (Sherwin et al., 2009; Talboom et al., 2008 e Foster et al., 2016).

O composto G-1 $[\pm]$ -1-[(3aR*,4S*,9bS*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]- ethanone] foi identificado em 2006, como sendo um agonista potente e seletivo do GPER ($K_i = 11$ nM, $EC_{50} = 2$ nM), não tendo efeitos sobre os receptores clássicos alfa e beta. Tem sido utilizado, desde então, para a caracterização dos efeitos desse receptor, em conjunto com o composto G-

15 [4-(6-bromo-benzo [1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolone] (K_i = 20 nM, EC₅₀ of ~185 nM) que tem função de antagonista desse receptor (Bologa et al., 2007 e Dennis et al., 2009)

Já está bem consolidada na literatura a importância dos estrogênios na memória; sendo crescente o interesse em caracterizar as vias responsáveis pela influência hormonal na mesma. Porém, quando iniciamos nossa investigação, na base de dados PUBMED (maio/2016), observamos poucos estudos caracterizando o papel do GPER na formação da memória e nenhum deles utilizava o modelo de neurodegeneração padronizado por nosso laboratório (maiores detalhes em seguida). Também existiam poucas publicações explorando o papel desse receptor em doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer. Em nova pesquisa no PUBMED, em novembro de 2017, persistem os mesmos resultados observados no início de nosso trabalho.

O papel do estrogênio em doenças neurodegenerativas: um horizonte a explorar

A doença de Alzheimer (DA) é uma alteração neurodegenerativa associada a déficits de cognição e memória. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que os principais fatores de risco para o seu desenvolvimento são a idade e o sexo. A maior longevidade das mulheres seria um importante fator de confusão entre a maior prevalência dessa doença em mulheres, não fosse a observação de que o risco de aparecimento dessa doença é maior em mulheres em todas as faixas etárias a partir da menopausa (Viña et al., 2010). Ainda, esse fator de risco relacionado ao sexo feminino parece ser algo único da demência de Alzheimer, uma vez que outros quadros demenciais como o declínio cognitivo leve e a demência fronto-temporal não apresentam esse fator de risco (Global Burden of Disease Study 2013). A menopausa, caracterizada pela insuficiência ovariana e, conseqüentemente, decréscimo importante dos níveis de E2 circulantes, demarca o momento em que as mulheres apresentam aumento na incidência de mal de Alzheimer. Esses fatores demonstram um papel protetor do estrogênio no aparecimento da doença. Essa proteção se daria pela capacidade do estradiol em diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo secundário à presença do peptídeo β -amiloide (A β) no sistema nervoso central (Khan et al., 2016). Além disso, os estrogênios afetam o transporte de colesterol e lipídeos e, no

cérebro, o estrogênio regula a expressão da proteína relacionada ao receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ambos fatores estão implicados no processamento do A β (Hare et al., 2015).

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica que afeta o sistema nervoso central. A EM causa distúrbios neurológicos progressivos e recorrentes devido à desmielinização e ao dano axonal. Caracteriza-se pela presença de autoantígenos reativos TCD4+ cuja ação leva a danos na bainha de mielina dos axônios, causando a morte axonal e prejuízos na comunicação, com morte neuronal. Dados de 2013 apontam que 2,3 milhões de pessoas no mundo são acometidas por essa patologia, com importantes variações nas taxas de incidência, quando são comparadas diferentes populações e regiões (Polanczyk et al., 2003). Embora acometa mais mulheres (taxa de prevalência mulheres:homens de 2,3 a 5,1: 1), o estrogênio apresenta papel protetor no desenvolvimento e nas taxas de progressão da doença. Isso foi observado através da constatação que durante o período gestacional em que há aumento nos níveis circulantes de estrogênios e progesterona, as mulheres com EM apresentam menores taxas de recaída e progressão da doença. Na EM, esses hormônios são responsáveis por diminuição do processo inflamatório e por neuroproteção, atuando através de receptores de estrogênio do tipo alfa, diminuindo moléculas inflamatórias autoantígeno-específicas como: interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a quimioproteína atrativa de monócitos (MCP-1) (Wang et al., 2009).

No sistema nervoso central, as microglias desempenham importantes funções relacionadas à sustentação e vigilância imune local, podendo apresentar tanto um perfil pró-inflamatório como anti-inflamatório. O perfil reativo microglial é encontrado e está associado ao envelhecimento fisiológico, bem como às patologias degenerativas como a Doenças de Parkinson, DA e a EM. Essa regulação e mudança fenotípica desse tipo celular tem sido atribuída a diversos fatores, entre eles, aos estrogênios (Khan et al., 2016). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* tem atribuído aos estrogênios importância na regulação desse fenótipo e que poderiam explicar o efeito neuroprotetor que é atribuído ao estradiol, já que esse hormônio parece reduzir como o estresse oxidativo intra e extramicroglial através do reestabelecimento das funções mitocondriais e de seus sistemas anti-oxidativos e modificar a ativação de vias intracelulares que levam a reatividade microglial e consequente transcrição de fatores pró-inflamatórios. A atuação

dos estrogênios sobre as micróglias parece ser mediada por ER α e potencialmente também pelo GPER (Hare et al., 2015).

Contextualizando os dados apresentados com o presente projeto de pesquisa, encontra-se na literatura o trabalho de Wang Et al (2009). Nesse trabalho, utilizou-se o modelo murino de esclerose múltipla, conhecido como encefalomielite autoimune experimental (EAE). Foi demonstrado que os efeitos neuprotetores do estrogênio na diminuição do dano axonal dependem da presença do GPER, uma vez que camundongos *knockout* para esse receptor (GPER K01) apresentavam pior desempenho nos escores clínicos da avaliação do modelo e maior dano tecidual nos estudos histopatológicos que os animais selvagens (Wang et al., 2009).

Metabolismo do Ferro no Sistema Nervoso Central: o papel desse metal na saúde e na doença

Nosso laboratório é bastante entusiasta em estudar o papel do ferro em processos neurodegenerativos, buscando compreender a importância desse metal na saúde e na doença no sistema nervoso central. Esse entusiasmo parte de importantes considerações: (1) o ferro é o metal mais abundante no corpo humano; (2) o cérebro é o segundo local onde seu armazenamento é maior; (3) importantes processos dentro do sistema nervoso central dependem da presença de ferro (Schröder et al., 2013).

Dissecando o terceiro item citado, a literatura demonstra que as funções biológicas do ferro se baseiam no seu potencial REDOX, permitindo sua interconversão entre o cátion divalente, ou ferroso (Fe²⁺) e o cátion trivalente, ou férrico (Fe³⁺), ou seja, tanto pode doar como receber elétrons (Janetzky et al., 1997). Essas funções biológicas do ferro são essenciais para fosforilação oxidativa; a síntese de DNA, RNA e proteínas; atuação como cofator para enzimas, como a monoamina oxidase, síntese de mielina, metabolismo de óxido nítrico e transporte de oxigênio (Crichton et al., 2008).

Envolvido de maneira tão crítica em diversos processos biológicos é de se pensar que a homeostase desse metal é um dos grandes desafios de todos os organismos, evitando a toxicidade associada ao excesso de ferro. Nesse processo estão envolvidas diversas barreiras e mecanismos que modulam desde a sua absorção, até a sua passagem da corrente sanguínea para os mais variados órgãos (Andrews et al., 2007). Em relação

ao cérebro, esse papel de controle entre as substâncias que circulam livremente no plasma e o parênquima cerebral é mediado, de maneira sucinta, por três interfaces: (1) barreira hematoencefálica (BBB – *blood brain barrier*), uma barreira física formada por junções endoteliais do tipo “*tight junctions*”, os tipos celulares que constituem a BBB incluem células endoteliais microvasculares, astrócitos e pericitos; (2) barreira entre o líquido cefalorraquidiano e o sangue e (3) barreira aracnóide (Abbott et al., 2009).

A captação de ferro é controlada pela BBB através da regulação da transferrina (proteína de transporte) e, do receptor de transferrina. A partir do plasma, o transporte de ferro vai envolver o ciclo celular da transferrina através de endocitose mediada pelos receptores de transferrina das células epiteliais que revestem a BBB. Após esse processo de endocitose, as células endoteliais do capilar cerebral absorvem o ferro ligado à transferrina. Isto é seguido pela liberação de ferro do endossomo no fluido intersticial cerebral pela ferroportina exportadora de ferro (fpn), que medeia a liberação do ferro em conjunto com ceruloplasmina (Cp) e, que deve oxidar o Fe^{2+} transportado pela fpn para Fe^{3+} antes da liberação para o meio extracelular. Uma vez no interstício do cérebro, o ferro pode se ligar à moléculas grandes tais como a transferrina ou lactoferrina (McCarthy et al., 2015 e Wu et al., 2004).

Muitos avanços têm elucidado cada vez mais a intrincada interface que envolve o transporte de ferro entre a membrana hematoencefálica e o interstício cerebral. O papel das células endoteliais microvasculares cerebrais foi exaustivamente citado em uma revisão de Mc Carthy e Kosman (2015), uma vez que a morfologia inerente a essas células permite a formação de duas superfícies distintas: uma do lado da corrente sanguínea (apical) e a membrana basal (lado cerebral), basolateralmente a essa membrana estão astrócitos, cuja função é proteger o tecido nervoso central de danos químicos. Recentemente esses astrócitos foram implicados no efluxo basolateral de ferro na microvasculatura cerebral, possivelmente por encapsularem as células endoteliais microvasculares cerebrais (Mc Carthy e Kosman, 2015 e Oide et al., 2006).

Mc Carthy e Kosman também propõem que uma unidade neurovascular, composta pelas células endoteliais microvasculares cerebrais, astrócitos e neurônios, seriam capazes de se comunicarem através de sinalização justácrina. Essa comunicação seria uma resposta às necessidades metabólicas de cada um dos componentes dessa unidade neurovascular (Mc Carthy e Kosman, 2015).

Durante o período neonatal, a absorção de ferro é máxima e é fundamental para o desenvolvimento neurológico normal, sendo também responsável pelas concentrações de ferro na vida adulta. No desenvolvimento cerebral, o ferro presente na substância branca, encontrado em altos níveis nos oligodendrócitos, é associado ao adequado processo de mielinização. O ferro absorvido nesse período de desenvolvimento fica retido no cérebro (Moos, 2002; Connor et al., 1995; Dwork et al., 1990).

Distúrbios na homeostase do ferro representam um achado em diversas desordens neurodegenerativas, desde doenças menos comuns como a aceruoplasminemia até as mais frequentes como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e EM (Dexter et al., 1990).

A fonte para essa alteração homeostática e, conseqüentemente, acúmulo excessivo de ferro em regiões do cérebro (como o córtex, hipocampo e substância nigra) podem ser várias, como sangramentos, influxo de macrófagos contendo ferro ou a desregulação nas vias de transporte de ferro através da barreira hematoencefálica. Cada uma dessas fontes será detalhada nos próximos itens (Duseka et al., 2016).

Hemorragias cerebrais podem trazer grandes quantidades de ferro a partir da degradação do grupo heme da hemoglobina. Sangramentos subaracnoides repetitivos também levariam a hemossiderose superficial no sistema nervoso central e deposição de ferro na pia mãe (Koeppen et al., 2008). As microangiopatias, causando microsangramentos também representam uma importante hipótese para a deposição de ferro no parênquima. É bem descrito na literatura que o extravasamento eritrocitário pode se propagar através dos espaços perivasculares, desencadeando respostas inflamatórias e contribuindo para o depósito de ferro em áreas distantes do sítio primário de sangramento (Adams, 1988). É digno de nota que lesões desmielinizantes na EM estão localizadas tipicamente ao redor de veias centrais e o extravasamento de hemácias através das paredes venosas lesionadas pela inflamação perivascular poderiam explicar a deposição de ferro observada nesses focos de desmielinização (Schrag et al., 2010).

As mudanças encontradas no cérebro que sofre processo neurodegenerativo são acompanhadas por infiltrados de células fagocíticas. Essas células podem ser atraídas pelo acúmulo de ferro originado do dano aos oligodendrócitos e neurônios como também podem ser células fagocíticas ricas em ferro que migram para o sistema

nervoso como parte de uma resposta inflamatória, podendo por si mesmas, formarem aglomerados patológicos de ferro Andersen et al., 2014). Essa visão é embasada em um estudo que utilizou um modelo de degeneração da substância negra em ratos utilizando o ácido ibotênico em que o processo neurodegenerativo foi acompanhado por um influxo de macrófagos carregados de ferro (Thomsen et al., 2015).

Alterações na regulação de vias de transporte de ferro podem levar a aumentos da recaptção desse metal. Essa proposição vem da observação clínica de que alterações em proteínas envolvidas no transporte e armazenamento de ferro como a ceruloplasmina e a cadeia leve de ferritina podem levar a desordens hereditárias neurodegenerativas conhecidas como aceruloplasminemia e neuroferritinopatia, respectivamente. Nas duas doenças, há aumento na concentração cerebral de ferro (Harris et al., 1995). Como dito anteriormente, o ferro é essencial em diversas funções celulares, como a produção de energia, síntese e reparo do DNA, metabolismo fosfolipídico, mielinização e síntese de neurotransmissores. Quando essas funções apresentam prejuízo ou são exacerbadas, a demanda de ferro por parte dos neurônios pode aumentar (Mastroberardino et al., 2009). Nas doenças desmielinizantes, a necessidade de aumentar a produção de mielina, o aumento do consumo metabólico em situações de isquemia cerebral ou nas desordens mitocondriais, podem ocorrer aumento na captação de ferro através de mecanismos de *upregulation* de receptores de transferrina ou da ativação de fatores induzidos por hipóxia do tipo 1- α (HIF- α) (Curtis et al., 2001). Em circunstâncias fisiológicas, o ferro pode ser reciclado através de vias de degradação lisossomal de proteínas ou organelas ricas em ferro (Duseka et al., 2015). Porém, por exemplo, quando essa via falha, há aumento da captação de ferro a partir do plasma, como temos fonte alternativa para o aumento na deposição de ferro no parênquima cerebral.

Além das fontes acima explicadas, outros fatores ainda pouco esclarecidos, podem estar relacionados ao acúmulo de ferro observado nas doenças neurodegenerativas. Hare e colaboradores (2015) propuseram recentemente que a exposição a níveis elevados de ferro durante o período do desenvolvimento do sistema nervoso poderia representar um risco aumentado para doenças neurodegenerativas ao longo do envelhecimento (Hare et al., 2015).

A despeito da origem do acúmulo de ferro, diversos mecanismos patológicos são associados à sua toxicidade. Dentre eles, o estresse oxidativo aumentaria o risco de dano celular, a partir do desequilíbrio na síntese de proteínas de armazenamento de ferro

(ferritina, hemosiderina, neuromelanina) e de ferro livre (Zecca et al., 2004). Estas disfunções de proteínas de armazenamento de ferro podem ser um evento normal no envelhecimento que explicaria a predisposição de doenças neurodegenerativas em idosos. Os radicais livres podem danificar proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, causando dano irreversível para as células e induzindo morte celular por apoptose ou necrose (Quintana et al., 2006). Diversas razões explicam a vulnerabilidade do sistema nervoso a esse tipo de dano: o cérebro é pobre em antioxidantes endógenos, consome grande quantidade de oxigênio e contém uma grande quantidade de lipídios e ferro que estão envolvidos na formação de radicais livres (Lee et al., 2006).

Além da associação do acúmulo de ferro com doenças neurodegenerativas, também se percebeu ao longo dos últimos anos que o ferro estaria envolvido com déficits cognitivos. O interesse em compreender o papel do ferro e a sua associação com a função cognitiva tem aumentado nas últimas décadas. Diversas técnicas empregando aparelhos de Ressonância Magnética (MRI – sigla do termo em inglês *Magnetic Resonance Imaging*) tem sido utilizadas, porém sem consenso em relação ao melhor método até agora. Devido às propriedades paramagnéticas, o ferro cerebral é medido através das taxas de relaxação transversal (R2). Estudos utilizando pacientes e a avaliação de ferro através de MRI, evidenciaram que a presença desse metal em diversas áreas do cérebro relaciona-se a pior desempenho em diferentes testes cognitivos. Por exemplo, no *globus pallidus*, a presença de ferro relaciona-se a pior desempenho em testes cognitivos que avaliam atenção e conhecimento implícito. Já no córtex temporal, índices aumentados de ferro detectados na MRI são associados com piores resultados de memória e aprendizado verbal. A presença de ferro no hipocampo e nos gânglios da base foi avaliadas em 63 idosos saudáveis (idade 67 ± 6.1 anos, média e desvio-padrão) e níveis aumentados de ferro nessas regiões correlacionaram-se com alterações na memória declarativa, memória de trabalho (*working memory*) e velocidade de processamento de informações. Esses são apenas alguns dos trabalhos encontrados na literatura e que correlacionam alterações nos níveis de ferro cerebral com alterações cognitivas (Schröder et al., 2013).

Modelo de disfunção cognitiva induzida pelo tratamento com ferro

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

Um estudo inicial investigou déficits de memória induzidos pela administração pós-natal de diferentes doses de ferro. Os resultados deste estudo foram: a) no labirinto radial, déficits significantes de aprendizagem foram obtidos para todos os grupos que receberam ferro nas doses de 2.5, 7.5, 15.0 e 30.0 mg/kg no período pós-natal. A análise dos quocientes de retenção, comparando o desempenho nos dias de teste de 1 e 5 confirmou os efeitos prejudiciais de cada dose de ferro; b) déficits significantes na tarefa de esquivia inibitória foram vistos nos grupos tratados com 7.5 e 22.5 mg/kg de ferro, na verdade estes grupos mostraram bloqueio completo de retenção de memória, isto é, não houve diferença entre latências de treinamento e de teste; c) foi observado que a dose mais elevada administrada, 30 mg/kg, reduziu significativamente o comportamento ambulatorio de ratos durante o período de teste de 15 minutos em campo aberto; d) análises dos níveis de ferro total ($\mu\text{g/kg}$) na substância negra indicaram um aumento significativo nos grupos tratados com doses de 7.5, 15.0 e 30.0 mg/kg (Schröder et al., 2001).

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

Recentemente, outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que o ferro induziu um aumento significativo nos níveis da proteína apoptótica caspase 3 tanto no hipocampo como no córtex, enquanto houve uma redução significativa de níveis do marcador sináptico sinaptofisina no hipocampo. A expressão gênica de caspase 3 também foi aumentada no córtex (Da Silva et al., 2014).

Acredita-se que esta sobrecarga de ferro contribua para o desenvolvimento da neurodegeneração, para a exacerbação das taxas normais de apoptose, em grande parte devido à sua participação na reação de Fenton e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla do termo em inglês, *reactive oxygen species*) que resultam em

danos às células (estresse oxidativo) (Lee et al., 2006). A apoptose neuronal pode ser iniciada por meio de sinais, tais como privação de fatores de crescimento como as neurotrofinas, neurotransmissão excitatória glutamatérgica excessiva e estresse oxidativo que ativam cascatas de eventos intracelulares que podem incluir a produção de Par-4 e clivagem de procaspase-3 e ativação de caspase-3 (Mattson, 2000). Em outros estudos verificou-se que ratos adultos tratados com ferro no período neonatal apresentam maior dano oxidativo no hipocampo e no córtex, áreas em que se observa aumento da apoptose resultando em déficit de memória. Além disso, também tiveram um aumento na imunorreatividade para GFAP (marcador astrocitário) em áreas equivalentes do cérebro, sugerindo uma gliose astrocítica ativa ocupando espaços deixados pela morte neuronal (Miwa et al., 2011 e Fernandez et al., 2011).

A memória de reconhecimento de objetos pode depender, pelo menos em parte, da integridade do circuito do estriado, o que é consistente com o resultado do estudo anterior, indicando que a deficiência da memória de reconhecimento induzida pelo ferro foi associada com a atividade alterada de acetilcolinesterase (AChE) no corpo estriado. Apesar de anos de investigação, ainda não se sabe por que os níveis de ferro são anormalmente elevados em algumas regiões do cérebro em doenças neurodegenerativas. Além disso, não está claro se o acúmulo de ferro no cérebro desempenha um papel causal na neurodegeneração ou se é uma consequência do processo da doença. O estudo sugeriu que o acúmulo de ferro no cérebro prejudica a transmissão colinérgica o que pode ter implicações para a perda de memória observada em ratos que receberam sobrecarga de ferro neonatal. Com base nisso, o modelo animal pode ser considerado uma ferramenta para a investigação de mecanismos multifatoriais que interagem para produzir o declínio da memória observada em pacientes com doenças neurodegenerativas (Perez et al., 2010).

De Lima et al. (2007) mostrou que a terapia com quelante de ferro na idade adulta foi capaz de reverter o comprometimento cognitivo induzido pela sobrecarga de ferro no período neonatal em ratos. Os ratos tratados com ferro no período neonatal foram divididos em três grupos experimentais, sendo administrada por via intraperitoneal a deferoxamina (0,0, 30,0 ou 300,0 mg/kg). Os animais que receberam a maior dose de deferoxamina mostraram memória de reconhecimento normal, indicando que a terapia de quelação com o ferro na idade adulta foi capaz de reverter o déficit cognitivo induzido pela sobrecarga de ferro neonatal em ratos. Além disso, outro estudo

realizado por nosso grupo de pesquisa revelou que a terapia com deferoxamina reverteu o prejuízo na memória de reconhecimento e diminuiu o dano oxidativo às proteínas no córtex e no hipocampo causado pelo envelhecimento dos ratos (De Lima et al., 2007 e De Lima et al., 2008).

Todos os experimentos citados anteriormente foram realizados utilizando ratos machos, em fêmeas, ainda não se sabe quais os efeitos do modelo de declínio cognitivo induzido pela sobrecarga de ferro no período neonatal.

Especulamos se com fêmeas, a presença de estradiol irá conferir algum tipo de neuroproteção. Além disso, seria relevante, comparar as diferenças de comportamento e habilidades entre machos e fêmeas, utilizando o mesmo modelo experimental como forma de validar esse modelo na compreensão das diferenças observadas entre homens e mulheres no que diz respeito à prevalência, evolução e desfecho nas doenças neurodegenerativas. Adicionalmente, pretendemos combinar a sobrecarga de ferro no período neonatal com a indução de menopausa na idade adulta, com o intuito de observar uma possível interação entre estes dois fatores de risco para o declínio cognitivo.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar se o modelo de disfunção cognitiva induzida pelo tratamento com ferro no período neonatal induz déficits de memória quando utilizado em ratas, buscando a validação de um método experimental em animais que auxilie na compreensão das diferenças fisiopatológicas entre homens e mulheres em relação às doenças neurodegenerativas.

Investigar o papel do estradiol nas alterações de memória induzidas pelo tratamento de ferro no período neonatal, bem como determinar a função do receptor de estrogênios acoplado à proteína G (GPER) nesse processo estudando a participação da via da PKA/CREB.

Objetivos Específicos

- Avaliar a validade do método de indução de déficits de memória através da sobrecarga de ferro neonatal em ratas, utilizando testes de reconhecimento de objetos e de memória emocional.
- Verificar o efeito do tratamento com ferro no período neonatal sobre a memória em ratas submetidas ao modelo experimental de menopausa (OVX).
- Estabelecer o papel do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) nos possíveis déficits de memória induzidos pela sobrecarga neonatal de ferro através de estratégias farmacológicas de utilização do agonista desse receptor (G1), através da avaliação de tarefas comportamentais em ratas controle (cirurgia sham) e submetidas ao protocolo cirúrgico de ovariectomia.
- Investigar o envolvimento da via PKA/CREB, através da utilização de um inibidor da PKA, nos efeitos induzidos pelo agonista do GPER (G1) sobre a consolidação da memória em ratas submetidas a sobrecarga neonatal de ferro associada a OVX na idade adulta.

HIPÓTESES

- 1) O tratamento com ferro no período neonatal em ratas traria déficits cognitivos semelhantes ao observado em machos, validando o modelo já estabelecido em ratos;
- 2) O protocolo cirúrgico de ovariectomia traria déficits cognitivos adicionais aos observados com o modelo de sobrecarga neonatal de ferro;
- 3) O tratamento com o agonista do GPER, composto G-1, seria capaz de melhorar os déficits cognitivos causados pela sobrecarga neonatal de ferro no período neonatal e/ou depleção de estradiol induzida pela ovariectomia;
- 4) Os benefícios observados com o uso do composto G-1 seriam reduzidos e/ou anulados com o uso de um inibidor da PKA, o composto H-89, sugerindo o envolvimento da via PKA/CREB nos efeitos benéficos à consolidação de memória induzidos pelo GPER.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho avaliamos a influência hormonal do estradiol no contexto da sobrecarga neonatal de ferro sobre a memória.

Essa avaliação pré-clínica adquire uma importância fundamental uma vez que essa associação é vista tanto no envelhecimento normal, que é associado com um aumento na concentração de ferro no sistema nervoso central como na presença de patologias que tem a neurodegeneração como cerne fisiopatológico, como a doença de Alzheimer e na Doença de Parkinson onde o equilíbrio de ferro encontra-se prejudicado.

O papel do estrogênio no funcionamento do sistema nervoso central é bem validado e a sua concentração obedece a uma curva do tipo “U” invertido, uma vez que se seus extremos estão associados à piora cognitiva e tudo que se encontra entre eles à melhora da performance cognitiva através de aumento de fatores neuroprotetores, melhora da plasticidade neuronal, diminuição de neuroinflamação e estresse resultando em um melhor cognitivo global (Bean et al., 2014). Na menopausa, com a diminuição da circulação periférica de estradiol observa-se o aparecimento de declínios cognitivos o que parece ser responsável pela maior incidência de DA em mulheres (Viñaz et al., 2010).

Assim, a acúmulo de ferro, observado no envelhecimento, associado à queda nos níveis hormonais de estrogênios que acompanham a menopausa poderiam representar fatores de risco sinérgicos para o desenvolvimento do declínio cognitivo e demências como a DA em mulheres.

O modelo de sobrecarga neonatal de ferro é utilizado pelo nosso grupo para o estudo de déficits cognitivos associados à deposição desse metal no sistema nervoso central, manifestando-se como déficits na memória de reconhecimento de objetos (de Lima et al., 2005), na tarefa de esquivas inibitória, déficits de aprendizagem no labirinto radial (Schroder et al., 2011). Esses achados comportamentais parecem secundários à gliose astrocítica reativa no hipocampo e córtex (Fernandez et al., 2011), ao aumento do estresse oxidativo (de Lima et al., 2005), aumento de proteínas apoptóticas (como a caspase-3) e diminuição de sinaptofisina (da Silva et al., 2014). Todos esses achados

comportamentais e fisiopatológicos relacionados à sobrecarga de ferro no período neonatal foram vistos em ratos. Os resultados apresentados aqui representam os primeiros dados do efeito da sobrecarga neonatal em ratas (De Lima et al., 2008). Com a realização de nossos experimentos e comparando os resultados encontrados com dados observados anteriormente pode-se observar que a presença do estradiol nas ratas adultas não ovariectomizadas foi associada com melhora na consolidação da memória de reconhecimento de objetos na idade adulta, mesmo quando as ratas haviam sido expostas a uma sobrecarga neonatal de ferro. Esse achado difere do que havia sido visto em ratos machos em nossos experimentos anteriores. De maneira interessante, na realização de outra tarefa de memória neutra, a localização de objetos, mesmo com a presença de estradiol os índices de memória em fêmeas apresentaram decréscimo em comparação com os controles tratados com veículo no período neonatal. Essa influência negativa do ferro na consolidação de memória de localização de objetos também foi demonstrada na tarefa de esquiva inibitória.

Como pensando inicialmente pelo nosso grupo, a soma desses dois fatores de risco (sobrecarga de ferro e ausência de estradiol) foi responsável por uma piora marcante na performance das tarefas de localização de objetos, esse tipo de tarefa é extremamente dependente do funcionamento adequado do hipocampo e esse achado vai ao encontro da literatura que demonstra a presença de receptores de estrogênio nos circuitos hipocampais, justificando que a ativação desses receptores é importante no processo de consolidação de memórias e aprendizado.

O uso de 17β -estradiol relaciona-se com a melhora no desempenho de tarefas de reconhecimento social, reconhecimento de objetos e localização de objetos quando administrado por via sistêmica ou por injeção intrahipocampal. Esses efeitos são vistos também quando se utiliza um agonista do ER α . Por outro lado, a administração de um agonista seletivo ER β , por via sistêmica ou intrahipocampal melhora apenas as tarefas de localização espacial. Ainda, a ativação de qualquer um dos receptores clássicos de estrogênio e do GPER aumenta a densidade de espinhas dendríticas (Lymer et al., 2017).

O uso do agonista específico do GPER, o G-1, quando administrado sistemicamente também produziu melhora do reconhecimento social, de objetos e de localização de objetos em camundongos fêmea. Pode-se perceber que os efeitos benéficos do estradiol podem ser produzidos pela ativação de qualquer um dos

receptores (Lymer et al., 2017). A partir dessa observação, utilizamos o composto G-1 devido à sua ligação específica ao GPER, para avaliar os efeitos de sua administração sistêmica no desempenho de tarefas neutras e de memória aversiva em ratas.

Na literatura existem poucos dados a respeito do papel do GPER na formação da memória e ainda mais escassos são os trabalhos que avaliam as respostas da ativação desse receptor em modelos experimentais indutores de declínio cognitivo, como o utilizado por nós, através da sobrecarga neonatal de ferro. Curiosamente, quando esse receptor é estimulado farmacologicamente, mesmo administrado de maneira sistêmica, como o utilizado em nosso trabalho, essa ativação farmacológica foi capaz de aumentar o índice de reconhecimento de objetos na tarefa de LO tanto nos animais que mantinham seus ovários (SHAM) quanto nas ratas submetidas à ovariectomia, sugerindo um papel benéfico da função do GPER mesmo em estados amnésicos não diretamente relacionados à queda nos níveis de estrógenos. Ainda, perante a tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA, a amnésia observada nos animais tratados com ferro no período neonatal foi revertida pelo uso do composto. Mesmo na presença da sobrecarga neonatal de ferro e na ausência de estradiol causada pela ovariectomia, o agonista G-1 foi capaz de aumentar o tempo de latência na esQUIVA INIBITÓRIA, o que se entende que esses animais foram capazes de associar um estímulo aversivo a um contexto com a administração do agonista do GPER. Na ausência da estimulação farmacológica desse receptor, não houve esse aprendizado mesmo quando os animais receberam apenas a sobrecarga neonatal de ferro. Em ratas, parece que a soma desses dois fatores de risco criou um ambiente extremamente favorável para o aparecimento de déficits cognitivos acentuados, em conformidade com o que é visto na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas. Assim, podemos sugerir que a estimulação do GPER contribua para a consolidação de memórias dependentes do hipocampo.

Experimentalmente, observou-se que a ativação do GPER exerce seus efeitos de melhora cognitiva através da ativação da via da JNK, diferentemente do E2 que tem seu mecanismo de ação através da via da ERK. A fosforilação do CREB pela ativação da PKA é um processo celular amplamente estudado e envolvido na formação de memórias, estudos *in vitro* demonstraram que há um aumento na fosforilação da CREB em células de hipocampo após 1h de tratamento com 17 β -estradiol, principalmente através das vias MAPK e CaMKII (Lee et al., 2004).

Para investigarmos se os efeitos melhoradores da memória desencadeados pela ativação do GPER estavam relacionados à ativação da via PKA/CREB no modelo de sobrecarga neonatal de ferro e ovariectomia, utilizamos o composto G1, agonista seletivo do GPER, acrescido da inibição da PKA, utilizando o composto H-89. A dose escolhida foi aquela que não exercesse “per se” um efeito amnésico nas ratas e através de um estudo dose-resposta observamos que a dose adequada seria aquela inferior à 0.5mg/kg, optando pela dose 0.25mg/kg que encontrava-se entre os extremos testados. A tarefa de esquiwa inibitória foi escolhida para esse fim por se tratar de uma tarefa que associa um determinado contexto (a arena da esquiwa) a um estímulo aversivo (choque), a presença desse estímulo aversivo impõe um fator externo marcante e, portanto, facilitador na formação de um aprendizado.

Para a realização da tarefa de EI, os animais haviam sido expostos anteriormente à sobrecarga neonatal de ferro e ao procedimento cirúrgico de retirada bilateral dos ovários. Essa tarefa demonstrou que o grupo tratado com G-1 foi capaz de aumentar o índice de latência para a descida da plataforma, porém, não houve aprendizado na tarefa quando o inibidor da PKA foi administrado anteriormente à realização da tarefa, sugerindo que a ativação do G-1 dependente da ativação da PKA e fosforilação da CREB não ocorreu. A ativação do receptor GPER parece ser fundamental para mediar a consolidação de memórias em ratas submetidas à ovariectomia anulando os efeitos deletério da sobrecarga neonatal de ferro e da depleção de estrógenos na aprendizagem.

Esse efeito observado na EI também foi visível na realização da LO, uma tarefa neutra. Na sessão de testes, os animais tratados com veículo apresentaram os mesmos índices de reconhecimento conforme os experimentos anteriores, já as ratas tratadas com G-1 exploraram por mais tempo o objeto posicionado em um local novo na arena. Com a inibição farmacológica da PKA, as ratas voltaram aos índices de reconhecimento do grupo veículo, mesmo quando receberam o tratamento com G-1 após a sessão de teste.

A realização desse projeto foi capaz de unir no campo pré-clínico, de maneira inédita, o desequilíbrio do ferro no sistema nervoso central e a falta de estradiol e demonstrar que ambos parecem agir como parceiros no mecanismo de déficit cognitivo observado nas ratas. Além disso, com a realização de diferentes tarefas para mensuração do desempenho cognitivo das ratas, confirmou-se que mesmo na presença de outro agente desfavorável ao funcionamento do sistema nervoso central, o agonista do GPER

foi capaz de reverter danos estabelecidos no domínio cognitivo desses animais. Sugerimos, ainda, que esse papel neuroprotetor dos estrogênios, mediado pelo GPER é dependente da ativação da via PKA/CREB.

A partir desse ponto, pensamos que novos estudos devem ser feitos para avaliar a influência do ferro e do estradiol na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas, uma vez que faltam estudos que combinem diferentes fatores de risco. Sabe-se que os mecanismos de neurodegeneração não ocorrem de forma isolada, bem pelo contrário, ocorrem dentro de um contexto múltiplo e, assim, à medida que isolamos os fatores de risco, corremos o risco de nos distanciarmos na área pré-clínica do que de fato ocorre no cérebro dos milhões de pacientes acometidos por essas doenças.

REFERÊNCIAS

Abbott, N. J.; Patabendige, A. A.; Dolman, D. E.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiol Dis**, 37:13–25, 2009.

Adams C.W. Perivascular iron deposition and other vascular damage in multiple sclerosis. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**. 51 (2), 260–265, 1988.

Andersen H.H.; Johnsen K.B.; Moos T. Iron deposits in the chronically inflamed central nervous system and contributes to neurodegeneration. **Cell. Mol. Life Sci**. 71 (9) 1607–1622, 2014.

Andrews, N.C. & Schmidt, P. J. Iron homeostasis. **Annu. Rev. Physiol**, 69:69–85, 2007.

Arcielo, M.; Capo, C. R.; Cozzolino, M.; Ferri, A.; Nencini, M.; Carrì, M. T.; Rossi, L. Inactivation of cytochrome c oxidase by mutant SOD1s in mouse motoneuronal NSC-34 cells is independent from copper availability but is because of nitric oxide. **Journal of Neurochemistry**. 112, 183-192, 2010.

Bologa *et al.* Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. **Nature Chem.Biol**. 2. 2007.

Brailoiu E.; Dun SL.; Brailoiu GC.; Mizuo K.; Sklar LA.; Oprea TI.; Prossnitz ER.; Dun NJ. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. **J Endocrinol**. 193:311–321, 2007.

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

Bean L.A.; Ianov L.; Foster, T.C. Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. **Neuroscientist**. 20(5):534-45, 2014.

Cheng SB.; Dong J.; Pang Y.; LaRocca J.; Hixon M.; Thomas P.; Filardo EJ. Anatomical location and redistribution of G protein-coupled estrogen receptor-1 during the estrus cycle in mouse kidney and specific binding to estrogens but not aldosterone. **Mol Cell Endocrinol**. 382:950–959, 2014.

Colleen, S.; Marks, A. D.; Lieberman, M. Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica. Porto Alegre: **Artmed**, 2008.

Cohen S.J. & Stackman R.W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. **Behav Brain Res.** 285:105-7, 2015.

Cozzolino, M.; Ferraro, E.; Ferri, A.; Rigamonti, D.; Quondamatteo, F.; Ding, H.; Xu, Z. S.; Ferrari, F.; Angelini, D. F.; Rotilio, G.; Cattaneo, E.; Carri, M. T.; Cecconi, F. Apoptosome inactivation rescues proneural and neural cells from neurodegeneration. **Cell Death and Differentiation.** 11, 1179-1191, 2004.

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

Curtis, A.R.; Fey C.; Morris C.M.; Bindoff L.A.; Ince P.G.; Chinnery P.F.; Coulthard A.; Jackson M.J.; Jackson A.P.; McHale D.P.; Hay D.; Barker W.A.; Markham A.F.; Bates D.; Curtis A.; Burn J. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. **Nat. Genet.**, 28 (4) 350–354, 2001.

Da Silva, V. K.; de Freitas, B. S.; Dornelles, A. S.; Nery, L. R.; Falavigna, L.; Ferreira, R. D. P.; Bogó, M. R.; Hallak, J. E. C.; Zuardi, A. W.; Crippa, J. A. S. & Schröder, N. Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNMI1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection. **Mol Neurobiol.** 49(1): 222-33, 2014.

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

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

De Lima, M. N. M.; Dias, C. P.; Torres, J. P.; Dornelles, A.; Garcia, V. A.; Scalco, F. S.; Guimarães, M. R.; Petry, R. C.; Bromberg, E.; Constantino, L.; Budni, P.; Dal-

- Pizzol, F. & Schröder, N. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. **Neurobiol Aging**, 29:1052-1059, 2008.
- De Lima, M.N.M.; Presti-Torres, J.; Caldana, F.; Grazziotin, M.M.; Scalco, F.S.; Guimarães, M.R.; Bromberg, E.; Franke, S.I.R.; Henriques, J.A.P. & Schröder, N. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. **European Journal of Pharmacology**, 570: 111–114, 2007.
- Dennis MK.; Burai R.; Ramesh C.; Petrie WK.; Alcon SN.; Nayak TK.; Bologna CG.; Leitao A.; Brailoiu E.; Deliu E. In vivo effects of a GPR30 antagonist. **Nat Chem Biol**. 5:421–427, 2009.
- Dexter, D. T.; Carayon, A.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y.; Wells, F. R.; Daniel, S. E.; Lees, A. J.; Jenner, P. & Marsden, C. D. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. **Brain**. 114, 1953–1975, 1991.
- Dun SL.; Brailoiu GC.; Gao X.; Brailoiu E.; Arterburn JB.; Prossnitz ER.; Oprea TI.; Dun NJ. Expression of estrogen receptor GPR30 in the rat spinal cord and in autonomic and sensory ganglia. **J Neurosci Res**. 87:1610–1619, 2009.
- Duseka P.; Schneider S. A.; Aasethd J. Iron chelation in the treatment of neurodegenerative diseases. **J Trace Elem Med Biol**. pii: S0946-672X(16)30047-5, 2016.
- Dwork, A. J.; Lawler, G.; Zybert, P. A.; Durkin, M.; Osman, M.; Willson, N. & Barkai, A. I. An autoradiographic study of the uptake and distribution of iron by the brain of the young rat. **Brain Res**, 518:31–39, 1990.
- Ennaceur A. & Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**. Nov 1;31(1):47-59, 1988.
- Fagherazzi, E.V.; Garcia, V.A.; Maurmann, N. Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. **Psychopharmacology** 219(4):1133–1140, 2011.
- Feldman R.D. ; Gros R. Unraveling the mechanisms underlying the rapid vascular effects of steroids: sorting out the receptors and the pathways. **Br J Pharmacol**, 163(6):1163-9. 2011.

Fernandez, L. L.; De Lima, M. N. M.; Scalco, F.; Vedana, G.; Miwa, C.; Hilbig, A.; Vianna, M. & Schroder, N. Early Post-Natal Iron Administration Induces Astroglial Response in the Brain of Adult and Aged Rats. **Neurotox Res**, 20:193–199, 2011.

Filardo E.J.; Quinn J.A.; Bland K.I.; Frackelton A.R. Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. **Mol Endocrinol**. 14:1649–1660, 2000.

Filardo E.J.; Quinn J.A.; Frackelton AR Jr.; and Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. **Mol Endocrinol**. 16:70–84, 2002.

Global Burden of Disease Study 2013, Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**. 386 (9995): 743–800. PMID 26063472, 2015.

Foster, TC. Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span. **Front Neuroendocrinol**. 26(2):51–64, 2016.

Foster T.C. Role of estrogen receptor α and β expression and signaling on cognitive function during aging. **Hippocampus**. 22(4):656–69, 2012.

Guyton, A.C.; Hall, J.E *Tratado De Fisiologia Médica* 12. Ed. RJ . Elsevier, 2011.

Hammond, R.; Gibbs RB. GPR30 is positioned to mediate estrogen effects on basal forebrain cholinergic neurons and cognitive performance. **Brain Res**. 1379: 53–60, 2011.

Wang H. & Peng R.Y. Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. **Mil Med Res**. 3(1):26, 2016.

Hare, D.J.; Arora, M.; Jenkins, N.L.; Finkelstein, D.I.; Doble, P.A.; Bush, A.I. Is early-life iron exposure critical in neurodegeneration? **Nature Reviews Neurology**, 11, 536–544, 2015.

- Harris Z.L.; Y. Takahashi.; H. Miyajima.; M. Serizawa.; R.T. MacGillivray.; J.D. Gitlin. Aceruloplasminemia molecular characterization of this disorder of iron metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 92 (7), 2539–2543, 1995.
- Hazell GG.; Yao ST.; Roper JA.; Prossnitz ER.; O’Carroll AM.; Lolait SJ. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. **J Endocrinol.** 202: 223–236, 2009.
- Hawley, W. R.; Grissom, E. M.; Moody, N. M.; Dohanich, G. P.; Vasudevan, N. Activation of G-protein-coupled receptor 30 is sufficient to enhance spatial recognition memory in ovariectomized rats. **Behav Brain Res.** 262:68-73, 2014.
- Janetzky, B.; Reichmann, H. .; Youdim, M. B. H. & Riederer.; P. Iron and Oxidative Damage in Neurodegenerative Diseases. **Wiley-Liss**, 1997.
- Jia, M; Wright-Dahlman, K.; Gustafsson J. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.** 29(4):557-68. 2015.
- Jones TT.; Brewer GJ. Critical age-related loss of cofactors of neuron cytochrome C oxidase reversed by estrogen. **Exp Neurol.** 215(2):212–9, 2009.
- Kandel E. R.; Schwartz J. H.; Jessell T. M.; Sieglebaum S. A. & Hudspeth A. J. **Princípios de Neurociências.** 5a edição. Porto Alegre - RS. Artmed, 2014.
- Khan, D.; Ansar Ahmed, S. The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. **Front Immunol,** 6; 6:635, 2016.
- Kim et al 2016 17-Estradiol and Agonism of G-protein-Coupled Estrogen Receptor Enhance Hippocampal Memory via Different CellSignaling Mechanisms
- Koebele S.V., Bimonte-Nelson H.A. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. **Maturitas.** 87:5-17, 2016.
- Koeppen A.H.; Michael S.C.; Li D.; Chen Z.; Cusack M.J.; Gibson W.M.; Petrocine S.V.; Qian J. The pathology of superficial siderosis of the central nervous system. **Acta Neuropathol.** 116 (4), 371–382, 2008.
- Lee, D. W.; Andersen, J. K. & Kaur, D. Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. **Mol Interv,** 6:89–97, 2006.

Lee S.J.; Campomanes C.R.; Sikat P.T.; Greenfield A.T.; Allen P.B.; McEwen B.S. Estrogen induces phosphorylation of cyclic AMP response element binding (pCREB) in primary hippocampal cells in a time-dependent manner. **Neuroscience**, 124(3):549-60, 2004.

Lenhart, P.M.; Broselid, S.; Barrick, C.J.; Leeb-Lundberg, L.M.; Caron K.M. G-protein-coupled receptor 30 interacts with receptor activity-modifying protein 3 and confers sex-dependent cardioprotection. **J Mol Endocrinol**. 51:191–202, 2013.

Lindsey S.H.; Liu L.; Chappell M.C. Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth muscle cAMP signaling. **Steroids**. 81:99–102, 2014.

Lopez-Otin C.; Blasco M.A.; Partridge L.; Serrano M.; Kroemer G.; The hallmarks of aging. **Cell**, 153, 1194–1217, 2013.

Lymer J.; Robinson A.; Winters B.D.; Choleris E. Rapid effects of dorsal hippocampal G-protein coupled estrogen receptor on learning in female mice. **Psychoneuroendocrinology**; 77:131-140, 2017.

Mastroberardino P.G.; Hoffman E.K.; Horowitz M.P.; Betarbet R.; Taylor G.; Cheng D.; Na H.M., Gutekuns C.A. t, Gearing M.; Trojanowski J.Q.; Anderson M.; Chu C.T.; Peng J.; Greenamyre J.T. A novel transferrin/TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis.**, 34 (3), 417–431, 2009.

Mattson, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 1(2):120–129, 2000.

Mennenga, S. E.; Koebele, S.V.; Mousa, A.A.; Alderete, T.J.; Tsang, C.W.S.; Acosta, J.I. Pharmacological blockade of the aromatase enzyme, but not the androgen receptor, reverses androstenedione-induced cognitive impairments in young surgically menopausal rats. **Steroids**, 99, 1625, 2015.

McCarthy, R.C.; Kosman D.J. Iron transport across the blood–brain barrier: development, neurovascular regulation and cerebral amyloid angiopathy. **Cell. Mol. Life Sci**. 72:709–727, 2015.

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

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

Nakao T.; Pincus G.; Tait J. Estrogen receptors in target tissues. Steroid dynamics. **Academic Pres**, 13–157, 1966.

Oide T et al. Iron overload and antioxidative role of perivascular astrocytes in aceruloplasminemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32(2):170–176, 2006.

Perez, V. P.; De Lima, M. N. M.; Silva, R. S.; Dornelles, A. S.; Vedana, Gustavo; Bogo, Maurício R.; Bonan, Carla D. & Schröder, Nadja. Iron Leads to Memory Impairment that is Associated with a Decrease in Acetylcholinesterase Pathways. **Current Neurovascular Research**, 7, 00-00, 2010.

Pettersson, K.; Delaunay, F.; Gustafsson, JA. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. **Oncogene**. 19(43):4970–8, 2000.

Polanczyk M.; Zamora A.; Subramanian S.; Matejuk A.; Hess DL.; Blankenhorn EP.; et al. The protective effect of 17beta-estradiol on experimental autoim-mune encephalomyelitis is mediated through estrogen receptor-alpha. **Am J Pathol**. 163(4):1599–605. doi:10.1016/S0002-9440(10)63516-X, 2003.

Purves D.; Augustine G. J.; Fitzpatrick D.; LaMantia A. S.; McNamarra J. O. & White L. E. **Neurociências**. 4a edição. Artmed, Porto Alegre, 2010.

Quintana, C. About the presence of hemosiderin in the hippocampus of Alzheimer patients. **J Alzheimers Dis**, 12:157–160, 2007.

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

Revankar, M.C.; Cimino, D.F.; Sklar L.A.; Arteburn J.B.; Prossnitz E.R.; A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling *Science*. 11;307(5715):1625-30. 2005.

Revankar CM.; Mitchell HD.; Field AS.; Burai R.; Corona C.; Ramesh C.; Sklar LA.; Arteburn JB.; Prossnitz ER.; Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. **ACS Chem Biol**, 2:536–544, 2005b.

Rodgers S.; Bohacek J.; Daniel J. Transient estradiol exposure during middle age in ovariectomized rats exerts lasting effects on cognitive function and the hippocampus, **Endocrinology** 151:1194–1203, 2010.

Schrag M.; McAuley G.; Pomakian J.; Jiffry A.; Tung S.; Muelle C.; Vinters H.V.; Haacke E.M.; Holshouser B.; Kido D.; Kirsch W.M. Correlation of hypointensities in susceptibility-weighted images to tissue histology in dementia patients with cerebral amyloid angiopathy: a postmortem MRI study. **Acta Neuropathol.**, 119 (3) 291–302, 2010.

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

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

Sherwin, BB. Estrogen therapy: is time of initiation critical for neuroprotection? **Nat Rev Endocrinol**. 5(11):620–7, 2009.

Talboom J.S.; Williams B.J.; Baxley E.R.; West S.G.; Bimonte-Nelson H.A. Higher levels of estradiol replacement correlate with better spatial memory in surgically menopausal young and middle-aged rats, **Neurobiol. Learn. Mem.** 90:155-163, 2008.

Terman A.; Kurz T. Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxid. Redox Signal*. 18 (8), 888–898, 2013.

Thomsen M.S.; Andersen M.V.; Christoffersen P.R.; Jensen M.D.; Lichota J.; Moos T. Neurodegeneration with inflammation is accompanied by accumulation of iron and ferritin in microglia and neurons. **Neurobiol. Dis.** 81, 108–118, 2015.

Viña J.; Lloret A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. **J Alzheimers Dis.** 20 Suppl 2:S527-33, 2010.

Wang, B.; Dehghani, Y.; Li, L.J.; Kaler, T.; Proctor, A.A.; Vandenberg, H. Offner. Membrane estrogen receptor regulates experimental autoimmune encephalomyelitis through up-regulation of programmed death 1 J. **Immunol.** 182 (5), pp. 3294–3303, 2009.

World Population Prospects: The 2006 Revision, 2 Volumes - Nova Iorque: Nações Unidas, **Population Division**, 2007.

Wu, L. J.; Leenders, A. G.; Cooperman, S.; Meyron-Holtz, E.; Smith, S.; Land, W.; Tsai, R. Y.; Berger, U. V.; Sheng, Z. H. & Rouault, T. A. Expression of iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood brain barrier. **Brain Res.**, 1001, 108–117, 2004.

Zhang QG.; Wang R.; Tang H.; Dong Y.; Chan A.; Sareddy GR.; Vadlamudi RK.; Brann DW. Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. **Mol Cell Endocrinol.** 389:84–91, 2014.

Zecca, L.; Youdim, M. B.; Riederer, P.; Connor, J. R. & Crichton, R. R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. **Nat Rev Neurosci**, 5:863–873, 2004.

ANEXOS

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO CEUA



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7533

Porto Alegre, 27 de outubro de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Papel do Receptor de Estrogênio Acoplado à Proteína G (GPER) em um modelo de disfunção cognitiva induzido pela sobrecarga neonatal de ferro em ratas" coordenado por NADJA SCHRODER.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

| Nº de Animais | Espécie | Duração do Projeto |
|---------------|---------|-------------------------|
| 195 | Ratos | 27/10/2016 - 27/01/2018 |

ANEXO B - MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Os resultados do presente trabalho foram submetidos ao periódico *Neurobiology of Learning and Memory*, fator de impacto 3.543 (JCR 2016).

G protein-coupled estrogen receptor (GPER) stimulation ameliorates iron- and ovariectomy-induced memory impairments, acting through the cAMP/PKA/CREB signaling pathway

Gustavo Dalto Barroso Machado^a, Betânia Souza de Freitas^a, Leonardo Zanetti Florian^a, Henrique Gus^a, Nadja Schröder^{b,c*}

a – Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

b – National Institute of Science and Technology for Translational Medicine (INCT-TM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, Brazil.

c - Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*** Corresponding author**

Nadja Schröder

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500 – 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone number: +55 51 99139-4308

Email: nadja_s@terra.com.br

Abstract

Iron accumulation in brain areas has been associated to neurodegenerative disorders, and imaging studies indicate that iron content in brain regions correlate with poor performance in cognitive tasks. In rats, iron overload impairs retention in a variety of memory types. Although the effects of iron in cognition in rodents are extensively reported, none of the studies was performed in female rats. The incidence of certain dementias, such as Alzheimer's disease are higher in women after menopause, compared to aged-matched men; and the role of estrogens depletion in memory deficits in menopausal women is still a matter of debate. The present study aimed at characterize the effects of iron overload on memory in female rats; investigate the effects of ovariectomy (an experimental model of menopause) in rats submitted to iron overload; examine the effects of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) agonism on memory impairments induced by iron and ovariectomy. Female rats received iron (30 mg/kg) or vehicle on postnatal days 12-14, and when adults were submitted to ovariectomy. Results showed that iron impaired object location and inhibitory avoidance, without affecting object recognition in female rats. Ovariectomy hindered object location and recognition, and inhibitory avoidance. The selective GPER agonist G1, administered immediately after training, reversed iron- and ovariectomy-induced memory impairments. G1 effects were abolished by Protein Kinase A (PKA) inhibition, suggesting the involvement of the cAMP/PKA/CREB signaling pathway. The search for novel estrogen agonists with positive effects on cognition may be promising for the development of treatments for memory disorders.

Key words: iron; estrogens; menopause; memory; G protein-coupled estrogen receptor (GPER); cAMP/PKA/CREB signaling pathway

1. Introduction

Recently, there has been a growing interest on the role of estrogens in memory, fed by the observations that after menopause women might experience cognitive decline, which in turn is reduced when hormonal replacement therapy is prescribed immediately after the lack of hormones is diagnosed (Sherwin et al., 2009), and that women after menopause are more susceptible to develop Alzheimer's Disease (AD) (Fisher et al., 2018). This evidence, together with the increasing in life expectancy, urges us to make pinpoints between estrogens and memory.

Estrogens mediate a wide range of physiological and pathological process in a sex and age-related manner, including cellular growing, sexual differentiation, and reproduction to neoplasms, inflammation and cardiovascular diseases (Jia et al., 2015). In the Central Nervous System (CNS), estradiol (E2) exerts neuroprotective functions, such as maintenance of blood-brain barrier homeostasis and control of neuroinflammation. Furthermore, E2 also promotes the growth of glutamatergic synapses and influences mitochondrial function (Foster, 2016). These actions are fundamental to the maintenance of a homeostatic brain environment. Estrogen actions are mediated by its interaction with its receptors expressed throughout the CNS, the classical intracellular estrogen receptors alpha ($ER\alpha$) and beta ($ER\beta$), known as genomics receptors, as well as the more recently described membrane-associated G protein-coupled estrogen receptor (GPER) (Foster, 2016, Kim et al., 2016).

Our understanding of the role of estrogens in memory has been expanded, once it was demonstrated that estradiol replacement after ovariectomy in adult female rats

results in better performance in spatial memory tasks such as the Morris water maze and Y labyrinth (Rodgers et al., 2010; Talboom et al., 2008). Estradiol replacement in ovariectomized rats is also able to recover memory in object placement, object recognition, and social memory tasks (Lymer et al., 2017; Talboom et al., 2008). Interestingly, these positive effects of estradiol in memory occur in an inverted “U” curve pattern (Bean et al., 2014).

However, the mechanisms underlying the effects of estrogen on memory are not completely elucidated, and studies focusing on the actions of GPER are limited. Recent studies reported that both systemic and hippocampal injections of the compound G-1 (a selective GPER agonist) are associated with improvement of spatial memory in ovariectomized rats (Kim et al., 2016; Hawley et al., 2014). However, to the best of our knowledge, the involvement of GPER in memory has so far been demonstrated only in social and emotionally neutral memory tasks. In addition, the benefits of estradiol, or selective ligands through GPER activation may have important clinical impacts, given that they seem to occur independently from the classical receptors (Kim et al., 2016).

Neurodegenerative diseases such as AD are complex multifactorial pathologies, emerging from a multitude of alterations that include oxidative stress, protein aggregation, energetic failure and synaptic dysfunction, and inflammation that ultimately lead to cell death in specific brain regions (Peterson and Li, 2018; Cai et al., 2018). Disruption of iron homeostasis and consequently its accumulation has been associated to the pathogenesis of neurodegenerative disorders, such as Parkinson’s (PD) and AD (Ashraf et al., 2018). Iron’s REDOX potential is coupled with the generation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress. Remarkably, increasing evidence suggests that iron excess in brain regions correlates with poor performance in cognitive tasks in healthy elderly subjects (Sullivan et al., 2009; Bartzokis et al., 2011; Rodrigue

et al., 2013) or patients with neurodegenerative diseases (Ding et al., 2009; Zhu et al., 2009).

Our laboratory has been paying special attention to iron metabolism since we described an animal model of iron overload (for a review see Schröder et al., 2013). Iron administration is performed during the neonatal period of rats, the period of maximum absorption of iron through the blood-brain barrier (Taylor and Morgan, 1990), and in the adulthood, these animals develop impairments in a variety of memory tasks, including spatial (Schröder et al., 2001), aversive, and recognition memory (de Lima et al., 2005; Figueiredo et al., 2016). These deficits are associated with increased levels of oxidative stress (de Lima et al., 2005), apoptotic markers (Miwa et al., 2011; da Silva et al., 2014), astrogliosis (Fernandez et al., 2011), mitochondrial damages (da Silva et al., 2014; 2018) and impaired ubiquitin-proteasome functioning (Figueiredo et al., 2016). It is important to point out that all these studies have been performed using male rats, and even being extremely elucidative for the comprehension of the importance of iron in the neurodegenerative process, they could not reflect the possible interactions with estrogens depletion in memory and cognition.

Understandably, memory formation can be explained in a biphasic way: short-term memory, which consists of a protein and RNA synthesis-independent component and a protein and RNA synthesis-dependent component resulting in the long-term memory (LTM). The activation of the cAMP/Protein Kinase A (PKA)/ cAMP response element binding protein 1 (CREB-1) pathway has been proved crucially involved in LTM consolidation (Bernabeu et al., 2007). Although a few recent studies have demonstrated that GPER activation recovers recognition memory in ovariectomized rats (Kim et al., 2016), the molecular pathways underlying these effects are not completely understood.

The present study aimed to investigate the effects of iron overload on memory in female rats, and its possible interaction with estrogen depletion achieved by ovariectomy. Moreover, we wanted to determine the effects of GPER stimulation on memory impairments induced by iron or iron combined with estrogen depletion. We also investigated the involvement of the cAMP/PKA/CREB pathway in GPER-mediated effects.

2. Materials and methods

2.1 Animals

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

All behavioral experiments were performed at light phase between 09:00 a.m and 4:30 p.m. All experimental procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI, Brazil) and approved by the Institutional Ethics Committee of the Pontifical Catholic

University (SIPESQ #7533). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

2.2 Experimental design

Experiment I - In order to determine the effects of iron overload during the neonatal period on memory, female rat pups received iron or vehicle as described in detail below. We also aimed at determining the effects of the combination of iron overload with estrogen depletion. Thus, adult (3 months old) female rats treated with iron or vehicle in the neonatal period were submitted to bilateral ovariectomy or sham surgery. Rats were allowed three weeks of recovery from surgery before they were submitted to memory tasks: object recognition, object placement, and inhibitory avoidance.

Experiment II – Our next goal was to investigate the effects of GPER stimulation, using the selective GPER agonist, G1, on iron- and/or ovariectomy-induced memory deficits. Female rat pups received iron in the neonatal period and at 3 months of age were submitted to ovariectomy or sham surgery. Three weeks after recovery from surgery, female rats were trained and tested on object placement and inhibitory avoidance. Rats received G1 or vehicle immediately after training.

Experiment III – In order to verify if the effects of G1 were mediated by the stimulation of cAMP/PKA/CREB pathway, female rats treated with iron in the neonatal period and submitted to ovariectomy received vehicle, G1 alone, or G1 in combination with the PKA inhibitor H-89 (0.25 mg/kg) and were trained and tested on object placement and inhibitory avoidance. In order to determine a dose of H-89 that would not have amnesic effects by itself, a dose response curve (doses of 0.1, 0.25, and 0.5 mg/kg) of the effects of H-89 on inhibitory avoidance was performed using naïve adult rats.

Western blot analysis of the ratio p-CREB/CREB – Adult naïve female rats or submitted to iron treatment in the neonatal period and ovariectomy were trained in the inhibitory avoidance task. G1 or vehicle was administered immediately after training. Rats were euthanized 3 hours after training and their hippocampi were isolated and stored at -80°C.

2.3 Pharmacological treatments

2.3.1 Neonatal iron treatment

The neonatal iron treatment was performed as previously described. This treatment has been described to induce memory deficits in male rats (de Lima et al., 2005; Silva et al., 2012; Figueiredo et al., 2016). Briefly, 12-day-old rat pups received a single oral daily dose (10 ml/kg solution volume) of vehicle (5% sorbitol in water, control group) or 30 mg/kg of body weight of Fe²⁺ (iron carbonyl, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) via a metallic gastric tube, over 3 days (postnatal days 12-14).

2.3.2 G1 and H-89

G-1 (1-[4-(6-bromobenzo[1,3]dioxol-5yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3Hcyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanone; Cayman Chemical, Michigan, USA), a selective GPER agonist, was dissolved in sunflower oil and administered subcutaneously (s.c.) immediately after the training sessions of memory tasks at the dose of 10 µg/kg. H-89 (5-Isoquinolinesulfonamide; Cayman Chemical, Michigan EUA), a selective PKA inhibitor, was dissolved in saline and administered

intraperitoneally (i.p.) 15 minutes prior training sessions of memory tasks at the dose of 0.25 mg/kg.

2.4 Surgery

To perform the procedure, the animals were anesthetized with xylazine (7.5 mg / kg) and ketamine (75 mg / kg) intraperitoneally (i.p.). After anesthesia was confirmed, the right and left ovaries were removed by two small incisions parallel to the spine. The false-operated (sham) groups were submitted to the same type of surgical incision, but with the preservation of the ovaries. After the experiments, the success of ovariectomy was confirmed by the development of uterine atrophy (Talboom et al., 2008).

2.5 Behavioral procedures

2.5.1 Object recognition and object placement tasks

Object recognition and object placement took place in an open field apparatus (45 x 40 x 60 cm) with sawdust covering its floor. On the first day, female rats underwent a habituation session during which they were placed in the empty open field for 5 min. On the following day, rats were given one 10-min training trial in which they were exposed to two identical objects (A1 and A2). The objects were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. On the long-term memory (LTM) testing trial (24 h after the training session), rats were allowed to explore the open field for 5 min in the presence of two objects: the familiar object A and a novel object B, placed in the same locations as in the training session, for object recognition. For object placement, in the retention test session one of the familiar objects was moved to the southeast or southwest corner of the arena. All objects were made of plastic Duplo Lego Toys and had a height of about 10 cm. For object recognition, objects presented similar textures,

colors, and sizes, but distinctive shapes. Different objects were used in object recognition and object placement. Between trials the objects were washed with 10% ethanol solution. Trials were videotaped and object exploration was measured by an experimenter blind to group treatment assignments, using two stopwatches to record the time spent exploring the objects. Exploration was defined as follows: sniffing or touching the object with the nose or forepaws while sniffing. Sitting on the object was not considered as exploration. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $T_N/(T_F+T_N)$ [T_F = time spent exploring the familiar object (A) or the object placed on an unchanged location; T_N = time spent exploring the novel object (B) or object moved to a new location]. The object recognition task was performed as previously described (Silva et al., 2012; Figueiredo et al., 2016).

2.5.2 Open-field behavior

Behavior during habituation to the open field prior to object recognition training was evaluated, as previously described (Figueiredo et al., 2016). The open field was a 40 X 45 X 60 cm arena surrounded by 50 cm high walls, made of plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. Animals were placed in the rear left corner and left to explore the field freely for 5 min. Latency to start locomotion and line crossings, were registered. The number of crossings and the number of rearings were used as measures of locomotor and exploratory activity, whereas the latency to start locomotion was used as a measure of anxiety.

2.5.3 Inhibitory Avoidance Task

We used the single-trial, step-down inhibitory avoidance (IA) conditioning as an established model of fear-motivated memory. In IA training, animals learn to associate a location in the training apparatus with an aversive stimulus (footshock). The IA behavioral training and retention test procedures were described in previous reports (Schröder et al., 2001; Silva et al., 2012; Figueiredo et al., 2016). The IA apparatus was a 50x25x25-cm³ acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1-mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm wide, 2.5-cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. On the training trial, rats were placed on the platform and their latency to step-down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. Immediately after stepping down on the grid, rats received a mild footshock (0.4 mA) and were removed from the apparatus immediately afterwards. A retention test trial was carried out 24 h after the training trial. The retention test trial was procedurally identical to training, except that no footshock was presented. Step-down latencies (in seconds) on the retention test trial (maximum 180 s) were used as a measure of IA retention.

2.6 Western Blot Analysis

Hippocampi obtained from female rats trained on inhibitory avoidance and euthanized by decapitation three hours after training were homogenized in 0.2 mL ice-cold lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 5 mM Ethylenediaminetetraacetic acid, 2 mM SodiumPyrophosphate, 4 mM Para-Nitrophenylphosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1.1 mM Phenyl-methyl-sulphonyl fluoride, 20 µg/µL leupeptin, 50 µg/µL aprotinin, protease inhibitor cocktail, 0.1% SDS) using a pestle, sonicated briefly, and centrifugated at 12,000 rpm at 4°C for 15 minutes. The

supernatant was collected and protein concentration was determined using Bradford assay (Bradford, 1976). Aliquots were stored at - 20 °C.

Samples were diluted in a mix of lysis buffer and loading buffer 2× (50 mM Tris, pH 6.8, β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1% bromophenol blue, and 2% sodium dodecyl sulphate (SDS)) and boiled for 10 minutes at 95°C. Forty µg of protein were separated on a 10% SDS polyacrylamide gel and transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane.

Membranes were blocked in Tris-buffered saline, pH 7.6, containing 0.1% of Tween 20 (TBST) and 5% skimmed milk for 2 hours at room temperature and then incubated overnight, with the following antibodies against phospho-CREB (pCREBSer133) (1:1000) and CREB (1:1000, both from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), which were dissolved in TBS-T with 5% bovine serum albumin. Membranes were then washed 3 times with TBS-T and incubated for 120 minutes at room temperature in TBS-T with 1% skimmed milk containing anti-rabbit IgG H&L (HPR) (Abcam, Cambridge, UK) secondary antibody, detected using ECL Western Blotting Substrate Kit (Abcam, Cambridge, UK). Pre-stained molecular weight protein markers (SuperSignal Molecular Weight Protein Ladder, Thermo Scientific, Rockford, USA) were used to determine the detected bands molecular weight and confirm antibodies target specificity. The densitometric quantification was performed using Chemiluminescent photo finder (Kodak/Carestream, model GL2200). pCREB densities were divided by their respective CREB densities within each sample to obtain pCREB:CREB ratio values (adapted from Munari et al., 2015).

2.7 Statistical Analysis

Data from recognition indexes, total time exploring both objects in the training session, latencies to step-down and data from the experiments evaluating open field behavior, as well western blot are expressed as mean \pm standard deviation (S.D.). Comparisons among experimental groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post-hoc* tests when necessary, using GraphPad Prism® software version 5.01. In all comparisons, *p* values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

3. Results

The first experiment aimed to characterize the effects of iron loading in the neonatal period alone or in combination with estrogen depletion, achieved with bilateral ovariectomy (OVX), on memory in adult female rats. When recognition indexes of the long-term retention test in the object recognition were compared using one-way ANOVA, a statistically significant difference was found among the experimental groups ($F_{(3, 34)} = 10.87, p < 0.0001$). *Post hoc* tests revealed that the ovariectomized groups treated either with vehicle or iron in the neonatal period presented significantly lower recognition indexes when compared to controls (veh-OVX compared to veh-sham, $p < 0.0001$ and iron-OVX compared to veh-Sham $p < 0.0001$, Figure 1A), indicating that estrogen depletion impaired object recognition, irrespective of the neonatal treatment. On the other hand, iron overload by itself did not affect object recognition, since the sham group treated with iron in the neonatal period did not statistically differ from the control group (veh-sham compared to iron-sham, $p > 0.05$). No significant changes were found when recognition indexes from the training test ($F_{(3, 34)} = 2.158, p > 0.05$) or total time exploring both objects during the training session ($F_{(3, 34)} = 2.317, p > 0.05$, Table 1) were compared. Comparisons of open-field behavior using ANOVA revealed no significant differences among the groups in the latency to start locomotion ($F_{(3, 34)} = 1.564, p > 0.05$), number of crossings ($F_{(3, 34)} = 2.771, p > 0.05$), and number of rearings ($F_{(3, 34)} = 1.865, p > 0.05$, Table 2).

Next, we tested spatial recognition memory, using object placement task. One way ANOVA revealed a statistically significant difference among the groups in recognition indexes from the retention test ($F_{(3, 37)} = 58.26, p < 0.0001$), but not from training ($F_{(3, 37)} = 2.086, p > 0.05$). Total time exploring both objects during training or

open-field behavior were not statistically different among the groups ($(F_{(3, 37)} = 0.2993, p > 0.05$; Tables 1 and 2). *Post hoc* tests showed that, once again, ovariectomized groups treated either with vehicle or iron in the neonatal period presented significantly lower recognition indexes when compared to controls (veh-OVX compared to veh-sham, $p < 0.0001$ and iron-OVX compared to veh-Sham $p < 0.0001$, Figure 1B). The group submitted to iron treatment in the neonatal period and to sham surgery, showed lower recognition index in comparison to controls ($p < 0.01$), suggesting that, differently from object recognition, iron loading per se impairs object placement in female rats. Interestingly, the group that received iron in the neonatal period and was submitted to ovariectomy (iron-OVX) presented statistically lower recognition index than both the veh-OVX group ($p < 0.01$) and the iron-sham group ($p < 0.0001$), suggesting a synergistic amnesic effect due to the combination of iron loading and estrogen depletion (Figure 1B).

In order to investigate the effects of iron loading and estrogen depletion on aversively-motivated memory, animals were tested on inhibitory avoidance. Comparisons of latencies to step-down using ANOVA revealed a significant difference among the groups in the retention test ($(F_{(3, 31)} = 14.01, p < 0.0001)$), but not in the training ($(F_{(3, 31)} = 1.792, p = 1.712)$). *Post hoc* tests indicated that all the experimental groups presented lower latencies in comparison to the control group (veh-Sham, all p 's < 0.0001) in the retention test, suggesting that ovariectomy, iron alone, or iron in combination with ovariectomy, impaired emotional memory (Figure 1C).

In the first experiment we observed that iron alone, ovariectomy alone, and the combination of iron loading with ovariectomy induced memory deficits in object placement and inhibitory avoidance. We next aimed at determine the effects of GPER stimulation, using the selective GPER agonist G1, on memory deficits induced by iron,

or ovariectomy combined with neonatal iron. All experimental groups received iron in the neonatal period and were submitted to sham surgery or ovariectomy in the adulthood. G1 was administered immediately after training of object placement or inhibitory avoidance task. Statistical comparison of recognition indexes in the retention test, using ANOVA, revealed a significant difference among the groups ($F_{(3, 40)} = 16.14$, $p < 0.0001$). Recognition indexes in the training session ($F_{(3, 40)} = 0.7560$, $p > 0.05$) or total time exploring both objects during training session ($F_{(3, 40)} = 1.096$, $p > 0.05$) were not statistically different among the groups (Table 3). Analysis of open-field behavior revealed no significant differences among the groups in all parameters tested (latency to start locomotion $F_{(3,40)}=0.8276$, $p > 0.05$; number of crossings $F_{(3, 40)} = 0.6024$, $p > 0.05$; and number of rearings $F_{(3, 40)} = 1.594$, $p > 0.05$, Table 3). *Post hoc* comparisons of recognition indexes in the retention test showed that iron-treated rats submitted to sham surgery (iron-sham) that received G1 immediately after training presented significantly higher recognition indexes than the iron-sham group treated with vehicle ($p < 0.01$). Moreover, iron-treated rats submitted to ovariectomy (iron-OVX) that received G1 also presented higher recognition indexes in comparison to the group that received vehicle ($p < 0.0001$) (Figure 2A).

Similar results were obtained in inhibitory avoidance; ANOVA indicated a significant difference among the groups when the latencies to step-down in the retention test ($F_{(3, 31)} = 14.53$, $p < 0.0001$), but not in the training ($F_{(3, 31)} = 0.9634$, $p = 0.4224$) were compared. *Post hoc* tests showed that G1 was able to increase latencies in both sham and ovariectomized groups treated with iron in the neonatal period in comparison to respective controls treated with vehicle immediately after training (both p 's < 0.0001 , Figure 2B). Together these findings suggest that GPER stimulation is able to recover

memory impairments induced by iron loading in the neonatal period and by the combination of iron with ovariectomy.

Aiming to determine whether the activation of cAMP/PKA/CREB signaling pathway might be involved in G1-induced effects in recovering memory, we injected H-89, a PKA inhibitor, fifteen minutes before training and G1 immediately after training. Three groups of ovariectomized adult rats treated with iron in the neonatal period received: vehicle before and after training, vehicle before training and G1 after training, or H-89 before training and G1 after training in object placement or inhibitory avoidance tasks. The dose of H-89 used did not induce an amnesic effect by itself and was chosen based on a dose-response curve experiment (Supplementary Figure 1).

Statistical comparisons of recognition indexes in the retention test revealed a significant difference among the groups ($F_{(2, 23)} = 33.22$, $p < 0.0001$). No significant differences were found when recognition indexes of training session ($F_{(2, 23)} = 1.037$, $p > 0.05$), total time exploring objects in training session ($F_{(2, 23)} = 0.6524$, $p > 0.05$) or latency to start locomotion ($F_{(2, 23)} = 2.021$, $p > 0.05$), number of crossings ($F_{(2, 23)} = 1.472$, $p > 0.05$), and number of rearings ($F_{(2, 23)} = 2$, $p > 0.05$, Table 4) in the open-field were analyzed. *Post hoc* tests indicated that the group that received vehicle before training and G1 after training presented a significantly higher recognition index in comparison to the group treated with vehicle only ($p < 0.0001$), confirming the findings from the previous experiment, in which G1 reversed the memory impairing effects of iron in combination with ovariectomy. The effects of G1 were abolished by the administration of H-89 before training, since the group treated with H-89 and G1 presented a significantly lower recognition index than the group that received vehicle and G1 ($p < 0.0001$). Moreover, the group treated with H-89 and G1 did not differ from the group treated with vehicle before and after training ($p > 0.05$; Figure 3A).

Results from inhibitory avoidance are presented in Figure 3B. ANOVA showed significantly different latencies to step-down among the groups in the retention test ($F_{(2, 24)} = 15.21, p < 0.0001$), but not in the training session ($F_{(2, 24)} = 0.7312, p = 0.4917$). *Post hoc* tests indicated that the group treated with G1 immediately after training and vehicle before training presented significantly higher latencies than the group that received vehicle before and after training ($p < 0.0001$), confirming that G1 reverses the amnesic effects. However, the group that received H-89 before training and G1 immediately after training presented lower latencies when compared to the group treated with G1 only ($p < 0.0001$) and was not statistically different from the group treated with vehicle only ($p > 0.05$). Taken together these findings suggest that PKA inhibition abolishes the effects of G1.

To further confirm the involvement of the cAMP/PKA/CREB pathway in G1-mediated effects in iron-treated ovariectomized female rats, we decided to quantify training-induced CREB phosphorylation. Comparison of the ratio pCREB/CREB in the hippocampus, 3 hours after inhibitory avoidance training, using ANOVA, revealed a statistically significant effect ($F_{(3, 17)} = 13.412, p < 0.0001$; Figure 4). *Post hoc* test indicated that hippocampal CREB phosphorylation was increased by inhibitory avoidance training in control female rats in comparison to non-trained control rats ($p = 0.01$), as expected. Iron-OVX rats treated with vehicle immediately after training failed to increase pCREB levels in response to training, once this group presented a lower ratio pCREB/CREB when compared to the trained control group ($p < 0.0001$) and was not statistically different from the non-trained group ($p = 0.539$). Remarkably, G1 administration to iron-treated ovariectomized rats immediately after training restored CREB phosphorylation, since this group showed significantly higher pCREB/CREB

ratio than the iron-OVX group treated with vehicle ($p=0.01$) and CREB phosphorylation levels in this group were similar to the control trained group ($p=0.604$).

4. Discussion

In the present study we evaluated the influence of estradiol depletion on memory in the context of the neonatal iron overload model in female rats. To the best of our knowledge, this is the first study that combines these risk factors for neurodegenerative diseases in one phenotypical model of memory impairment.

We first aimed at characterizing the effects of iron overload on memory in sham operated or ovariectomized female rats. Our research group has extensively described the effects of iron overload on memory using male rats. In males, iron persistently impairs spatial memory, aversive memory and object recognition memory (Schröder et al., 2001; de Lima et al., 2005; Silva et al., 2012; Figueiredo et al., 2016). In contrast, in Experiment I we found that iron administered to sham operated female rats did not affect object recognition memory. Interestingly, in the spatial version of the task, object placement, and in the aversive memory task, inhibitory avoidance, iron treatment induced memory impairments in sham operated groups, similarly to those observed in male rats. While object location, seems to rely mostly on hippocampal integrity, object recognition has been related to other brain areas besides the hippocampus, including the insular cortex, the perirhinal cortex and the ventromedial prefrontal cortex, (Vogel-Ciernia and Wood, 2014; Warburton and Brown, 2015). Hence, we can speculate that in females, iron effects are more related to hippocampal function, and the anatomical differences between the two tasks may be related to these contradictory findings. In healthy humans, an association between increased iron content in the hippocampus, but not in the caudate nucleus or in the visual cortex, with poorer memory performance that

could explain age-related memory decline was described (Rodrigue et al., 2013).

Another possibility is that the presence of estradiol in non-ovariectomized adult female rats was associated with a protection against iron-induced recognition memory deficits that were not extensive to the other types of learning.

We had initially hypothesized that the combination of these two risk factors (iron overload and absence of estradiol) would amplify the effects of each one of the factors isolated. In fact, we found that iron administered to ovariectomized rats was responsible for a marked deterioration in the performance of object placement, given that the iron-OVX group performed worse than iron or OVX only groups. This type of task is extremely dependent on the proper functioning of the hippocampus and this finding is in agreement with the literature that demonstrates the presence of estrogen receptors in the hippocampal circuits, justifying that the activation of these receptors is important in the process of learning and memory consolidation (Duarte-Guterman et al., 2015).

It has been previously described that the GPER stimulation, using systemic or intrahippocampal administration of the selective agonist G-1, improves social and object recognition as well as object localization in ovariectomized rats (Lymer et al., 2017; Hawley et al., 2014). We then decided to examine the effects of GPER stimulation in female rats submitted to the iron overload protocol and sham surgery or ovariectomy in adulthood. Based on the results obtained in experiment I, we only performed object placement and inhibitory avoidance to test the effects of G1. Interestingly, the administration of G1 was able to improve object placement and inhibitory avoidance memory in both the sham group and in rats submitted to ovariectomy, suggesting a beneficial role of the GPER activation even in amnesic states not directly related to the decline in estrogen levels. Thus, we can suggest that the

stimulation of the GPER, contributes to the consolidation of hippocampal dependent memories, ameliorating memory deficits.

We next sought to determine if cAMP/PKA/CREB signaling pathway activation would be related to G1 memory-improving effects. Studies have demonstrated that the GPER exerts its effects of cognitive improvement through the activation of the JNK pathway (Kim et al., 2016), unlike E2 that has its mechanism linked to the ERK pathway (Fernandez et al., 2008; Boulware et al., 2013; Pereira et al., 2014). To investigate whether the memory-enhancing effects triggered by GPER activation were related to the activation of the cAMP/PKA/CREB signaling pathway in the neonatal iron overload model combined with ovariectomy, we used G1, in combination with H-89, a PKA inhibitor, in a dose without an amnesic effect *per se*. As demonstrated in the Experiment II, GPER stimulation was able to reverse iron/OVX- induced effects on memory for both object placement and inhibitory avoidance tasks. However, PKA inhibition completely abolished G1 memory-improving effects, suggesting the involvement of cAMP/PKA/CREB pathway in mediating GPER induced effects on memory. To confirm these findings, we analyzed CREB phosphorylation in the hippocampus of rats submitted to iron overload and ovariectomy that received G1 or vehicle. In control female rats, inhibitory avoidance training increased hippocampal CREB phosphorylation in comparison to non-trained rats, as previously described (Bernabeu et al., 1997). Remarkably, training was unable to increase CREB phosphorylated levels in memory-impaired rats (iron-OVX), while G1 administered immediately after training, was able to restore CREB phosphorylation in the group iron-OVX, as similarly had recovered memory deficits in this group (Experiments II and III). CREB is a transcription factor that, when phosphorylated, regulates the expression of genes critically involved in synaptic plasticity and long-term memory consolidation

(Abel et al., 1997; Bevilaqua et al., 1997; Bach et al., 1999; Schafe et al., 1999; Quevedo et al., 2004). We have previously demonstrated that an acute administration of Rolipram, an agent that enhances the cAMP/PKA/CREB signaling pathway through the inhibition of phosphodiesterase type 4 (PDE4), an enzyme that catalyzes hydrolysis of cAMP, improves iron-induced memory deficits in male rats (de Lima et al., 2008). In agreement, Lewis et al. (2008) have demonstrated that the inhibition of the cAMP/PKA/CREB signaling pathway by the cAMP inhibitor Rp-cAMPS, abolished the memory enhancing effects of estradiol in ovariectomized female mice. Additionally, it has been proposed that CREB displays neuroprotective properties, since it regulates the expression of anti-apoptotic genes (Pugazhenti et al., 2000). Studies have demonstrated that CREB and CREB-regulated gene expression is reduced in AD brains (Yamamoto-Sasaki et al., [1999](#); Liang et al., [2007](#); Pugazhenti et al., [2011](#)). Chen and coworkers (2013) have shown that estradiol prevented A β -induced down-regulation of CREB phosphorylation in PC12 cells.

In conclusion, our group introduced a phenotypical animal model of cognitive decline combining two well-known risk factors for the development of cognitive decline associated to neurodegenerative diseases in females, embracing the multifactorial and complex aspects of this group of diseases. In addition, we demonstrated that GPER stimulation can improve memory of these animals both in neutral and aversive tasks, and its effects are dependent at least to some extent to the cAMP/PKA/CREB signaling pathway. These findings open new avenues for the treatment of age-associated memory deterioration, giving support for the search of selective GPER agonists.

Declaration of Interest

None.

Funding

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant number 308290/2015-1 to N.S.); the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM). The funding source(s) had no involvement in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

REFERENCES

Abel, T., Nguyen, P.V., Barad, M., Deuel, T.A., Kandel, E.R., Bourtchouladze, 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.

Ashraf, A., Clark, M., So, P.W. (2018). The Aging of Iron Man. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 65.

Bach, M.E., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y.F., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins, R.D., Kandel, E.R. (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 5280–5285.

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

Bean L.A., Iarov L., Foster T.C. (2014) Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. *Neuroscientist*, 20, 534-545.

Bernabeu, R., Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I., Medina, J.H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 7041-7046.

Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Schröder, N., Bromberg, E., Schmitz, P.K., Schaeffer, E., Quevedo, J., Bianchin, M., Walz, R., Medina, J.H., Izquierdo, I. (1997).

Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signalling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. *Behavioral Pharmacology*, 8, 331–338.

Boulware M.I., Heisler J.D., Frick K.M. (2013) The memory-enhancing effects of hippocampal estrogen receptor activation involve metabotropic glutamate receptor signaling. *Journal of Neuroscience*, 33, 15184–15194.

Cai, Z., Qiao, P.F., Wan, C.Q., Cai, M., Zhou, N.K., Li, Q. (2018). Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, Epub ahead of print. doi: 10.3233/JAD-180098.

Chen, Y., Su, Y., Run, X., Sun, Z., Wang, T., Sun, S., Liang, Z. (2013). Pretreatment of PC12 cells with 17 β -estradiol prevents A β -induced down-regulation of CREB phosphorylation and prolongs inhibition of GSK-3 β . *Journal of Molecular Neuroscience*, 50, 394-401.

da Silva, V.K., de Freitas, B.S., Dornelles, V.C., Kist, L.W., Bogo, M.R., Silva, M.C., Streck, E.L., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A.S., Schröder, N. (2018). Novel insights into mitochondrial molecular targets of iron-induced neurodegeneration: Reversal by cannabidiol. *Brain Research Bulletin*, 139, 1-8.

da Silva, V.K., de Freitas, B.S., da Silva Dornelles, A., Nery, L.R., Falavigna, L., Ferreira, R.D., Bogo, M.R., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Schröder, N. (2014). Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNMI1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection. *Molecular Neurobiology*, 49, 222-233.

de Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D.C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Schröder, N. (2005). Recognition memory impairment and

brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *European Journal of Neuroscience*, 21, 2521-2528.

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

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

Duarte-Guterman, P., Yagi, S., Chow, C., Galea, L.A. (2015). Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: Effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. *Hormones and Behavior*, 74, 37-52.

Fernandez, L.L., De Lima, M.N., 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. *Neurotoxicity Research*, 20, 193-199.

Fernandez S.M., Lewis M.C., Pechenino A.S., Harburger L.L., Orr P.T., Gresack J.E., Schafe G.E., Frick K.M. (2008). Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. *Journal of Neuroscience*, 28, 8660–8667.

Figueiredo, L.S., de Freitas, B.S., Garcia, V.A., Dargél, V.A., Köbe, L.M., Kist, L.W., Bogo, M.R., Schröder, N. (2016). Iron loading selectively increases hippocampal

levels of ubiquitinated proteins and impairs hippocampus-dependent memory.

Molecular Neurobiology, 53, 6228-6239.

Fisher, D.W., Bennett, D.A., Dong, H. (2018). Sexual dimorphism in predisposition to Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. Epub ahead of print, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.04.004.

Foster, T.C. (2016). Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26, 51–64.

Hawley, W.R., Grissom, E.M., Moody, N.M., Dohanich, G.P., Vasudevan, N. (2014). Activation of G-protein-coupled receptor 30 is sufficient to enhance spatial recognition memory in ovariectomized rats. *Behavioural Brain Research*, 262, 68-73.

Jia, M., Wright-Dahlman, K., Gustafsson, J. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29, 557-568.

Kim, J., Szinte, J.S., Boulware, M.I., Frick, K.M. (2016). 17 β -Estradiol and Agonism of G-protein-Coupled Estrogen Receptor Enhance Hippocampal Memory via Different Cell Signaling Mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 36, 3309-3321.

Lewis, M.C., Kerr, K.M., Orr, P.T., Frick, K.M. (2008). Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves NMDA receptors and protein kinase A in the dorsal hippocampus of female C57BL/6 mice. *Behavioral Neuroscience*, 122, 716-721.

Liang, Z., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.X. (2007). Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *Journal of Neurochemistry*, 103, 2462–2470.

Lymer, J., Robinson, A., Winters, B.D., Choleris, E. (2017). Rapid effects of dorsal hippocampal G-protein coupled estrogen receptor on learning in female mice. *Psychoneuroendocrinology* 77, 131-140,

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

Munari, L., Provensi, G., Passani, M.B., Galeotti, N., Cassano, T., Benetti, F., Corradetti, R., Blandina, P. (2015). Brain Histamine Is Crucial for Selective Serotonin Reuptake Inhibitors' Behavioral and Neurochemical Effects. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18, pyv045.

Pereira L.M., Bastos C.P., de Souza J.M., Ribeiro F.M., Pereira G.S. (2014). Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor alpha. *Neurobiology of Learning and Memory*, 114, 1–9.

Peterson, A.C., Li, C.R. (2018). Noradrenergic Dysfunction in Alzheimer's and Parkinson's Diseases-An Overview of Imaging Studies. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 127.

Pugazhenthhi, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K.A., Boxer, L.M., Heasley, L.E., Reusch, J.E. (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 10761–10766.

Pugazhenthhi, S., Wang, M., Pham, S., Sze, C.I., Eckman, C.B. (2011). Downregulation of CREB expression in Alzheimer's brain and in A β -treated rat hippocampal neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 60.

Quevedo, J., Vianna, M.R., Martins, M.R., Barichello, T., Medina, J.H., Roesler, R., Izquierdo, I. (2004). Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 154, 339–343.

Rodgers, S., Bohacek, J., Daniel, J. (2010). Transient estradiol exposure during middle age in ovariectomized rats exerts lasting effects on cognitive function and the hippocampus. *Endocrinology* 151, 1194–1203.

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

Schröder, N., Fredriksson, A., Vianna, M.R., Roesler, R., Izquierdo, I., Archer, T. (2001). Memory deficits in adult rats following post natal iron administration. *Behavioural Brain Research*, 124, 77-85.

Schröder, N., Figueiredo, L.S., de Lima, M.N. (2013). Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies. *Journal of Alzheimer's Disease*, 34, 797-812.

Sherwin, B.B. (2009). Estrogen therapy: is time of initiation critical for neuroprotection? *Nature Reviews Endocrinology*, 5, 620–627.

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

Sullivan, E.V., 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 and Behavior* 3, 167-175.

Talboom, J.S., Williams, B.J., Baxley, E.R., West, S.G., Bimonte-Nelson, H.A. (2008). Higher levels of estradiol replacement correlate with better spatial memory in

surgically menopausal young and middle-aged rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90,155-163.

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

Vogel-Ciernia, A., Wood, M.A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 69, 8.31, 1-17.

Warburton, E.C., Brown, M.W. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 131-139.

Yamamoto-Sasaki, M., Ozawa, H., Saito, T., Rosler, M., Riederer, P. (1999). Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Research*, 824, 300–303.

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

Table 1 – Total time (in seconds \pm S.D.) exploring both objects in the training session of object recognition or object placement in adult rats that received vehicle or iron in the neonatal period and were submitted to sham surgery or ovariectomy (OVX) in the adulthood.

| GROUPS | <u>Object recognition</u> Total time exploring objects during training (Mean \pm S.D.) | <u>Object placement</u> Total time exploring objects during training (Mean \pm S.D.) |
|---------------------|--|--|
| Vehicle-Sham | 127.6 \pm 49.61 (n = 8) | 109.83 \pm 37.9 (n = 9) |
| Vehicle-OVX | 137.6 \pm 34.09 (n = 9) | 100.6 \pm 22.03 (n = 9) |
| Iron-Sham | 161.08 \pm 41.19 (n = 8) | 112.06 \pm 44.25 (n = 9) |
| Iron-OVX | 165.34 \pm 17.15 (n = 9) | 101.27 \pm 23.30 (n = 11) |

Table 2 – Open-field behavior in adult rats that received vehicle or iron in the neonatal period and were submitted to sham surgery or ovariectomy (OVX) in the adulthood.

| GROUP | Latency to start locomotion (s) (Mean ± S.D.) | Number of Crossings (Mean ± S.D.) | Number of Rearings (Mean ± S.D.) |
|---------------------------|--|--|---|
| Object recognition | | | |
| Vehicle-Sham | 4.8 ± 3.5 (n = 8) | 106.2 ± 19 (n = 8) | 40.3 ± 6.8 (n = 8) |
| Vehicle-OVX | 5.35 ± 6.55 (n = 9) | 118.8 ± 32.5 (n = 9) | 41.8 ± 8.7 (n = 9) |
| Iron-Sham | 2.27 ± 1.17 (n = 8) | 116.8 ± 18.4 (n = 8) | 42.2 ± 12.5 (n = 8) |
| Iron-OVX | 4.08 ± 2.83 (n = 9) | 115.5 ± 27.8 (n = 9) | 42.4 ± 11.5 (n = 9) |
| Object placement | | | |
| Vehicle-Sham | 1.69 ± 1 (n = 9) | 99.5 ± 27.8 (n = 9) | 39 ± 16.8 (n = 9) |
| Vehicle-OVX | 1.55 ± 0.29 (n = 9) | 90 ± 15.4 (n = 9) | 30.5 ± 13.65 (n = 9) |
| Iron-Sham | 2.44 ± 1.33 (n = 9) | 102.3 ± 14.4 (n = 9) | 40.5 ± 12.4 (n = 9) |
| Iron-OVX | 2.18 ± 1.06 (n = 11) | 74.18 ± 24.89 (n = 11) | 58.66 ± 10.14 (n = 11) |

Open-field behavior was analyzed during the habituation session for the object recognition or object placement tasks in adult rats that received vehicle or iron in the neonatal period and were submitted to sham surgery or ovariectomy (OVX) in the adulthood. Data are expressed as mean ± S.D. No significant differences among the groups were found.

Table 3 – Total time (in seconds \pm S.D.) exploring both objects in the training session of object placement and open-field behavior in adult rats submitted to neonatal iron treatment and to sham surgery or ovariectomy in the adulthood and treated with G1 or vehicle immediately after training.

| GROUPS | Total time exploring objects during training (Mean \pm S.D.) | Latency to start locomotion (s) (Mean \pm S.D.) | Number of Crossings (Mean \pm S.D.) | Number of Rearings (Mean \pm S.D.) |
|----------------------------|--|---|---|--|
| Iron-Sham + Vehicle | 17.67 \pm 32.84 (n = 11) | 3.3 \pm 3 (n = 11) | 119.4 \pm 30.2 (n = 11) | 47 \pm 12.1 (n = 11) |
| Iron-Sham + G1 | 196.7 \pm 22.3 (n = 11) | 2.7 \pm 1.4 (n = 11) | 133.4 \pm 34.1 (n = 11) | 48.7 \pm 5.7 (n = 11) |
| Iron-OVX + Vehicle | 188.8 \pm 24.6 (n = 10) | 4.1 \pm 2.6 (n = 10) | 122.9 \pm 20.7 (n = 11) | 40.2 \pm 5.6 (n = 11) |
| Iron-OVX + G1 | 188.9 \pm 23.8 (n = 12) | 2.9 \pm 1.7 (n = 11) | 119.6 \pm 25.72 (n = 11) | 46.5 \pm 11.6 (n = 11) |

Open-field behavior was analyzed during the habituation session for the object placement task. Data are expressed as mean \pm S.D. No significant differences among the groups were found.

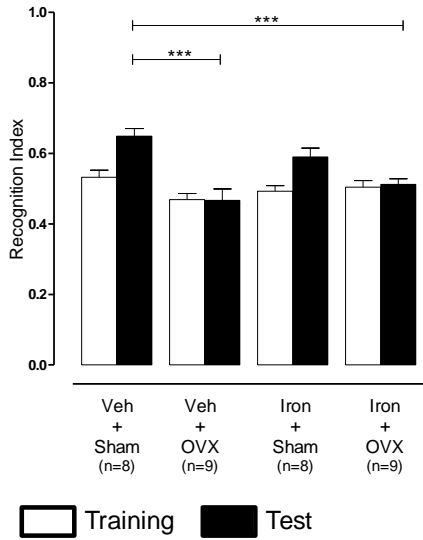
Table 4 – Total time (in seconds) exploring both objects in the training session of object placement and open-field behavior in adult rats submitted to neonatal iron treatment and to ovariectomy in the adulthood and treated with vehicle or H-89 before training and vehicle or G1 or immediately after training.

| GROUPS | Total time exploring objects during training (Mean ± S.D.) | Latency to start locomotion (s) (Mean ± S.D.) | Number of Crossings (Mean ± S.D.) | Number of Rearings (Mean ± S.D.) |
|--|---|--|--|---|
| Iron-OVX + Vehicle 15' b.t + Vehicle a.t. | 126.62 ± 50.62 (n = 9) | 2.08 ± 0.8 (n = 9) | 98.55 ± 17.86 (n = 9) | 40.11 ± 6.48 (n = 9) |
| Iron-OVX + Vehicle 15' b.t + G1 a.t. | 128.50 ± 34.64 (n = 9) | 3.14 ± 1.7 (n = 9) | 104.44 ± 20.29 (n = 9) | 42.44 ± 8.84 (n = 9) |
| Iron-OVX + H-89 15' b.t. + G1 a.t. | 147.68 ± 37.19 (n = 8) | 3.39 ± 1.66 (n = 8) | 115.62 ± 23.91 (n = 8) | 47.25 ± 6.69 (n = 8) |

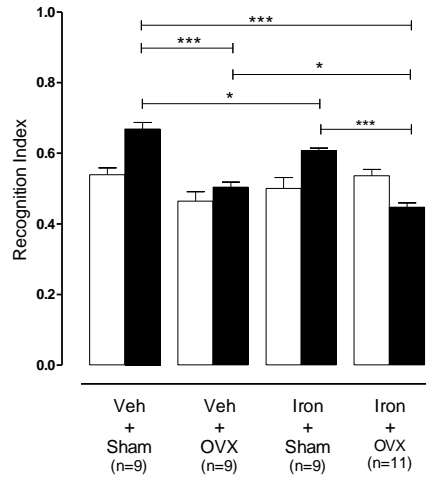
Open-field behavior was analyzed during the habituation session for the object placement task. Data are expressed as mean ± S.D. No significant differences among the groups were found.

FIGURES

A) Object Recognition



B) Object Placement



C) Inhibitory Avoidance

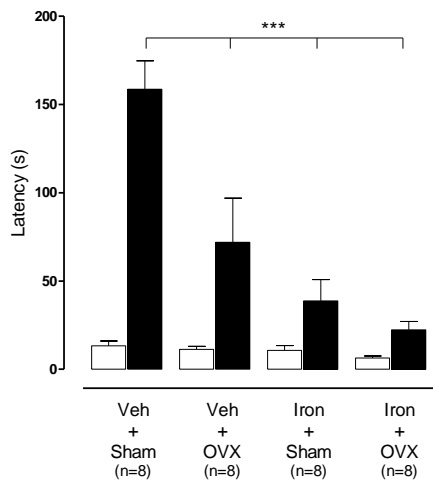


Figure 1 – Effects of iron overload in the neonatal period, ovariectomy, or the combination of iron and ovariectomy on object recognition, object placement, and inhibitory avoidance.

Female rat pups were given iron (Iron) or vehicle (Veh) in the neonatal period and submitted to sham surgery (Sham) or ovariectomy (OVX) at 3-months of age. After a period of three weeks recovering from surgeries, the animals were trained and tested 24 h later in object recognition (A), object placement or (B) inhibitory avoidance (C). N= 8-11 per group. Significant differences between Veh-Sham in comparison to other groups are indicated as * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

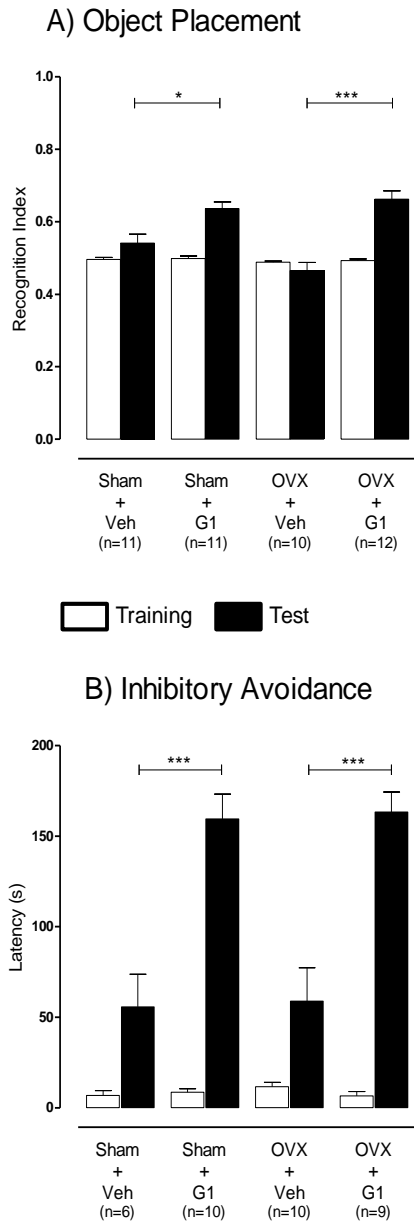
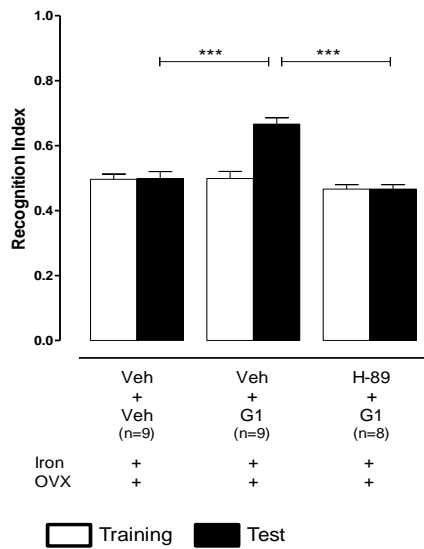


Figure 2 – Effects of GPER stimulation on memory deficits induced by iron overload in the neonatal period or by the combination of iron and ovariectomy on object placement and inhibitory avoidance.

Female rat pups were given iron (Iron) in the neonatal period and submitted to sham surgery (Sham) or ovariectomy (OVX) at 3-months of age. After a period of three weeks recovering from surgeries, the animals were trained and tested 24 h later in object placement (A) or inhibitory avoidance (B). G1 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) dissolved in sunflower seed oil (Veh) was administered immediately after training of object placement or inhibitory avoidance task. N= 10-12 per group in object placement and N = 6-10 per group in inhibitory avoidance. Significant differences between Iron-Sham-Veh in comparison to Iron-Sham-G1 or to Iron-OVX-G1 are indicated as * $p < 0.01$ or *** $p < 0.0001$.

A) Object Placement



B) Inhibitory Avoidance

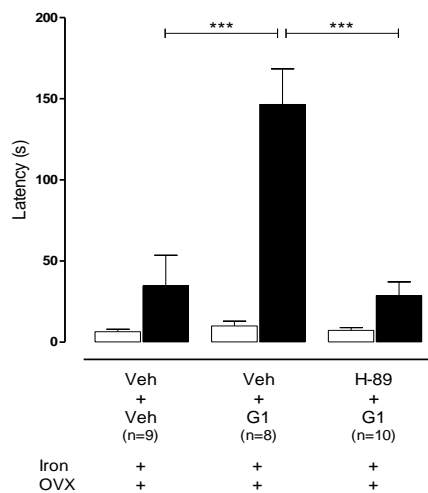


Figure 3 – Effects of PKA inhibition on G1 effects on memory impairments induced by the combination of iron and ovariectomy on object placement and inhibitory avoidance.

Female rat pups were given iron (Iron) in the neonatal period and submitted to ovariectomy (OVX) at 3-months of age. After a period of three weeks recovering from surgeries, the animals were trained and tested 24 h later in object placement (A) or inhibitory avoidance (B). H-89 (0.25 mg/kg, i.p.) or vehicle (Veh) was administered fifteen minutes before training and G1 (10 µg/kg, s.c.) dissolved in sunflower seed oil (Veh) was administered immediately after training of object placement or inhibitory avoidance task. N= 8-9 per group in object placement and N = 8-10 per group in inhibitory avoidance. Significant differences between Iron-OVX-Veh-G1 in comparison to Iron-OVX-Veh-Veh or to Iron-OVX-H-89-G1 are indicated as *** $p < 0.0001$.

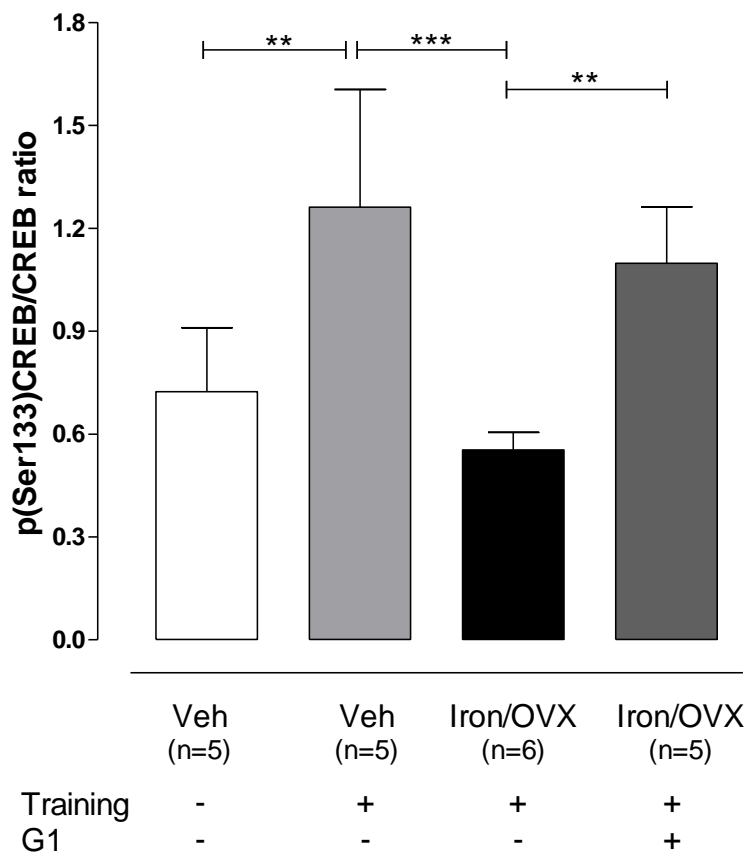
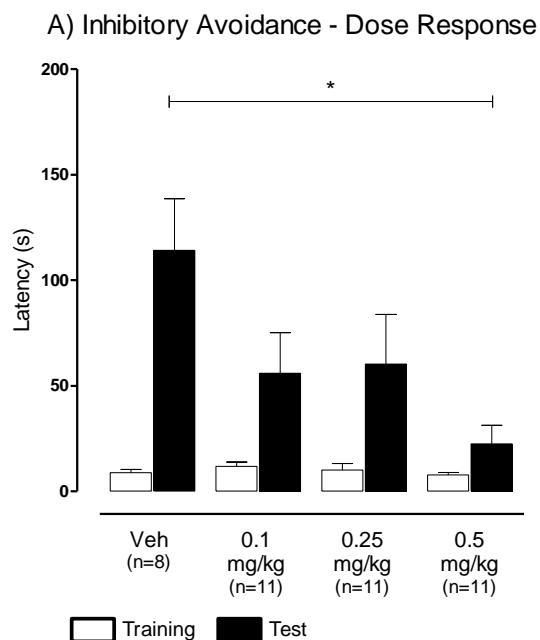


Figure 4 – Effects of G1 administration immediately after inhibitory avoidance training on CREB phosphorylation.

Control female rats or treated with Iron in the neonatal period and submitted to ovariectomy (OVX) at 3-months of age were submitted to inhibitory avoidance training. One group of adult female control rats was left undisturbed in their home cages, received one vehicle injection, and 3 hours later was euthanized with the other experimental groups (Veh-naïve). Trained control female rats received vehicle immediately after training. All experimental groups were euthanized 3 hours after injections. Hippocampi were isolated and processed for pCREB/CREB ratio analysis using Western blot. Forty μ g of protein were separated on SDS PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and probe with antibodies against phospho-CREB (pCREBSer133) and CREB. (A) Representative Western Blots for pCREB and CREB in the hippocampus are shown. (B) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD *post-hoc*. Data expressed as mean \pm S.D. N = 5 - 6 per group. Significant differences between Trained Control (Veh-trained) versus other groups are indicated as ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.0001$.

Supplementary Figure 1



In order to determine a dose of H-89 that would not induce amnesic effects by itself we performed a dose-response curve using naïve female adult rats.

Adult female rats (weighing between 190 and 285 g) received intraperitoneal (i.p.) injections of H-89 (5-Isoquinolinesulfonamide; Cayman Chemical, Michigan EUA), a selective PKA inhibitor, dissolved in saline 15 minutes prior training session of inhibitory avoidance at the doses of 0.1, 0.25, or 0.5 mg/kg. Retention test was performed 24 hours after training.

Statistical comparisons of latencies to step-down, using ANOVA, revealed a significant difference among the groups in the retention test ($F(3, 36) = 3.187, p = 0.0352$), but not in the training session ($F(3, 36) = 0.6570, p = 0.5839$). The group treated with the highest dose (0.5 mg/kg) presented significantly lower latencies when compared to the group that received vehicle ($p < 0.05$, Tukey's *post hoc* test). On the contrary, the other two doses tested did not differ from the control group treated with vehicle (both p 's < 0.05), indicating that these doses do not induce amnesic effects.

ANEXO C - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Dear Dr. Gustavo Machado,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Neurobiology of Learning and Memory

Title: G protein-coupled estrogen receptor (GPER) stimulation ameliorates iron- and ovariectomy-induced memory impairments, acting through the cAMP/PKA/CREB signaling pathway

Corresponding Author: Nadja Schröder

Co-Authors: Gustavo D Machado, M.D.; Betania S de Freitas; Leonardo Z Florian; Henrique Gus;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here:

<https://ees.elsevier.com/ynlme/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Gustavo &lname=Machado&email=gustavo.dalto@acad.pucrs.br>

Or log in:

<https://ees.elsevier.com/ynlme/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=gustavo.dalto@acad.pucrs.br>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at nadja_s@terra.com.br; nadja.schroder@cnpq.br.

Thank you,

Neurobiology of Learning and Memory



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br