



**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Biociências**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Expressão de Proteínas Regulatórias do Ferro em Ratos de  
Diferentes Idades**

**Submetidos à Sobrecarga com Ferro no Período Neonatal**

**Aluna:** Arethuzza Dornelles

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Nadja Schröder

**Co-orientador:** Dr. Maurício Bogo

**Porto Alegre, Janeiro de 2010.**



**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Biociências**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Expressão de Proteínas Regulatórias do Ferro em Ratos de  
Diferentes Idades**

**Submetidos à Sobrecarga com Ferro no Período Neonatal**

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do grau de Doutor pelo  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul

**Aluna:** Arethuzza Dornelles

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Nadja Schröder

**Co-orientador:** Dr. Maurício Bogo

**Porto Alegre, Janeiro de 2010.**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria muito de agradecer à professora Nadja Schröder. É muito difícil encontrar palavras para verbalizar o quão grata sou a minha orientadora. Uma pessoa que surgiu de braços abertos em um dos momentos mais difíceis da minha vida me fazendo perceber que para tudo na vida existe solução e que sempre encontraremos pessoas dispostas a nos ajudar, que além de nos mostrar o caminho certo a seguir, caminharão de mãos dadas junto conosco. Estou chegando ao final de uma longa trajetória, mas tenho certeza que só cheguei até aqui porque encontrei a pessoa certa com a qual andei de mãos dadas até hoje. De agora em diante, o futuro é incerto e a insegurança aparece mais uma vez. Apesar de não saber o que o futuro me reserva, sei que até o presente momento, tive este apoio incontestável e que certamente ainda o terei se possível for. Nadja, muito obrigada!!

Não poderia deixar de agradecer também ao professor Maurício. Além de ter sido meu professor no início da graduação, me deu oportunidade, mesmo que indiretamente, de aprender o que é uma iniciação científica. Com certeza foi este aprendizado me trouxe até aqui; foi o que despertou minha vontade de seguir a vida acadêmica. E hoje agradeço, mais uma vez, pelas portas abertas do laboratório sabendo que será assim sempre que possível. Muito obrigada por tudo, Maurício!!

Durante esta longa caminhada, tive muitas outras pessoas ao meu lado, mostrando que um grupo torna tudo mais fácil. Agradeço a todos que estiveram ao meu lado nestes anos, àqueles que já passaram e aos que permanecem conosco até hoje e, também, aos mais recentes integrantes desta família. Cada um de vocês tem uma participação no que concluo neste momento e merece o meu mais sincero, obrigada!!!!

Ao meu amor! Apesar de não ter estado comigo desde o início, acompanhou a maior parte. Compreendeu, apesar de não entender, tudo que aconteceu. A defesa do projeto, os

dias na frente do computador, dentro do laboratório, a ansiedade tão presente sempre, o nervosismo, o desânimo, os problemas, as comemorações, os resultados, os seminários... tudo. Mesmo sem saber qual a importância de um gráfico pronto, comemorou comigo e mesmo sem entender o que significa um PCR errado, me confortou. Além disso, posso dizer que foi minha maior inspiração, por saber que nosso futuro juntos dependia, em parte, do que conquisto hoje. Obrigada por tudo!!

E, claro, tenho que agradecer muito, à minha família. Pessoas que eu amo muito e que me acompanham e apóiam nesta caminhada desde o ingresso na graduação. É muito tempo!! Vibraram comigo a cada prova, compartilharam os problemas em cada disciplina, comemoraram na minha formatura, talvez até mais do que eu mesma, apoiaram minha decisão de ser mestre e doutora, até mesmo sem compreender exatamente o significado destes títulos e tudo que acompanhava esta escolha: seleções, provas, horários anormais, finais de semana ocupados, “férias” trabalhando, estresse, ansiedade, felicidade e, principalmente, a dependência financeira por mais tempo... Apesar de tudo, estiveram comigo sempre e a única certeza que posso ter hoje é que não importa qual seja o meu futuro, este apoio continuará existindo sempre!! Amo vocês!!

A todos, muito obrigada!!

## RESUMO

A homeostasia sistêmica e celular do ferro é regulada por uma série de proteínas que controlam a captação, o transporte, o armazenamento e a utilização deste metal. O período neonatal é crítico para o estabelecimento da concentração de ferro no cérebro adulto. Além disso, também se sabe que a concentração de ferro aumenta nas regiões cerebrais durante o processo de envelhecimento. Níveis anormalmente elevados de ferro são observados no cérebro de pacientes que apresentam doenças neurodegenerativas, entretanto os mecanismos envolvidos no acúmulo de ferro ainda não são claros. Neste estudo nós investigamos os efeitos do envelhecimento e da sobrecarga de ferro neonatal na expressão de RNAm de proteínas criticamente envolvidas no controle da homeostasia do ferro: Receptor de Transferrina (TfR), H-ferritina, IRP2, Transportador de Metal Divalente 1 (DMT1), Ceruloplasmina (CP) e Hepcidina. Ratos Wistar filhotes receberam uma única dose diária de veículo (5% sorbitol em água) ou ferro (10 mg/kg de peso corporal de  $Fe^{2+}$ ), do 12° ao 14° dia de vida pós-natal. As expressões de RNAm destas proteínas foram analisadas por RT-PCR, um método semi-quantitativo, no córtex, hipocampo e estriado de ratos sacrificados em três diferentes idades (15 dias; 90 dias e 2 anos de idade). Os resultados indicaram que a expressão de RNAm de TFR, H-ferritina e IRP2 foram diferentemente afetadas pelo envelhecimento e pelo tratamento neonatal com ferro nas diferentes regiões do cérebro estudadas. Também se observou que a expressão de RNAm de DMT1 e CP é influenciada pela idade nos ratos controle. Além disso, nossos resultados sugerem que o tratamento neonatal com ferro afeta de forma diferente a expressão de RNAm de DMT1 no córtex e estriado de ratos jovens; e a expressão de RNAm de CP no córtex de ratos jovens, e no hipocampo de ratos velhos. Com relação à Hepcidina, os resultados indicam que o tratamento com ferro no período neonatal induz um aumento nos níveis de RNAm no hipocampo de animais jovens. Estes resultados podem ajudar a entender de que maneira as alterações na homeostasia do ferro podem estar associadas à patogênese das doenças neurodegenerativas.

**Key words:** ferro – receptor de transferrina – ferritina – proteína reguladora de ferro – transportador de metal divalente 1 – ceruloplasmina – hepcidina - envelhecimento – doenças neurodegenerativas.

## ABSTRACT

Systemic and cellular iron homeostasis is regulated by a series of proteins that control iron uptake, transport, storage and utilization. The neonatal period is critical for the establishment of iron content in the adult brain; also it is known that iron content increases in brain regions during the aging process. Abnormally high levels of iron are observed in the brain of patients suffering from neurodegenerative disorders however; the mechanisms involved in iron accumulation are poorly understood. In the present study we investigated the effects of aging and neonatal iron overload on the mRNA expression of proteins critically involved in controlling iron homeostasis: Transferrin Receptor (TfR), H-ferritin, IRP2, Divalent Metal Transporter 1 (DMT1), Ceruloplasmin (CP) and Hepcidin. Wistar rat pups received a single daily dose of vehicle (5% sorbitol in water) or iron (10 mg/kg of b.w. of  $\text{Fe}^{2+}$ ), at postnatal days 12-14. The mRNA expression of these proteins was analyzed by a semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in cortex, hippocampus and striatum of rats sacrificed at three different ages (15-day-old; 90-day-old and 2-year old rats). Results indicate that TfR, H-ferritin and IRP2 mRNA expression was differentially affected by aging and by neonatal iron treatment in all three brain regions. We also found that DMT1 and CP mRNA expression is influenced by age in control rats. Moreover, our results suggest that neonatal iron treatment differentially impacts DMT1 mRNA expression in the cortex and striatum of young rats; and CP mRNA expression in the cortex of young rats, and in the hippocampus of aged rats. Hepcidin results indicate that neonatal iron treatment induced an increase in mRNA levels in hippocampus of young rats. These findings might have implications for the understanding of iron homeostasis misregulation associated with neurodegenerative disorders.

**Key words:** iron – transferrin receptor – ferritin – iron regulatory protein - divalent metal transporter 1 – ceruloplasmin – hepcidin - aging – neurodegenerative disorders.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Metabolismo do ferro com as proteínas que participam do transporte e armazenamento do mesmo.....	8
<b>Figura 2</b>	Regulação da tradução do receptor de transferrina e produção de ferritina.....	16
<b>Figura 3</b>	Efeito do tratamento neonatal com veículo ou ferro nos transcritos de hepcidina no córtex (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos jovens, adultos e velhos.....	59

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**Apo-Tf - Transferrina não ligada ao ferro**

**cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar**

**CP - Ceruloplasmina**

**DA - Doença de Alzheimer**

**DCT1 - Transportador de cátion divalente**

**DFO - Desferrioxamina**

**DMT1 - Transportador de metal divalente**

**DNA - Ácido desoxirribonucléico**

**DP - Doença de Parkinson**

**Fe - Ferro**

**GABA - Ácido gama-aminobutírico**

**GPI-CP - Glicosilfosfatidilinositol**

**Hep - Hepicidina**

**IRE - Elemento de resposta ao ferro**

**IREB 2 - Gene que codifica para IRP2**

**IRP - Proteína reguladora de ferro**

**LPS – Lipopolissacarídeo**

**NBIA - do inglês, *neurodegeneration with brain iron accumulation***

**Nramp - Proteína de resistência natural associada à macrófagos**

**NTBI - Ferro não ligado à transferrina**

**RNA - Ácido ribonucléico**

**RNA<sub>m</sub> - Ácido ribonucléico mensageiro**

**RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa**

**SN - Substância negra**

**SNC - Sistema nervoso Central**

**Tf - Transferrina**

**TfR - Receptor de transferrina**

**3`UTR - Região 3` não traduzida**

**5`UTR - Região 5` não traduzida**

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE.....	viii
1 CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
1.2.1 ENVOLVIMENTO DO FERRO EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	3
1.2.2 MODELO ANIMAL DE SOBRECARGA DE FERRO NO PERÍODO NEONATAL...4	
1.2.3 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE HOMEOSTÁTICO DO FERRO NO ORGANISMO HUMANO.....	6
1.2.1.1 CERULOPLASMINA.....	9
1.2.1.2 DMT1.....	12
1.2.1.3 IRPs.....	15
1.2.1.4 FERRITINA.....	19
1.2.1.5. RECEPTOR DE TRANSFERRINA.....	22
1.2.1.6. HEPICIDINA.....	25

<b>1.3 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>27</b>
<b>2 CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 ARTIGO CIENTÍFICO aceito pela revista <i>Neurochemical Research</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>3 CAPÍTULO 3.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 ARTIGO CIENTÍFICO submetido a revista <i>Brain Research Bulletin</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4 CAPÍTULO 4.....</b>	<b>58</b>
<b>4.1 RESULTADOS PRELIMINARES DA HEPICIDINA.....</b>	<b>59</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
<b>7 ANEXO.....</b>	<b>75</b>

# **CAPÍTULO 1**

## 1.1 INTRODUÇÃO

O ferro é um dos metais mais abundantes no corpo humano e o encéfalo contém uma concentração substancialmente maior deste metal quando comparado com outros órgãos. Entre as funções do ferro destaca-se a participação na constituição estrutural de proteínas transportadoras de oxigênio, o envolvimento no processo de fosforilação oxidativa em nível mitocondrial e a regulação gênica. No tecido nervoso, o ferro catalisa reações envolvidas no metabolismo energético, sendo essencial para processos relacionados à síntese, degradação e mecanismos de ação de vários neurotransmissores e neuromoduladores, entre os quais o ácido gama-aminobutírico (GABA), o glutamato, a dopamina, a norepinefrina e as endorfinas (Rouault & Cooperman, 2006). Uma vez que o ferro participa de tantos eventos importantes no encéfalo, é necessário que ele esteja numa forma facilmente disponível nas células. Entretanto, o encéfalo também necessita de mecanismos que o protejam do estresse oxidativo induzido pelo ferro (Qian & Shen, 2001).

As evidências do envolvimento do metabolismo anormal do ferro em diversas patologias relacionadas ao sistema nervoso central (Benkovic & Connor, 1993; Martin *et al.*, 1998; Qian & Shen, 2001) têm promovido um grande esforço por parte dos pesquisadores na tentativa de entender os mecanismos que participam do aporte, da distribuição e da compartimentalização desse elemento no encéfalo. À medida que esses estudos avançaram, ficou evidente o impacto do conteúdo de ferro da dieta sobre o metabolismo desse metal no sistema nervoso central. Como o período neonatal é crítico para o estabelecimento do conteúdo de ferro cerebral nos adultos, torna-se importante estudar os possíveis efeitos tóxicos da sobrecarga desse metal nessa fase.

Nesse contexto, o presente estudo sobre “Expressão de Proteínas Regulatórias do Ferro em Ratos de Diferentes Idades Submetidos à Sobrecarga com Ferro no Período Neonatal” foi realizado com o intuito de analisarmos a expressão de proteínas que

desempenham importante papel no metabolismo do ferro, em diferentes regiões cerebrais de ratos, a fim de comparar os níveis das mesmas, nos cérebros de animais tratados com ferro durante o período neonatal e com os encontrados em animais controles. A expressão destas proteínas foi analisada nos cérebros de animais adultos, velhos e jovens submetidos a este tratamento.

## **1.2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.2.1 ENVOLVIMENTO DO FERRO EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

Um crescente corpo de evidências clínicas e experimentais sugere a participação do ferro em doenças neurodegenerativas, particularmente no mecanismo de morte celular na Doença de Parkinson (DP), pois a maioria das reações de formação de radicais hidroxil, induzidas pelo metabolismo da dopamina, envolve a presença de ferro. Além disso, evidências sugerem que o estresse oxidativo participe no mecanismo de morte neuronal devido à formação excessiva de peróxido de hidrogênio e radicais livres derivados de oxigênio que podem causar danos à célula através de reações de peroxidação lipídica e alterações na fluidez da membrana (Polla *et al.*, 2003). Tem sido sugerido que existe uma relação entre disfunções nas vias de manutenção da homeostasia do ferro, principalmente nas regiões onde o seu metabolismo é mais alto, e a patogênese de doenças neurodegenerativas (Benkovic & Connor, 1993; Martin *et al.*, 1998; Qian & Shen, 2001). Além disso, estudos demonstram a elevação da concentração de ferro na substância negra (SN) de portadores da Doença de Parkinson (DP) que é a região cerebral mais afetada pela perda neuronal nessa patologia (Dexter *et al.*, 1991; Jellinger *et al.*, 1993; Faucheux *et al.*, 1993; Kienzl *et al.*, 1995; Ebadi *et al.*, 1996; Griffiths *et al.*, 1999).

Depósitos de ferro também têm sido encontrados no globo pálido e SN de pacientes que apresentam Neurodegeneração com Acúmulo de Ferro Cerebral (NBIA, do inglês, *neurodegeneration with brain iron accumulation*), anteriormente conhecida como síndrome de Hallervorden-Spatz (Galvin *et al.*, 2000), no núcleo caudado de indivíduos com a doença de Huntington (Bartzokis *et al.*, 1999) e ao redor das placas senis de pacientes com a Doença de Alzheimer (DA) (Lynch *et al.*, 2000). Os efeitos patológicos do ferro também parecem estar envolvidos com a Ataxia de Friedreich, com a epilepsia e a Esclerose Amiotrófica Lateral (Lieu *et al.*, 2001). Além disso, a distribuição cerebral de ferro altera-se com o envelhecimento, podendo ter alguma relação com disfunções nas vias de manutenção da homeostasia desse metal e, conseqüentemente, promovendo os depósitos nas regiões onde seu metabolismo é mais alto, podendo, desse modo, participar de eventos neurodegenerativos (Zecca *et al.*, 2001). As proteínas envolvidas na manutenção da homeostasia do ferro no cérebro precisam se ajustar aos níveis mais altos desse metal, ou o risco de ocorrer danos induzidos pela formação de radicais livres promovida pelo ferro irá aumentar.

### **1.2.2 MODELO ANIMAL DE SOBRECARGA DE FERRO NO PERÍODO NEONATAL**

O período neonatal é crítico para o estabelecimento do conteúdo de ferro no cérebro adulto. Investigações a respeito da captação de ferro pelo cérebro indicaram que o transporte de ferro ao cérebro atinge seus níveis máximos durante o período pós-natal de rápido crescimento cerebral (Taylor & Morgan, 1990; Taylor *et al.*, 1991). Além disso, a distribuição cerebral de ferro altera-se com o envelhecimento, podendo ter alguma relação com disfunções nas vias de manutenção da homeostasia desse metal e, conseqüentemente, promovendo os depósitos nas regiões onde seu metabolismo é mais alto, podendo, desse modo, participar de eventos neurodegenerativos (Zecca *et al.*, 2001).

Enquanto no passado a ênfase havia sido dada ao combate à deficiência de ferro (anemia), a aplicação indiscriminada de suplementação de ferro a crianças durante seu primeiro ano de vida tornou importante estudar os mecanismos através dos quais o organismo pode se proteger contra o excesso desse metal (Bothwell, 1995).

De fato, Fredriksson e colaboradores (1999), utilizando camundongos e ratos, descreveram pela primeira vez que o tratamento sistêmico com ferro durante o período de rápido desenvolvimento cerebral (período que vai, em humanos, desde o último trimestre da gravidez até um ano de vida) produz acúmulo seletivo de ferro nos gânglios da base, além de causar disfunções neurocomportamentais. Alguns resultados mostraram ainda que camundongos tratados com ferro do 10° ao 12° dia de vida pós-natal (Fredriksson *et al.*, 2000) e ratos (Schröder *et al.*, 2001) tratados com ferro do 12° ao 14° dia apresentam hipoatividade motora, bem como déficits no aprendizado e memória em duas diferentes tarefas comportamentais, o labirinto radial de oito braços e a esquivia inibitória.

Recentemente, foi verificado que ratos tratados com ferro no período neonatal apresentam prejuízo de memória de reconhecimento quando adultos (de Lima *et al.*, 2005). Também foi observado que a administração de ferro no período neonatal induz um aumento significativo na peroxidação lipídica na SN, no córtex e no hipocampo, bem como um aumento de danos oxidativos a proteínas nestas mesmas regiões cerebrais de ratos adultos. A análise aponta, ainda, a diminuição da atividade da superóxido dismutase (enzima antioxidante) na SN, no córtex e no hipocampo. Esses resultados sugerem que o ferro possa estar exercendo seus efeitos deletérios sobre a cognição através da indução do aumento do estresse oxidativo cerebral.

Portanto, apesar do ferro ser essencial para uma variedade de funções biológicas, como transporte de oxigênio, respiração mitocondrial e síntese de DNA (Huang *et al.*, 2006), também pode gerar radicais livres altamente tóxicos por ser um metal de transição (Gaasch *et*

al., 2007). Por isso, mecanismos para manter a homeostasia do ferro a nível celular são cruciais para a viabilidade das células, podendo, o suprimento inapropriado de ferro celular, causar a morte das mesmas (Stankiewicz et al., 2007). Os efeitos da toxicidade causada pelo excesso deste metal são especialmente notáveis em várias partes do Sistema Nervoso Central (SNC), por este, quando maduro, não apresentar capacidade regenerativa (Jeong & David, 2003).

Devido à necessidade deste equilíbrio, a aquisição de ferro é um desafio do qual participam muitas proteínas para assegurar que a captura do mesmo seja suficiente e apropriada às necessidades das células e organismos. Além disso, as proteínas envolvidas no transporte e armazenamento de ferro precisam se ligar a este para prevenir a formação de radicais livres. O número total de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro em mamíferos é desconhecido, entretanto, muitas proteínas importantes para o metabolismo do ferro têm sido caracterizadas nos últimos anos e muito já é sabido sobre como suas expressões são integradas para manter a homeostasia (Rouault, 2001).

### **1.2.3 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE HOMEOSTÁTICO DO FERRO NO ORGANISMO HUMANO**

A trajetória que o ferro obtido na dieta percorre para chegar ao cérebro começa no intestino. A figura 1 mostra uma representação esquemática das proteínas envolvidas no controle homeostático do ferro.

Na forma reduzida, o **transportador de metal divalente (DMT1** - do inglês, *Divalent Metal Transporter 1*), encontrado em diferentes compartimentos, pode carregar ferro através do epitélio duodenal para o sangue. No sangue,  $Fe^{+2}$  é oxidado a  $Fe^{+3}$  pela **ceruloplasmina (CP)**, podendo, então, ser acoplado à **transferrina (Tf)**, que é a proteína transportadora de ferro predominante no soro (Stankiewicz et al., 2007).

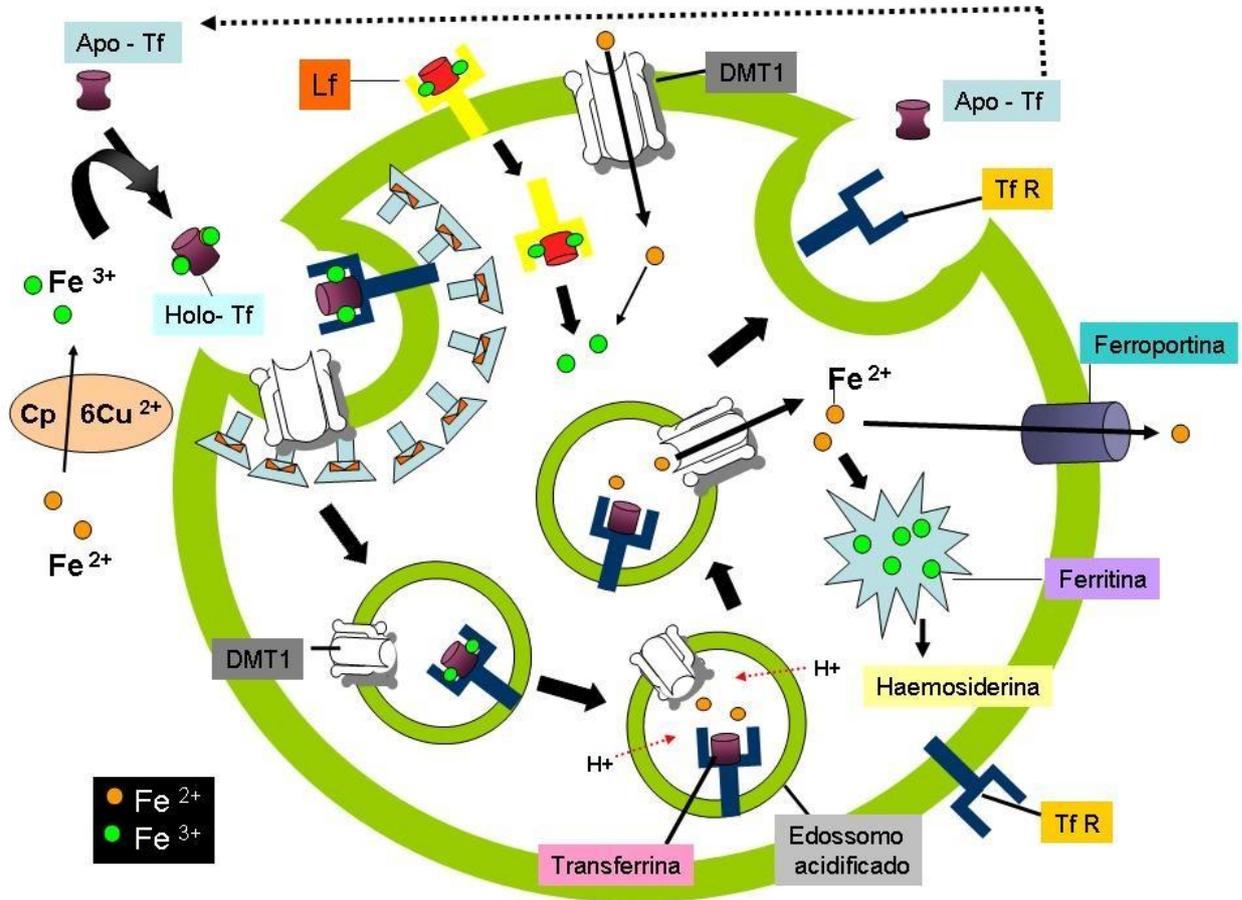
Entretanto, o ferro que circula nesta forma no sangue fora do SNC não pode atravessar diretamente a barreira hemato-encefálica. Existem vários mecanismos para que o ferro atravesse a barreira hemato-encefálica. O primeiro e provavelmente o mais comum é através dos **receptores de transferrina (TfR** - do inglês, *Transferrin Receptor*) nas células endoteliais do cérebro, nos quais o ferro circulante, na forma de transferrina, se liga. O complexo transferrina-receptor de transferrina entra no cérebro por endocitose. Vários outros sistemas transportadores também podem promover essa passagem do ferro pela barreira hemato-encefálica, como o transportador de metal divalente – DMT1 e o receptor de lactoferrina (Stankiewicz *et al.*, 2007).

A quantidade de ferro capturada e estocada pelas células é uma função da abundância do receptor de transferrina e do seu ligante. Isto pode ser controlado a nível pós-transcricional pelas **proteínas reguladoras de ferro (IRPs**, do inglês, *Iron Regulatory Proteins*) que interagem com **elementos de resposta ao ferro (IRE**, sigla do inglês *iron-responsive element*) no RNA para alterar a expressão da **ferritina**, a proteína de armazenamento intracelular de ferro mais comum no cérebro, e do receptor de transferrina nas células endoteliais do cérebro, neurônios, glia e oligodendrócitos (Stankiewicz *et al.*, 2007).

Dentre outras proteínas envolvidas no metabolismo do ferro, destaca-se a **Hepicidina (Hep)**, um hormônio regulador de ferro, recentemente descoberto, produzido principalmente pelo fígado. Sua função é regular a concentração de ferro extracelular através da absorção intestinal de ferro e liberação de ferro através da inibição dos macrófagos (Park *et al.*, 2001; Ganz , 2004).

Finalmente, depois de o cérebro ter usado o ferro que havia armazenado, este precisa sair da célula, e a ceruloplasmina pode facilitar essa liberação celular de ferro (Stankiewicz *et al.*, 2007). O ferro também pode ser liberado das células via ferroportina ou ainda ligado à

transferrina, mas pouco se sabe a respeito da exportação de ferro das células neuronais (Gaasch *et al.*, 2007).



**FIG. 1** – Metabolismo do ferro com as proteínas que participam do transporte e armazenamento do mesmo. Elaborada por Juliana Torres e Arethuzia Dornelles.

Na figura está representado o metabolismo do ferro com as proteínas que participam do transporte e armazenamento do mesmo sendo Cp, ceruloplasmina; DMT1, transportador de metal divalente; Tf, transferrina; TfR, Receptor de Transferrina; Ferritina; Ferroportina;  $Fe^{+3}$ , férrico e  $Fe^{+2}$ , ferroso.

Dentre as proteínas envolvidas na homeostasia do ferro, enfocaremos nosso trabalho nas seguintes: CP, uma ferroxidase responsável pelo efluxo de ferro; DMT1, responsável pelo transporte de ferro; IRPs, as quais controlam a expressão de algumas proteínas de acordo

com a concentração existente de ferro; Ferritina, responsável pelo armazenamento de ferro; TfR, receptor responsável pela captura do complexo ferro-transferrina; Hepicidina, hormônio responsável pela regulação de ferro extracelular. A seguir será feita uma abordagem mais detalhada sobre a estrutura, localização e função dessas proteínas.

### 1.2.1.1 CERULOPLASMINA

Por mais de 30 anos, a ceruloplasmina (CP) tem sido postulada como uma ferroxidase crítica no plasma de todos os vertebrados (Qian & Shen, 2001) que converte a forma altamente tóxica do ferro ( $Fe^{+2}$ ) em uma forma não tóxica ( $Fe^{+3}$ ) (Jeong & David, 2003). Essa proteína, produto do gene *CP* localizado no cromossomo humano 3q23-q24 (Roy & Andrews, 2001), é sintetizada principalmente nos hepatócitos. Entretanto, estudos recentes mostram que a CP na sua forma ancorada, por glicosilfosfatidilinositol (GPI-Cp) também é expressa pelos astrócitos no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, enquanto a forma secretada expressa pelo fígado é encontrada no soro (Jeong & David, 2003).

O papel para CP no efluxo de ferro foi sugerido primeiramente nos anos 60, com base na observação que a atividade de ferroxidase da CP promovia a incorporação de ferro na transferrina (Osaki, et al., 1996). Essa sugestão é suportada por um estudo recente usando um modelo animal de aceruloplasminemia, uma doença do metabolismo do ferro resultante de mutações no gene *CP*. Humanos com essas mutações apresentam um acúmulo de ferro em vários órgãos, incluindo o fígado e o cérebro, que só é detectado aos 45-55 anos de idade (Miyajima, et al., 1987; Yoshida, et al., 1995). Esse acúmulo severo de ferro no cérebro nos casos de aceruloplasminemia indica que a ceruloplasmina expressa na superfície dos astrócitos desempenha importante papel na manutenção dos níveis normais de ferro no SNC e sua mobilização fora deste (Jeong & David, 2003). Dados clínicos desta doença revelam o possível papel da CP na liberação de ferro (efluxo) das células do cérebro (Qian & Shen,

2001). Níveis elevados de ferro e de peroxidação lipídica têm sido observados em pacientes com aceruloplasminemia (Miyajima, et al., 1998) e o acúmulo de ferro no SNC está correlacionado com neurodegeneração tanto em humanos quanto em camundongos (Miyajima, et al., 1987; Patel, et al., 2002). Em camundongos mutantes, que não expressam ceruloplasmina, foi constatado acúmulo de ferro no fígado (Harris, et al., 1999; Patel, et al., 2002) e no SNC (Patel, et al., 2002).

Apesar de vários anos de investigação, as funções da CP ainda não são bem compreendidas, mas com base nos estudos clínicos de aceruloplasminemia tem sido amplamente aceito que a CP tem um importante papel na liberação de ferro das células do cérebro e, achados mais recentes, mostram que esse ponto de vista tradicional precisa ser reconsiderado (Qian & Shen, 2001). É muito provável que, apesar da sua atividade de ferroxidase, a CP desempenhe um papel não só no efluxo de ferro das células do cérebro, mas também no influxo de ferro nessas células. É possível também que o papel fisiológico da CP seja mais importante na captura do que no efluxo de ferro. Algumas evidências suportam essa possibilidade. A primeira evidência é a localização da CP no cérebro; a expressão da CP no cérebro não é observada em todos os astrócitos, mas identifica uma única subpopulação dessas células da glia que circundam predominantemente a microvasculatura. A CP localizada nesses astrócitos está posicionada de forma ideal para oxidar efetivamente o  $Fe^{+2}$ , altamente tóxico, em  $Fe^{+3}$  (Patel, et al., 2000; Salzer, et al., 1998). Essa localização exclusiva implica no fato de que a CP seja necessária para que o  $Fe^{+2}$  seja oxidado para  $Fe^{+3}$  depois de atravessar a membrana.  $Fe^{+3}$  pode, então, se ligar a transferrina, proteína transportadora de ferro, no fluido cérebro espinhal e no fluido intersticial, e ser adquirido por neurônios ou outras células cerebrais. A segunda evidência é fornecida pelos dados obtidos a partir de estudos *in vitro* do efeito da CP no transporte de ferro através das membranas celulares. Esses estudos mostram que adição de CP às células resulta em aumento na captura de ferro ao invés de liberação de

ferro não ligado a transferrina (NTBI – *non-Tf-bound iron*) (Mukhopadhyay, et al., 1998; Attieh, et al., 1999).

Outra evidência é a existência de atividade de oxidação espontânea no cérebro. Tem sido sugerido que a taxa de oxidação espontânea ( $\text{Fe}^{+2}$  em  $\text{Fe}^{+3}$ ) seja suficiente para a baixa taxa correspondente de liberação de ferro. Somente em taxas de liberação de ferro mais altas a atividade exógena de ferroxidase como a fornecida pela CP seria necessária (Young, et al., 1997). Em outras palavras, sob condições fisiológicas, o papel da CP na liberação de ferro no cérebro pode não ser importante ou que somente uma pequena quantidade de CP seja suficiente para manter níveis normais de ferro nas células do cérebro (Qian & Shen, 2001).

A maioria do ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ), depois de atravessar a barreira hematoencefálica, é oxidada em  $\text{Fe}^{+3}$  pela atividade de ferroxidase da CP e depois se liga a transferrina e é adquirido pelas células do cérebro. Entretanto, sob condições patológicas, a perda de CP (e de sua atividade de ferroxidase) torna impossível que a maioria do  $\text{Fe}^{+2}$  seja oxidado em  $\text{Fe}^{+3}$ . Portanto, a quantidade de  $\text{Fe}^{+3}$  e Tf-Fe diminui e a quantidade de NTBI e  $\text{Fe}^{+2}$  livre aumenta. Como resultado, a captura de NTBI pelos neurônios aumenta de forma anormal. Devido à falta de CP dentro das células,  $\text{Fe}^{+2}$  não está livre para ser armazenado ligado à ferritina, já que somente  $\text{Fe}^{+3}$  pode ser armazenado desta forma e para a oxidação de  $\text{Fe}^{+2}$  em  $\text{Fe}^{+3}$ , é necessária a atividade de ferroxidase da CP (Reilly, et al., 1997). Além disso, apesar do  $\text{Fe}^{+2}$  intracelular aumentar, este não pode ser liberado por que o  $\text{Fe}^{+2}$  extracelular também está aumentado. O resultado combinado vai ser o acúmulo intracelular de ferro. Isso induz o estresse oxidativo e a formação de radicais livres, desencadeando uma cascata de eventos patológicos levando à morte neuronal (Qian & Shen, 2001).

Por outro lado, Jeong & David em 2003, usando astrócitos purificados do sistema nervoso central de camundongos sem CP, mostraram que esta proteína é essencial para o efluxo de ferro, não estando envolvida com a regulação de influxo do mesmo. A escolha

destas células foi baseada em dados obtidos previamente, os quais mostraram que o cérebro de rato expressa principalmente a forma ancorada (GPI-Cp) de ceruloplasmina, a qual é predominantemente expressa por astrócitos.

O gene que codifica para GPI-Cp humana foi clonado recentemente, mas o mecanismo através do qual esta proteína regula os níveis neuronais de ferro ainda não se sabe. Pode ser que envolva a transferência da GPI-Cp de um astrócito para a membrana de um neurônio, porque a proteína ceruloplasmina ancorada pode se transferir de uma célula para outra apenas por contato. Isto pode explicar porque CP é encontrada tanto em astrócitos quanto em neurônios no SNC, enquanto o RNAm de CP é encontrado somente nos astrócitos (Jeong & David, 2003).

Também foi mostrado que a GPI-Cp aparece na superfície dos astrócitos juntamente com o transportador de metais divalentes, Ferroportina 1, sendo fisicamente associado a este. Além disso, Ferroportina 1, na ausência de GPI-Cp ou CP secretada não é capaz de regular o efluxo de ferro. A incapacidade da Ferroportina 1 de liberar a forma tóxica do ferro na ausência da ceruloplasmina (porque na sua ausência não ocorre oxidação de  $Fe^{+2} - Fe^{+3}$ ) pode servir como um mecanismo protetor para evitar a saída do ferro tóxico, levando a geração rápida de radicais livres. A ação coordenada da GPI-Cp e da Ferroportina 1 pode ser necessária para o efluxo de ferro das células neurais e um distúrbio nesse balanço pode causar o acúmulo de ferro no sistema nervoso central e neurodegeneração (Jeong & David, 2003).

#### **1.2.1.2 DMT1**

O transporte de ferro através das membranas necessita da internalização do complexo ferro-transferrina ligado a um receptor específico, ou transporte ativo através de um transportador de cátions divalentes ligado à membrana que pertencem a diferentes famílias de proteínas, incluindo a família Nramp. Nramp 2, atualmente referida como DMT1 (Tchernitchko

*et al.*, 2002), sendo também conhecida como DCT1 (Ke *et al.*, 2005; Rouault, 2001; Martini *et al.*, 2002) e como SLC11A2 (Jeong & David, 2003), foi primeiramente identificada com base na sua homologia com Nramp1 em 1995 (Grunheid, *et al.*, 1995). Em 1997, dois grupos identificaram independentemente a DMT1 como a primeira proteína transmembrana transportadora de ferro em mamíferos (Ke *et al.*, 2005; Qian & Shen, 2001).

A DMT1 é uma proteína transportadora de metais divalentes (Jeong & David, 2003) que depende de próton, ou seja, realiza transporte ativo (Ke *et al.*, 2005; Connor *et al.*, 2001; Qian & Shen, 2001). Esta proteína forma um canal transmembrana (Rouault, 2001) através do qual uma ampla gama de substratos, incluindo  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  e  $\text{Pb}^{+2}$  são transportados (Qian & Shen, 2001).

O gene DMT1 de mamíferos produz dois RNAm, devido ao *splicing* alternativo do éxon da extremidade 3', o qual gera duas proteínas com extremidades C-terminais distintas (Tchernitchko *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007): uma chamada DMT1 (+IRE), na qual o RNAm apresenta um elemento de resposta ao ferro (IRE) na 3'-UTR, assim como ocorre no RNAm do receptor de transferrina (TfR) (Martini *et al.*, 2002), que codifica uma proteína de 561 aminoácidos, e outra chamada DMT1 (-IRE) que não apresenta um IRE clássico e codifica uma proteína de 568 aminoácidos (Ke *et al.*, 2005; Qian & Shen, 2001). Ainda não foi esclarecido se essas isoformas de DMT1 apresentam funções diferentes (Kim *et al.*, 2007), mas sabe-se que são encontradas em diferentes compartimentos subcelulares.

DMT1 é expressa amplamente (Ke *et al.*, 2005) sendo que o RNAm de DMT1 foi detectado em todos os tecidos testados, embora seus níveis geralmente sejam bastante baixos (Qian & Shen, 2001). Tchernitchko e colaboradores em 2002 mostraram que ambas as isoformas apresentam expressão tecido-específica. A nível celular, DMT1 pode ser expressa na membrana endossomal e atua na exportação de ferro do endossomo para o citoplasma da célula além de ser expressa na membrana plasmática. Isso significa que, a DMT1 é importante

na captura e no transporte de ferro tanto ligado quanto não ligado à transferrina (Ke *et al.*, 2005).

Apesar do pouco que se sabe sobre o papel dos transportadores DMT1 no sistema nervoso central, seus transcritos têm sido detectados por hibridização *in situ* no plexo coróide, nos neurônios por todo sistema nervoso central (Rouault, 2001; Wu *et al.*, 2004), na substância negra, em níveis moderados (Ke *et al.*, 2005; Qian & Shen, 2001), e análises de RT-PCR e *Western Blot* mostraram que tanto o RNAm quanto a proteína DMT1 são expressas por astrócitos (Jeong & David, 2003). Além disso, os tecidos cerebrais parecem expressar uma taxa mais alta da forma DMT1(+IRE) do que da forma DMT1(-IRE) (Qian & Shen, 2001).

A presença de DMT1 nas células endoteliais no cérebro sugere que o ferro seja liberado dos endossomos dentro do citoplasma das células endoteliais ao invés de transportado através da célula como o complexo ferro-transferrina dentro de um endossomo (Connor *et al.*, 2001).

Na Doença de Parkinson, a expressão de DMT1 é moderadamente alta nos neurônios da substância negra o que coincidentemente está correlacionado à deposição anormal de ferro na mesma área. Portanto, o distúrbio na expressão de DMT1 pode estar envolvido com o acúmulo de ferro na Doença de Parkinson. Esses níveis anormalmente altos de ferro no cérebro têm sido demonstrados em outras doenças neurodegenerativas além da Doença de Parkinson. Tem sido amplamente defendida a idéia de que o estresse oxidativo induzido pelo aumento de ferro esteja envolvido na cascata de eventos que resulta na morte neuronal característica dessas doenças (Ke *et al.*, 2005; Qian & Shen, 2001).

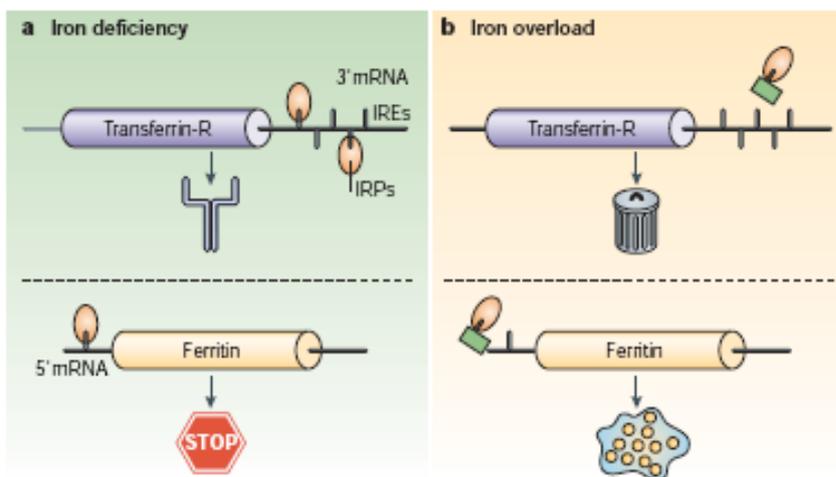
A investigação da expressão dos RNAm de DMT1 (+IRE) e DMT1 (-IRE) e síntese de proteínas no córtex, hipocampo, estriado e substância negra de ratos com diferentes idades ou alimentados com dieta alta ou baixa de ferro por 6 semanas mostrou que a expressão de DMT1 nessas regiões do cérebro depende da idade, mas não depende do conteúdo de ferro

na dieta. A falta de resposta de DMT1 à concentração de ferro no cérebro de ratos adultos, sugere que o IRE do RNAm de DMT1 do cérebro pode realmente não ser responsivo ao ferro e que o transporte de ferro mediado por DMT1 pode não ser um passo limitado pela taxa de ferro, apesar de poder desempenhar um papel crítico na captura do mesmo pelo cérebro (Ke *et al.*, 2005).

### 1.2.1.3 IRPs

A regulação das proteínas que mantêm a homeostasia do ferro é mediada por um par de proteínas citoplasmáticas conhecidas como proteínas regulatórias de ferro, as IRPs. Estas incluem IRP1 e IRP2, as quais se ligam a regiões em RNAm específicos conhecidas como elementos de resposta ao ferro (IRE) (Coon *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005; ERLITZKI *et al.*, 2002). Essas proteínas têm sido amplamente encontradas nos citoplasmas de todos os tecidos de mamíferos examinados (Crichton *et al.*, 2002; Eisenstein & Blemings, 1998) e atuam como sensores de ferro essencialmente por existirem em duas conformações diferentes (Crichton *et al.*, 2002). Em células deficientes em ferro, a ligação de IRPs nas IREs encontradas dentro da 5' UTR de transcritos como o da ferritina é ativada, resultando na repressão da tradução da mesma, enquanto a ligação nas IREs encontradas nas 3' UTR de transcritos como o do receptor de transferrina, protege o RNAm do ataque de nucleases, resultando na estabilização do transcrito. Assim, as IRPs coordenam a resposta celular à falta de ferro provocando um aumento da captura de ferro através dos receptores de transferrina, mas uma diminuição no armazenamento de ferro pela ferritina (Huang *et al.*, 2006; Meyron-Holtz *et al.*, 2004; Crichton *et al.*, 2002). Por outro lado, quando a concentração intracelular de ferro aumenta, a IRP1 é inativada, perdendo a capacidade de ligação a IRE, enquanto IRP2 é rapidamente degradada. Como resultado, o RNAm da ferritina é traduzido eficientemente enquanto o RNAm do receptor de transferrina é degradado (Irace *et al.*, 2005; Crichton *et al.*,

2002). A conversão destas duas formas constitui um sensor que permite que em células com concentração adequada de ferro, a síntese de ferritina ocorra enquanto em células deficientes em ferro a síntese do receptor de transferrina aumente (Figura 2) (Crichton *et al.*, 2002). A atividade de ligação das IRPs ao RNAm também é regulado pelo estresse oxidativo, fosforilação, hipóxia, hipóxia/reoxigenação (Irace *et al.*, 2005), óxido nítrico e por mudanças na proliferação ou diferenciação celular (Eisenstein & Blemings, 1998).



**FIG. 2** – Regulação da tradução do receptor de transferrina e produção de ferritina.

A produção do receptor de transferrina (TfR) e da ferritina é regulada a nível de RNAm pelas proteínas reguladoras de ferro (IRPs), as quais se ligam as elementos de resposta ao ferro (IREs) nas regiões 3' e 5' não transcritas dos seus respectivos RNAs mensageiros. a) em situações de deficiência de ferro, as IRPs se ligam às IREs, protegendo o RNAm do TfR da digestão por nucleases e evitando a síntese de ferritina. b) quando existe abundância de ferro, a ligação das IRPs é bloqueada devido a alterações conformacionais e, portanto, o RNAm do TfR fica livre para ser destruído e a expressão de ferritina é permitida (Zecca *et al.*, 2004).

Gunshin e colaboradores (2001) sugerem que a DMT1 também seja regulada pela estabilização do seu RNAm através da ligação da IRP1 e/ou da IRP2 ao IRE. Esses autores demonstraram que, tanto IRP1 quanto IRP2, podem se ligar a IRE de DMT1, mas que a afinidade de IRP1 por essa região é consideravelmente mais alta, sendo que a afinidade de IRP2 pela mesma, talvez seja insuficiente para realizar a regulação.

IRP1 é uma proteína bifuncional que através da montagem/desmontagem do seu grupamento [4Fe-4S], muda de aconitase citosólica (responsável pela conversão de citrato em isocitrato), para a forma com capacidade de ligação ao RNAm envolvida na regulação pós-transcricional do metabolismo do ferro, em resposta ao nível de ferro intracelular (Irace *et al.*, 2005; Meyron-Holtz *et al.*, 2004). IRP1 e IRP2 compartilham alta homologia de seqüência com exceção da inserção de 73 aminoácidos encontrada em IRP2 que serve como sítio para degradação ferro-dependente (Eisenstein & Blemings, 1998) e exibem atividade bioquímica muito similar em relação à afinidade de ligação e regulação *in vitro* dos transcritos que apresentam IRE (Allerson *et al.*, 1999; Kim, et al., 1995).

Apesar das duas IRPs serem amplamente expressas, IRP1 foi primeiramente o foco de interesse por parecer ser muito mais abundante do que a IRP2 na maioria das células e tecidos (Rouault, et al., 1990; Hirling, et al., 1992; Mullner, et al., 1992; Patino and Walden, 1992; Yu, et al., 1992; Henderson, et al., 1993). Assim, baseado nas afinidades de ligação, atividades regulatórias e abundância, seria esperado que IRP1 fosse o regulador pós-transcricional predominante no metabolismo do ferro em mamíferos (Meyron-Holtz *et al.*, 2004).

Camundongos transgênicos *knockouts* para uma cópia de IRP1 e para as duas cópias de IRP2 apresentam elevado nível de ferro no cérebro e estudos histológicos com microscopia óptica têm estabelecido o acúmulo de ferritina e de ferro nos axônios desses camundongos *knockouts* quando comparados com camundongos do tipo selvagem (Smith, et al., 2004). Esses animais desenvolvem uma doença neurodegenerativa progressiva cujas características assemelham-se àquelas encontradas em doenças humanas incluindo a Doença de Parkinson. Esses achados sugerem que a degeneração neuronal nos camundongos IRP *knockouts* pode estar associada com a presença do excesso de ferro e ferritina nos axônios (Zhang *et al.*,

2005). Esses resultados indicam que IRP1 sozinha é incapaz de regular de maneira apropriada o metabolismo do ferro nos tecidos de mamíferos (Meyron-Holtz *et al.*, 2004).

Para avaliar o papel da IRP1 na fisiologia do ferro em mamíferos, Meyron-Holtz e colaboradores em 2004, usaram camundongos IRP1 *knockouts*. Esses camundongos não apresentaram patologia declarada e apresentaram comprometimento do metabolismo de ferro normal somente nos tecidos nos quais o nível de IRP1 era muito superior ao nível de IRP2. Os autores demonstraram que IRP1 existe predominantemente na forma de aconitase citosólica, que não é recrutada para regular o metabolismo de ferro nas células de animais com deficiência, e que a falta deste metal, suficiente para ativar a IRP2, não aumenta a atividade de ligação da IRP1 a IRE. A viabilidade e saúde dos animais IRP1<sup>-/-</sup> indica que esta proteína não é crítica para nenhuma das suas atividades sob condições fisiológicas normais devido à redundância de cada uma de suas duas funções. Na ausência da aconitase citosólica, a aconitase mitocondrial (com seqüência similar de aminoácidos) pode converter citrato em isocitrato, e precursores e produtos desta reação podem atravessar a membrana mitocondrial para o citosol se for necessário. De maneira similar, apesar da IRP1 apresentar atividade de ligação a IRE, os resultados obtidos revelaram que IRP2 parece ser capaz de regular completamente o metabolismo pós-transcricional de ferro em todos os tecidos.

A principal diferença entre IRP1 e IRP2 pode ser observada no cerebelo. Apesar de ambas, IRP1 e IRP2, contribuírem substancialmente para atividade total de ligação a IRE em animais selvagens, anormalidades de regulação gênica pós-transcricional são encontradas somente em cérebros de animais IRP2<sup>-/-</sup> (Meyron-Holtz *et al.*, 2004).

Com base nos resultados obtidos, Meyron-Holtz e colaboradores em 2004 sugeriram que a pequena fração de IRP1 que se encontra na forma que se liga a IRE contribua para a regulação basal do metabolismo do ferro, como indicado pelos achados nos ratos IRP1<sup>+/-</sup> IRP2<sup>-/-</sup>, mas que IRP1 apresenta um papel mínimo em detectar a concentração de ferro

celular. IRP2 parece ser a proteína responsável por constatar e por regular as flutuações das concentrações de ferro celular. Portanto, a deleção de IRP2 causa uma severa desregulação das proteínas alvo de IRP2, enquanto a deleção de IRP1 afeta negativamente o metabolismo do ferro em apenas alguns tecidos.

Como a desregulação do ferro é vista, cada vez mais, como um importante fator na etiologia da Doença de Alzheimer e como foi comprovado que IRP2 é a principal proteína reguladora da homeostasia do ferro nas células neuronais, tem sido sugerido que polimorfismos no gene *IREB2*, localizado no cromossomo 15q25.1 que codifica esta proteína, possam desempenhar importante papel nesta doença. A análise das seqüências de DNA deste gene (amostras *post-mortem* - 50 AD e 50 controles) revelou 14 polimorfismos dos quais dois apresentaram maior distribuição alélica e genotípica estatisticamente significativa entre os pacientes com AD em relação aos controles. Além disso, a deleção deste gene em camundongos resulta em doença neurodegenerativa devido a uma desregulação da homeostasia do ferro e já foi constatada também uma distribuição significativamente diferente de IRP2 nos cérebros afetados pela Doença de Alzheimer quando comparados com cérebros normais (Coon *et al.*, 2006).

Desde sua descoberta, tem sido sugerido que as IRPs sejam reguladores chave de muitos aspectos da homeostasia do ferro em eucariotos superiores (Eisenstein & Blemings, 1998).

#### **1.2.1.4 FERRITINA**

A Ferritina é uma proteína antiga evolutivamente presente em virtualmente todas as células animais e com homólogos fortemente relacionados presentes em plantas, bactérias e arqueobactérias (Theil, 2007; Schenck & Zimmerman, 2004). A Ferritina de mamíferos é uma proteína composta por 24 monômeros de duas subunidades: H-ferritina (cadeia pesada) e L-

ferritina (cadeia leve) (Schenck & Zimmerman, 2004; Ferreira *et al.*, 2000). As subunidades formam este agregado no citosol resultando em uma molécula de aproximadamente 450 kDa (Connor *et al.*, 2001; Santamaria *et al.*, 2006). Essas subunidades trabalham em conjunto para seqüestrar ferro não existindo redundância entre as funções desempenhadas por ambas (Ferreira *et al.*, 2000). A subunidade L-ferritina, tipo animal-específico (Hintze & Theil, 2005), tem um peso molecular de 19 kDa e é necessária para o armazenamento de ferro a longo prazo (Levi *et al.*, 1994). A subunidade H-ferritina tem um peso molecular de 21 kDa e apresenta atividade de ferroxidase (Lawson *et al.*, 1989), oxidando  $Fe^{+2}$  em  $Fe^{+3}$ . Através dessa atividade de ferroxidase, H-ferritina é capaz de limitar a formação de espécies reativas de oxigênio. Na forma ideal de funcionamento, H-ferritina está presente para converter  $Fe^{+2}$  em  $Fe^{+3}$  e L-ferritina está disponível para seqüestrar a forma  $Fe^{+3}$  e armazená-la (Ill, A. M., *et al.*, 2006). A concentração relativa dos componentes H- e L-ferritina varia entre os órgãos e parece ter significado funcional (Schenck & Zimmerman, 2004); a taxa de subunidades protéicas H:L é usualmente estável, exceto durante a sobrecarga crônica de ferro (Hintze & Theil, 2005).

Além de funções distintas, essas isoformas apresentam localização heterogênea no organismo. A H-ferritina é encontrada em altas concentrações especialmente no coração enquanto L-ferritina é elevada no baço e no fígado. Além disso, essa distribuição heterogênea de ferritinas é encontrada no cérebro e também ocorre a nível celular. Estudos prévios têm demonstrado que neurônios contêm predominantemente H-ferritina, microglia contem L-ferritina e oligodendrócitos expressam uma mistura de H- e L-ferritina (Connor *et al.*, 1994, 2001).

Camundongos deficientes em H-ferritina foram desenvolvidos para servir como modelo de desregulação de ferro *in vivo*. H-ferritina foi o alvo de deleção porque é seletivamente expressa em neurônios (Connor *et al.*, 1994), e sua super-expressão fornece proteção em

modelos neurotóxicos de Doença de Parkinson (Kaur *et al.*, 2003). Além disso, o decréscimo na proporção de ferritina relativa ao ferro no cérebro destes modelos mimetiza a taxa ferro/ferritina encontrada em cérebros de pessoas com Doença de Alzheimer e Parkinson (Connor *et al.*, 1995). Camundongos homozigóticos para o gene mutado de H-ferritina morrem *in utero* (Ferreira *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2003). Entretanto, heterozigotos para este gene mutado são viáveis e expressam 83% menos H-ferritina nos seus cérebros do que nos cérebros dos animais com este gene do tipo selvagem, mas apresentam níveis normais de ferro (Thompson *et al.*, 2003). Thompson e colaboradores (2003) encontraram evidências de estresse oxidativo em neurônios no cérebro de camundongos heterozigotos. A atividade do alelo do tipo selvagem remanescente não é super-regulada nos heterozigotos (Ferreira *et al.*, 2000), e estes animais apresentam níveis aumentados de L-ferritina e transferrina quando comparados com os camundongos tipo selvagem (Thompson *et al.*, 2003).

Focht e colaboradores em 1997 dosaram os níveis de ferro e ferritina em nove regiões do cérebro de ratos jovens e velhos. Observaram que nenhuma região apresentou concentração aumentada de ferro relacionada com a idade sem apresentar também concentração aumentada de ferritina, indicando que o ferro adicional estava sendo seqüestrado adequadamente. Conseqüentemente, a quantidade de ferro disponível para induzir formação de radicais livres estava sendo limitada (Focht *et al.*, 1997). A partir destes dados e de estudos sobre ferro/ferritina em tecidos cerebrais humanos, conclui-se que o ferro cerebral normalmente aumenta com a idade e a ferritina aumenta de maneira compensatória. Quando esse processo ocorre, existe um estresse oxidativo limitado. Em doenças como Parkinson e Alzheimer, o ferro acumula e a ferritina não aumenta proporcionalmente. Conseqüentemente, mais ferro está disponível para concluir a formação de radicais livres, levando ao estresse oxidativo (Focht *et al.*, 1997; Connor *et al.*, 2001).

### 1.2.1.5 RECEPTOR DE TRANSFERRINA (TfR)

O TfR humano é uma glicoproteína transmembrana formada por duas subunidades de 90-kDa ligadas por pontes dissulfeto. Cada subunidade se liga a uma molécula de Tf (Moos & Morgan, 2000).

A ligação entre Tf e seu receptor é reversível, pH-dependente e influenciada pela concentração de ferro da Tf. Em pH extracelular fisiológico, o TfR apresenta uma afinidade mais baixa pela Tf monomérica (com um átomo de Fe ligada) do que pela Tf diférrica (com dois átomos de Fe ligadas) e afinidade menor ainda pela apo-Tf (sem Ferro) (Moos & Morgan, 2000).

A função do TfR é mediar a captura celular de Fe ligado a Tf. A internalização celular da Tf pelo TfR é bem caracterizada e a ampla expressão deste receptor sugere que a maioria das células adquira ferro via endocitose mediada por este receptor (Robb & Wessling-Resnick, 2004). Com a formação de endossomos e acidificação para um pH de 5,5-6,5 devido a função de uma ATPase-H<sup>+</sup> endossomal, o Fe é então liberado da Tf e transportado através da membrana endossomal para o citosol. A apo-Tf permanece ligada ao TfR e é reciclada para membrana celular por exocitose. Em um pH extracelular, a apo-Tf apresenta baixa afinidade pelo TfR sendo liberada no meio extracelular para ser substituída por uma Tf com Fe, e para que o ciclo seja repetido. A Tf não é degradada neste processo (Moos & Morgan, 2000).

O grau de expressão do TfR, na maioria dos tipos celulares, é determinado pelo nível de Fe presente e pela sua taxa de proliferação (Kühn *et al.*, 1990; Harford *et al.*, 1994). A síntese do receptor é estimulada pela deficiência de Fe e inibida pelo aumento de Fe disponível (Moos & Morgan, 2000). A modulação dos níveis de TfR ocorre através de regulação transcricional e pós-transcricional (Robb & Wessling-Resnick, 2004). A regulação pós-transcricional envolve a interação de proteínas citosólicas (IRPs) com a região 3' UTR do RNAm do TfR. Essa interação inibe a degradação do RNAm, aumentando a concentração do mesmo e,

conseqüentemente, a síntese do TfR. A falta de Fe leva a um aumento na concentração das IRPs e uma sobrecarga, a uma diminuição na concentração das mesmas (Moos & Morgan, 2000). Muitos estudos têm caracterizado a interação das proteínas de resposta ao ferro (IRPs) com os transcritos que apresentam IRE para revelar o padrão altamente coordenado de regulação para fatores envolvidos no metabolismo do ferro, incluindo TfR e a proteína de armazenamento de ferro, ferritina. O conhecimento a respeito do controle transcricional é menor, mas sob condições de deficiência de ferro, como na hipóxia, sabe-se que a síntese de RNAm de TfR aumenta (Robb & Wessling-Resnick, 2004).

Tong e colaboradores em 2002 examinaram se controles de expressão, além do realizado pela interação IRE-IRPs, poderiam ocorrer investigando a regulação do TfR na ausência da sua IRE através da clonagem do cDNA de TfR 3' UTR truncado em um plasmídeo e sua expressão em células sem TfR endógeno. Os níveis de TfR, tanto na superfície quanto na célula toda, aumentaram significativamente depois das células transfectadas terem sido tratadas com o quelante de ferro, desferrioxamina (DFO) quando comparadas com as células controle. Portanto, concluíram que a expressão do TfR nas células colocadas em um meio deficiente em ferro pode aumentar através de um mecanismo que não depende da IRE do RNAm de TfR.

A distribuição do TfR no cérebro é heterogênea e apresenta pouca relação com a do Fe, mas vem sendo relacionada à distribuição de receptores de neuropeptídeos (Hill *et al.*, 1985) e com atividade de citocromo oxidase (Morris *et al.*, 1992). Dentro das células do cérebro, o TfR tem sido identificado nas células endoteliais dos capilares (Jefferies *et al.*, 1984; Risau *et al.*, 1986; Oh *et al.*, 1986; Pardridge *et al.*, 1987; Kalaria *et al.*, 1992), nas células epiteliais do plexo coróide (Giometto *et al.*, 1990) e nos neurônios (Jefferies *et al.*, 1984; Markelonis *et al.*, 1985; Oh *et al.*, 1986; Giometto *et al.*, 1990; Moos, 1995a, b; Broadwell *et al.*, 1996). Nas células da glia, o TfR vem sendo detectado na microglia amebóide (Kaur & Ling,

1995), nos astrócitos (Orita *et al.*, 1990) e em culturas de oligodendrócitos (Espinosa & Foucaud, 1987), mas não foi detectado em oligodendrócitos *in vivo* (Moos 1995a, b; Broadwell *et al.*, 1996).

A expressão de TfR nas células do cérebro é alterada de acordo com o estágio de desenvolvimento e com a concentração de ferro. Nas células endoteliais dos capilares o maior número de TfR é detectado no momento de maior crescimento cerebral e de replicação das células endoteliais (do 10° ao 20° dia em ratos) e também aumenta sob condições de deficiência de ferro (Taylor & Morgan, 1990; Taylor *et al.*, 1991). Em neurônios, a deficiência de Fe também aumenta a expressão de TFR, mas nessas células o número de TfR é mais baixo no nascimento e no período pós-natal, e aumenta após os 20 dias de idade (Moos & Morgan, 2000).

O mecanismo de regulação dos níveis de transferrina (Tf) e receptor de transferrina (TfR) no cérebro de rato pela concentração de ferro na dieta ainda não foi completamente elucidado. Han e colaboradores em 2003 examinaram as concentrações de Tf e TfR e seus respectivos RNAm em várias regiões do cérebro afetadas pela dieta deficiente em ferro e analisaram as relações entre a concentração, tanto de proteínas quanto de RNAm, nos cérebros dos animais controle e dos que receberam a dieta. A dieta deficiente em ferro diminuiu significativamente a concentração de ferro no cérebro e aumentou os níveis de Tf e TfR no tálamo e córtex. A concentração de RNAm de Tf diminuiu na maioria das regiões do cérebro demonstrando correlação inversa da Tf e seu RNAm em resposta a deficiência de ferro. Os níveis de RNAm de TfR não foram afetados pela concentração de ferro. O corpo caloso, a substância branca do cerebelo e os ventrículos laterais expressaram os níveis mais altos de RNAm de Tf, enquanto, nessas regiões, foram encontrados os níveis mais baixos de RNAm de TfR, sendo os mais altos encontrados no córtex, hipocampo e substância cinzenta do cerebelo. Esses dados demonstram que as células do cérebro apresentam uma capacidade

de manter níveis mínimos de ferro durante a deficiência deste metal. Essa capacidade pode estar associada com o aumento da captura do complexo Fe-Tf do plasma, estabilização do RNAm de TfR ou aumento da eficiência de tradução do RNAm de Tf em tipos específicos de células dentro do cérebro.

#### **1.2.1.6 HEPICIDINA**

A hepcidina foi descrita pela primeira vez como um peptídeo hepático antibacteriano presente na urina de humanos por Park et al 2001. Apesar de predominantemente expressa pelo fígado, onde é sintetizada e liberada na corrente sanguínea, a hepcidina também foi detectada em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (Zechel, et al, 2006). Dados de estudos recentes têm demonstrado que a hepcidina desempenha papel essencial na manutenção da homeostasia do ferro fora do SNC (Nemeth *et al.*, 2006), mas sua ampla distribuição no cérebro (Clardy *et al.*, 2006; Zechel *et al.*, 2006; Wang, et al, 2008) sugere que a mesma também tenha participação no controle do metabolismo do ferro dentro do SNC (Wang, et al, 2008).

A função da hepcidina é regular a concentração de ferro extracelular inibindo a absorção intestinal de ferro e a liberação deste metal dos macrófagos (Park *et al.*, 2001; Ganz, 2004). A hepcidina controla a concentração plasmática e a distribuição de ferro nos tecidos se ligando à ferroportina, única proteína exportadora de ferro conhecida, causando a internalização e subsequente degradação da mesma (Nemeth *et al.*, 2004). O modelo da hepcidina propõe que a taxa de efluxo de ferro para o plasma depende principalmente do nível de hepcidina; quando os níveis de ferro são altos, a síntese de hepcidina aumenta e a liberação de ferro dos enterócitos e macrófagos diminui. Por outro lado, quando a concentração de ferro cai, a síntese de hepcidina diminui e as células liberam mais ferro (Rossi, 2005).

Pigeon e colaboradores (2001) compararam os níveis de RNAm de hepcidina no fígado de camundongos controles, tratados com ferro carbonil, ou com ferro dextran e animais *knockout* para  $\beta_2$ -microglobulina, que apresentam sobrecarga de ferro espontaneamente. Como foi induzida a expressão de RNAm de hepcidina no fígado de todos os diferentes modelos de sobrecarga de ferro analisados, os autores concluíram que o excesso de ferro no fígado foi o responsável por esta super-regulação. Além disso, animais alimentados com baixa concentração de ferro na dieta, apresentaram uma diminuição na expressão de RNAm de hepcidina, mostrando que enquanto a sobrecarga de ferro induz uma superexpressão de RNAm de hepcidina no fígado a falta de ferro leva a um decréscimo da mesma.

Além de controlar a concentração de ferro extracelular, este hormônio aumenta durante infecções e inflamações (Ganz, 2006) diminuindo os níveis de ferro no soro provavelmente como um mecanismo de defesa limitando a quantidade de ferro disponível ao micro-organismo invasor (Andrews, 2004). Wang e colaboradores (2008) demonstraram que a administração de lipopolissacarídeo (LPS) pode regular a expressão de mRNA de hepcidina e da proteína em órgãos periféricos, como o fígado, e também no cérebro, induzindo um aumento da mesma no córtex e substância negra, mas não no hipocampo e estriado, indicando uma regulação região específica.

Os mecanismos moleculares da atividade da hepcidina, seu mecanismo de regulação e a sua ligação com outras proteínas reguladoras do ferro no SNC ainda não são conhecidos. Visto que a hepcidina é um importante regulador da homeostasia do ferro, presume-se que esteja envolvida no processo de homeostasia do ferro no SNC também, mas a exata função fisiológica desta proteína no cérebro ainda precisa ser elucidada (Zechel *et al.*, 2006).

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1. OBJETIVO GERAL**

Analisar a expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo do ferro em regiões do cérebro de ratos jovens, adultos e velhos tratados com ferro no período neonatal e de animais controles.

### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar a transcrição dos genes que codificam para: Ceruloplasmina, DMT1, IRPs, Ferritina, Receptor de Transferrina e Hepcidina no hipocampo, córtex e estriado de animais jovens tratados com ferro no período neonatal e de animais controles.

Analisar a transcrição dos genes que codificam para: Ceruloplasmina, DMT1, IRP, Ferritina, Receptor de Transferrina e Hepcidina no hipocampo, córtex e estriado de animais adultos tratados com ferro no período neonatal e de animais controles.

Analisar a transcrição dos genes que codificam para: Ceruloplasmina, DMT1, IRP, Ferritina, Receptor de Transferrina e Hepcidina no hipocampo, córtex e estriado de animais velhos tratados com ferro no período neonatal e de animais controles.

Comparar os níveis dos RNAm das proteínas citadas anteriormente encontrados nessas regiões específicas dos cérebros dos animais jovens, adultos e velhos tratados e não tratados com ferro no período neonatal.

## **CAPÍTULO 2**

**Artigo científico aceito pela revista *Neurochemical Research***

## mRNA Expression of Proteins Involved in Iron Homeostasis in Brain Regions is Altered by Age and by Iron Overloading in the Neonatal Period

Arethusa S. Dornelles · Vanessa A. Garcia · Maria N. M. de Lima · Gustavo Vedana · Luisa A. Alcalde · Maurício R. Bogo · Nadja Schröder

Accepted: 14 November 2009  
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

**Abstract** Abnormally high levels of iron are observed in the brain of patients suffering from neurodegenerative disorders. The mechanisms involved in iron accumulation in neurodegenerative disorders remain poorly understood. In the present study we investigated the effects of aging and neonatal iron overload on the mRNA expression of proteins critically involved in controlling iron homeostasis. Wistar rat pups received a single daily dose of vehicle or iron (10 mg/kg of b.w. of  $\text{Fe}^{2+}$ ), at postnatal days 12–14. The expression of Transferrin Receptor (TfR), H-Ferritin, and IRP2 were analyzed by a semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in cortex, hippocampus and striatum of rats sacrificed at three different ages (15-day-old; 90-day-old and 2-year old rats). Results indicate that TfR, H-ferritin, and IRP2 mRNA expression was differentially affected by aging and by neonatal iron treatment in all three brain regions. These

findings might have implications for the understanding of iron homeostasis misregulation associated with neurodegenerative disorders.

**Keywords** Iron · Ferritin · Transferrin receptor · Iron regulatory protein · Aging · Neurodegenerative disorders

### Introduction

Iron is an essential metal for the central nervous system (CNS) [1]. Many processes in normal CNS development, including oxidative respiration, myelination of axons, and neurotransmitter synthesis require iron [2, 3]. The biological functions of iron are based on its favorable redox potential, which allows this metal to undergo interconversion between the divalent cationic or ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ) and trivalent cationic or ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) states [4]. The ability to donate and accept electrons in these reactions not only contributes to iron's critical role in physiological processes, but can also lead to significant oxidative damage via free radical production within the brain when excess iron is present [5]. Increased levels of iron have been reported in normal brain aging in rats [6, 7] and in human subjects [8]. Moreover, abnormally high levels of iron are also observed in the brain of patients with Alzheimer's disease [9, 10], Parkinson's disease [11, 12] and other neurodegenerative disorders [1]. However, it is not completely understood why iron accumulates in the brain in these conditions [13].

The use of animal models has greatly increased our understanding of the iron regulation mechanisms and the pathogenesis of neurodegenerative disorders related to iron deposition in the brain [14, 15]. In previous reports we have demonstrated that iron supplementation in the

A. S. Dornelles · V. A. Garcia · M. N. M. de Lima · G. Vedana · L. A. Alcalde · N. Schröder  
Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

M. R. Bogo  
Genomics and Molecular Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

M. R. Bogo · N. Schröder  
National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

N. Schröder (✉)  
Department of Physiological Sciences, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12C, Sala 340, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil  
e-mail: nadja.schröder@puers.br

neonatal period induces selective iron accumulation in brain regions, specifically in the basal ganglia, which was associated with long-term memory deficits in adult mice [16, 17] and rats [18–22]. Moreover, we have previously shown that iron administration in the neonatal period increases oxidative stress parameters in brain regions of adult rats [19]. Thus, over the years, we have been using this iron-overload animal model in order to investigate iron loading involvement with cognitive deficits associated with neurodegenerative disorders.

Acquisition of iron is an essential process in which many proteins participate to ensure that iron uptake is sufficient and appropriate to the needs of cells and organisms. Moreover, the proteins involved in transport and sequestration of iron must bind iron in forms that prevent it from reacting with oxygen species to generate free radicals [23]. The exact number of proteins involved in mammalian iron metabolism is unknown. However, over the years many important iron metabolism proteins have been cloned and characterized and much is understood about how their expression is integrated to maintain homeostasis [24].

To get to the brain, dietary iron makes a pathway that begins in the intestines where ferrous ( $\text{Fe}^{+2}$ ) is reduced by duodenal cytochrome b to ferric ( $\text{Fe}^{+3}$ ). The divalent metal transporter (DMT1) can carry iron across the duodenal epithelium into the blood, just in this reduced form. In the blood,  $\text{Fe}^{+2}$  is oxidized to  $\text{Fe}^{+3}$  by ceruloplasmin (CP) because in this oxidized form, it can be coupled with transferrin (Tf), a protein that is the main serum iron carrier [25–27]. The transport of iron from the blood into the brain occurs via a receptor-mediated uptake of iron-transferrin at the blood brain barrier (BBB). Transferrin receptors (TfR) on brain endothelial cells bind iron circulating in the form of iron-transferrin and this complex enters the brain by endocytosis [27]. The amount of iron taken up and stored by the cells is regulated for the abundance of the transferrin and transferrin receptor [28]. This can be controlled at the post-transcriptional level by iron regulatory proteins (IRPs) that interact with iron responsive elements (IRE) on RNA to alter the expression of ferritin, the main iron-storage protein, and transferrin receptors on brain endothelial cells, neurons, glia and oligodendrocytes [26, 28].

Studies from the early 1990s have demonstrated that the neonatal period is critical for the establishment of iron content in the adult brain. Accordingly, the uptake of transferrin and iron by the brain was investigated in rats using  $^{125}\text{I}$ - $^{59}\text{Fe}$ -transferrin (Tf). Measurements revealed that the rate of iron uptake by the brain increased rapidly over the first 15 days of life, peaking at 15 days and thereafter declining. The turnover of  $^{59}\text{Fe}$  in the brain was also determined by measuring radioactivity in the brain of 15-day rats at various times after injection from 15 min to

13 days. The amount of  $^{59}\text{Fe}$  in the brain increased over the first 4 h and thereafter remained constant [29]. In another study, by Dwork and coworkers [30], rats were intraperitoneally injected with  $^{59}\text{Fe}$ , and sacrificed at various intervals. Results have demonstrated that cerebral levels of  $^{59}\text{Fe}$  in animals injected at age 15 days did not change with postinjection interval despite rapidly decreasing serum levels of  $^{59}\text{Fe}$ . The authors of the study concluded that iron acquired by the brain early in postnatal development becomes sequestered in that organ. Therefore, we based our animal model on iron administration during this critical neonatal period.

The mechanisms that regulate iron uptake, storage and distribution resulting in selective accumulation of this metal in brain regions in neurodegenerative disorders remain poorly understood. Thus, the present study aims to investigate the effects of aging and iron overload on the mRNA expression of proteins critically involved in controlling iron homeostasis.

## Experimental Procedure

### Animals

Pregnant Wistar rats were obtained from Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em saúde, Porto Alegre, RS, Brazil. After birth, each litter was adjusted within 48 h to contain eight rat pups. Each pup was maintained together with its respective mother in a plastic cage in a room at temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  and a 12 h light/dark cycle. At the age of 4 weeks the pups were weaned and the males were selected and raised in groups of three to five rats. At postnatal treatment, the animals were supplied with standardized pellet food and tap water ad libitum. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23 revised 1996) and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Pontifical Catholic University (053/08-CEUA).

### Neonatal Iron Treatment

The neonatal iron treatment has been described in detail elsewhere (18,19,20,21,22). Briefly, 12-day-old rat pups received orally a single daily dose (10 ml/kg solution volume) of vehicle (5% sorbitol in water) (control group) or 10 mg/kg of body weight of  $\text{Fe}^{2+}$  (Ferromyn<sup>®</sup>, AB Hässle, Göteborg, Sweden) via a metallic gastric tube, over 3 days (postnatal days 12–14). In this model, iron is given orally during the period of maximal iron uptake by the brain, so that the model correlates with dietary iron supplementation to infants.

## Experimental Groups

Twelve rat pups received vehicle, and twelve rat pups received a single oral daily dose of 10.0 mg/kg of body weight of  $\text{Fe}^{2+}$ . Vehicle-treated and iron-treated rats were euthanized by decapitation at one of the following ages: young (24 h after the treatments, i.e., 15 days-old,  $n = 4$  per group), adult (90 days-old,  $n = 4$  per group) or aged (2 years-old,  $n = 4$  per group). Cortex, hippocampus and striatum were quickly dissected and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for RT-PCR assays.

## Chemicals

TRIzol reagent, SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System for reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) kit, and Taq DNA polymerase were purchased from Invitrogen.

## Analysis of Gene Expression by Semi-Quantitative RT-PCR

The expression analysis of TfR, H-Ferritin, and IRP2 was carried out by a semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Cerebral cortex, hippocampus and striatum from rats with 15 days, 90 days or 2 years of age were isolated for total RNA extraction with TRIzol reagent in accordance with the manufacturer instructions. The cDNA species were synthesized with SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR from 2  $\mu\text{g}$  of total RNA and oligo (dT) primer in accordance with the suppliers. RT reactions were performed for 50 min at  $50^\circ\text{C}$ . cDNA (1  $\mu\text{l}$ ) was used as a template for PCR with the specific primers which were designed using the program Oligos 9.6.  $\beta$ -actin-PCR was performed as an internal standard. The following set of primers were used: for TfR: forward 5'-ACC AAA TGG TTC GTA CAG CAG CAG AGG-3'; and reverse 5'-GAG GGT GTG AGA GCC AGA GCC CCA G-3'; for ferritin: forward 5'-ACC GCG TCT CCC TCG CAA GTG C-3'; and reverse 5'-ATG CCA GAT TCA GGG GCT CCC ATC-3'; for IRP: forward 5'-ACT ACA GAC CAC ATA TCA CCT GCT GGA AGC-3'; and reverse 5'-AAT GAT AAA GAA AAT ACT TCT CTG CCG GAG-3'; for  $\beta$ -actin: forward 5'-TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG-3'; and reverse 5'-TAC TCC TGC TTC CTG ATC CAC AT-3' [29]. PCR reactions were performed (total volume of 25  $\mu\text{l}$ ) using a concentration of 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer indicated below and 200  $\mu\text{M}$  and 1 U Taq polymerase in the supplied reaction buffer. RT-PCR were optimized in order to determine the number of cycles that would allow product detection within the linear phase of mRNA transcripts amplification. Conditions for all reactions were as follows:

initial 1 min denaturation step at  $94^\circ\text{C}$ , 1 min at  $94^\circ\text{C}$ , 1 min annealing step at  $62^\circ\text{C}$ , 1 min extension step at  $72^\circ\text{C}$  for 30 cycles and a final 10 min extension at  $72^\circ\text{C}$ . Conditions for  $\beta$ -actin PCR were as follows: initial 1 min denaturation step at  $94^\circ\text{C}$ , 1 min at  $94^\circ\text{C}$ , 1 min annealing step at  $58.5^\circ\text{C}$ , 1 min extension step at  $72^\circ\text{C}$  for 34 cycles and a final 10 min extension at  $72^\circ\text{C}$  (adapted from 31).

The amplification products were: TfR 377 bp; H-Ferritin 491 bp; IRP2 491 bp;  $\beta$ -actin 210 bp [31]. The fragment length of PCR reactions was confirmed with Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, USA). PCR products were submitted to electrophoresis using a 1% agarose gel and the relative abundance of mRNA versus  $\beta$ -actin was determined by densitometry using freeware ImageJ 1.37 for Windows [32].

## Statistical Analysis

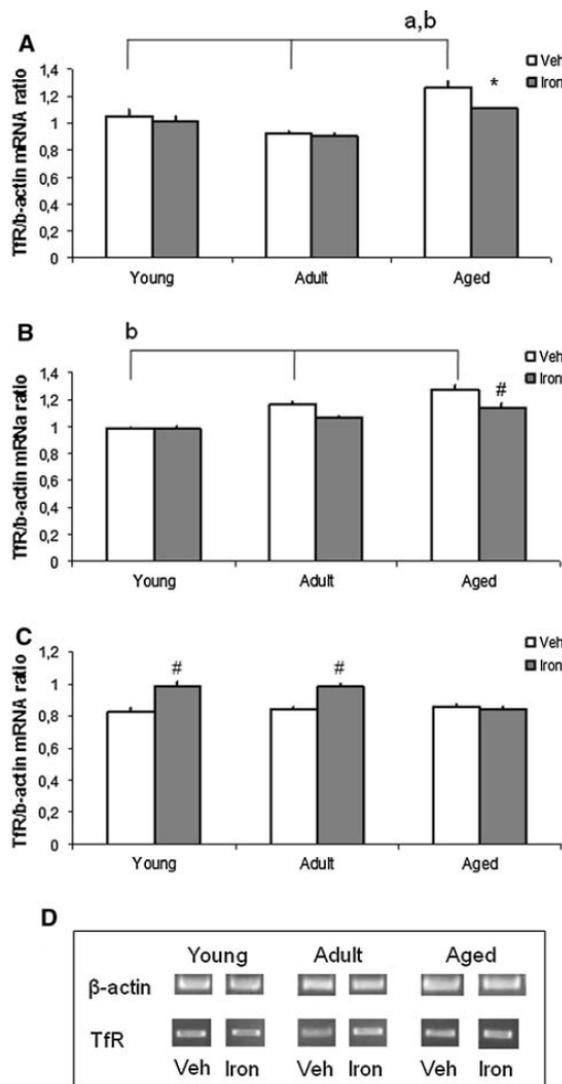
The results were analyzed using SPSS software by one-way analysis of variance (ANOVA). Main effects were further analyzed by multiple comparisons of means using Tukey HSD Post-Hoc Tests. Statistical significance was attributed as  $P < 0.05$ .

## Results

### TfR

An age-related increase in TfR mRNA expression was observed in both the cortex ( $F_{(5,18)} = 15.29$ ,  $P < 0.001$ ) and hippocampus ( $F_{(5,18)} = 24.70$ ,  $P < 0.001$ ). Further analysis using Tukey post-hoc tests showed that, in the cortex, aged animals showed significantly higher TfR expression compared to either young or adult rats ( $P = 0.004$  and  $P = 0.015$  respectively, Fig. 1a), whereas in the hippocampus, young rats given vehicle showed a significantly lower level of TfR mRNA when compared with either adult or aged rats treated with vehicle (both  $P_s < 0.0001$ , Fig. 1b). In the striatum, analysis with ANOVA revealed a significant difference among groups ( $F_{(5,17)} = 16.01$ ,  $P < 0.001$ ). However, no significant age-related differences in TfR mRNA levels were observed (comparison between young and adult control rats,  $P = 0.99$ ; comparison between young and aged control rats,  $P = 0.87$ ; comparison between adult and aged control rats,  $P = 1.00$ , Fig. 1c). These results suggest that aging is associated with an increase in TfR expression in the cortex, but not in hippocampus and striatum.

Neonatal iron administration produced a significant decrease in TfR mRNA levels in both the cortex (Fig. 1a) and hippocampus (Fig. 1b) in aged rats ( $P = 0.038$  and  $P = 0.007$ , respectively). Iron did not affect TfR mRNA



**Fig. 1** Effect of neonatal treatment with vehicle (white bars) or iron (dark bars) on transferrin receptor (TfR) transcripts in cortex (a), hippocampus (b) and striatum (c) of young, adult and aged rats. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel, using  $\beta$ -actin as constitutive gene. The figure D shows a representative gel and the TfR/ $\beta$ -actin mRNA ratio (expressed as arbitrary units) obtained by optical densitometry analysis of three independent experiments, with entirely consistent results, from striatum. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey HSD Post-Hoc Tests. Statistical significance is indicated by letters (a, for  $P < 0.05$  and b, for  $P < 0.01$ ) for comparisons between vehicle-treated (control) groups at different age points. \* ( $P < 0.05$ ) and # ( $P < 0.01$ ) indicate statistically significant differences between control groups and iron-treated groups within each age point

expression in the hippocampus or cortex of young rats ( $P = 1.00$  and  $P = 0.94$  respectively compared to age-matched controls) or in the cortex of adult rats ( $P = 1.00$

compared to age-matched controls). The decrease in TfR expression observed in the hippocampus of iron-treated adult rats fell just short of significance compared to age-matched animals given vehicle ( $P = 0.07$ ). In the striatum, either young or adult rats given iron showed a significant increase in TfR mRNA levels ( $P_s < 0.001$ , Fig. 1c). The results indicate that neonatal iron loading produces a differential effect on TfR expression, depending on the brain structure and age.

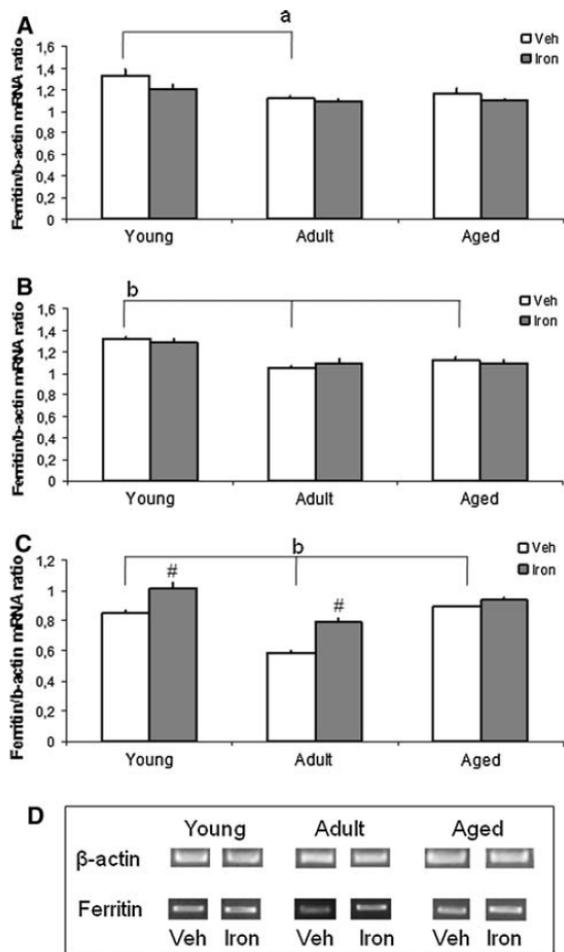
### H-Ferritin

ANOVA comparisons showed significant differences among groups in H-Ferritin mRNA levels in the cortex ( $F_{(5,18)} = 4.61, P = 0.007$ ), hippocampus ( $F_{(5,18)} = 12.30, P < 0.001$ ), and striatum ( $F_{(5,17)} = 35.17, P < 0.001$ ). Tukey tests showed age-related decreases in H-Ferritin mRNA expression in all three brain regions. In the cortex, H-Ferritin mRNA was significantly decreased in adult control rats compared to young control rats ( $P = 0.02$ , Fig. 2a), whereas there was a trend towards a significant difference between young and aged rats ( $P = 0.09$ ). H-Ferritin mRNA levels were significantly decreased in both adult and aged control rats compared to young control rats in the hippocampus ( $P = 0.001$  and  $P = 0.003$  respectively, Fig. 2b). In the striatum, adult rats showed lower H-Ferritin levels compared to either young or aged animals (both  $P_s < 0.001$ , Fig. 2c). The results suggest that H-Ferritin levels vary with age in the cortex, hippocampus and striatum.

Iron treatment did not affect H-Ferritin mRNA expression in the cortex (comparisons between control and iron-treated rats; young,  $P = 0.36$ , adult,  $P = 1.00$ , aged,  $P = 0.94$ ) or hippocampus (comparisons between control and iron-treated rats; young,  $P = 0.97$ , adult,  $P = 0.96$ , aged,  $P = 0.99$ ). In the striatum, iron treatment induced a significant increase in H-Ferritin mRNA levels in both young and adult rats ( $P = 0.003$  and  $P < 0.001$  respectively, Fig. 2c), but not in aged animals ( $P = 0.88$ ). The results indicate that iron loading is associated with an increase in striatal H-Ferritin expression in young and adult animals.

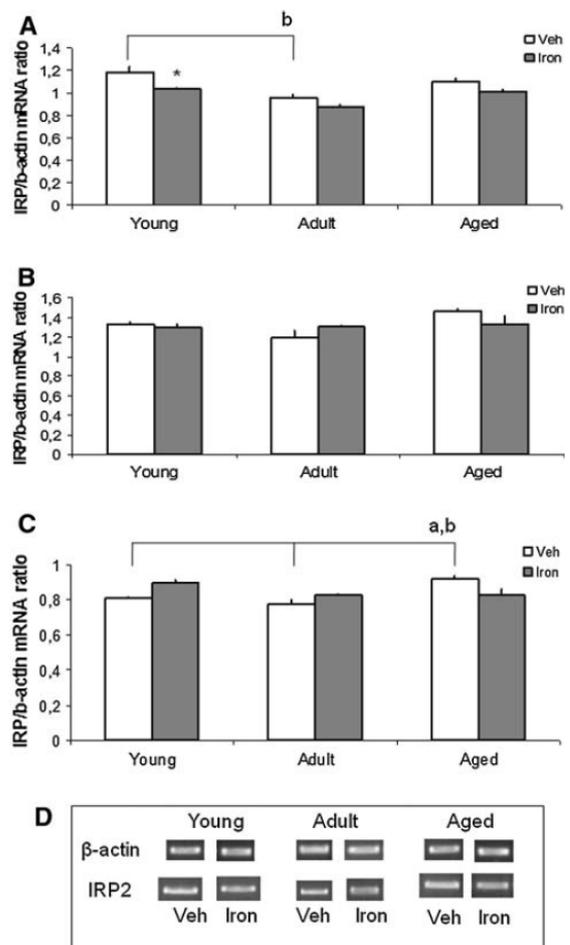
### IRP2

There were significant differences in IRP2 mRNA expression among groups in the cortex ( $F_{(5,18)} = 10.33, P < 0.001$ ) and striatum ( $F_{(5,17)} = 7.06, P = 0.001$ ), whereas in the hippocampus the ANOVA comparison fell short of significance ( $F_{(5,18)} = 2.64, P = 0.06$ ). Tukey tests showed that, in the cortex, IRP2 expression was significantly reduced in control adult animals when compared to young control animals ( $P = 0.001$ , Fig. 3a). In the striatum, aged control rats showed increased levels of IRP2 compared to either young or adult animals ( $P = 0.02$  and  $P = 0.001$  respectively, Fig. 3c).



**Fig. 2** Effect of neonatal treatment with vehicle (white bars) or iron (dark bars) on H-ferritin transcripts in cortex (a), hippocampus (b) and striatum (c) of young, adult and aged rats. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel, using  $\beta$ -actin as constitutive gene. The figure D shows a representative gel and the Ferr/ $\beta$ -actin mRNA ratio (expressed as arbitrary units) obtained by optical densitometry analysis of three independent experiments, with entirely consistent results, from striatum. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey HSD Post-Hoc Tests. Statistical significance is indicated by letters (a, for  $P < 0.05$  and b, for  $P < 0.01$ ) for comparisons between vehicle-treated (control) groups at different age points. \* ( $P < 0.05$ ) and # ( $P < 0.01$ ) indicate statistically significant differences between control groups and iron-treated groups within each age point

Iron treatment induced a decrease in IRP2 expression in the cortex in young ( $P = 0.04$  compared to age-matched controls, Fig. 3a), but not in adult or aged rats ( $P = 0.62$  and  $P = 0.45$  respectively compared to age-matched controls). Differences between control and iron-treated rats in IRP2 expression in the striatum did not reach statistical significance.



**Fig. 3** Effect of neonatal treatment with vehicle (white bars) or iron (dark bars) on IRP2 transcripts in cortex (a), hippocampus (b) and striatum (c) of young, adult and aged rats. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel, using  $\beta$ -actin as constitutive gene. The figure D shows a representative gel and the IRP2/ $\beta$ -actin mRNA ratio (expressed as arbitrary units) obtained by optical densitometry analysis of three independent experiments, with entirely consistent results, from cortex. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey HSD Post-Hoc Tests. Statistical significance is indicated by letters (a, for  $P < 0.05$  and b, for  $P < 0.01$ ) for comparisons between vehicle-treated (control) groups at different age points. \* ( $P < 0.05$ ) and # ( $P < 0.01$ ) indicate statistically significant differences between control groups and iron-treated groups within each age point

### Discussion

The observation that patients suffering from neurodegenerative disorders show increased brain iron content has raised the possibility that disturbances in brain iron homeostasis may be involved in the pathogenesis of these disorders. Given the importance of keeping a tight control

of cellular iron levels, a number of proteins have been described to play a role in iron uptake, storage, and export, as well as management of intracellular iron distribution [3]. Here we show that mRNA expression of proteins playing a critical role in iron homeostasis is differentially affected by age and iron loading in a critical period of development. In previous studies we have demonstrated that our 3-day iron administration regimen produces increased iron levels in brain regions in adult mice [16, 17] and rats [18]. Although in the present study we have not measured iron levels in brain regions, we used the same dose and time schedule of administration, known to induce iron accumulation in the brain.

Our findings suggest that aging induces an increase in TfR mRNA expression in the cortex, in control rats, and that iron loading in the neonatal period decreased TfR mRNA expression in cortex and hippocampus of aged rats, while producing an increase in the striatum of young and adult rats. It might be expected that iron loading would produce a decrease in TfR mRNA expression. However, a selective increase in TfR mRNA expression in the striatum was observed, likely being related to the differential brain iron distribution, with higher levels in the basal ganglia and related structures [6, 7, 9]. Additionally, we found an age-related decrease in H-ferritin mRNA expression in all three brain regions studied when comparing young to adult vehicle-treated animals, while iron treatment induced a significant increase in H-ferritin mRNA levels in both young and adult rats, but not in aged animals in the striatum. Again, a differential effect was found between cortico-hippocampal structures in relation to striatum. Higher iron levels would require an up-regulation of iron storage proteins such as ferritin, in order to protect against iron-induced oxidative stress. The present findings raise the possibility that the cortex and the hippocampus fail to adequately respond to iron loading, and may have implications to the memory deficits described in our animal model.

It has been extensively demonstrated that the expression of TfR and ferritin is coordinately and reciprocally controlled at the posttranscriptional level in response to the amount of iron [33–35]. The mRNAs encoding TfR and ferritin contain hairpin structures known as “iron responsive elements” (IREs) in their untranslated regions (UTRs) which are recognized by IRPs, cytoplasmatic iron regulatory proteins [26]. These proteins sense the iron concentration and modify the expression of TfR and ferritin by interacting with IREs according to the needs of each cell [28]. Ke and coworkers [28] showed that both TfR mRNA expression and protein level either significantly increased or decreased in hippocampus, cortex, striatum and substantia nigra of adult rats fed with low-iron or high-iron diet, respectively. By contrast, another study has shown that expression of TfR protein was affected by iron

deficiency, while TfR mRNA expression was not [36]. Another study [37] showed that rats assigned to an iron deficient diet for 6 weeks presented significantly reduced brain H-ferritin levels. On the other hand, supplemental dietary iron produced an increase in ferritin, particularly in the hippocampus. Rats submitted to dietary iron deficiency showed increased Tf protein levels while, a 20–50% decrease in Tf mRNA content in most brain regions demonstrating an inverse correlation of Tf and its mRNA in response to iron deficiency. TfR mRNA levels remained unaffected by iron status [38]. It is noteworthy that, in the referred studies, iron was supplemented to adult rats, in contrast to our study in which iron is administered in the neonatal period. It is possible that the well known iron regulatory system may not be completely developed in neonatal rats, accounting for the differences found among those studies and ours. In the present study, iron loading in the neonatal period was able to induce a region-specific decrease in TfR mRNA expression in cortex of aged rats, as well as significantly increase striatal H-ferritin mRNA levels in both young and adult rats. Interestingly, a 3-day regimen of iron administration in the neonatal period is able to induce long-term alterations in H-ferritin and TfR mRNA expression, as changes were observed in adult and 2-year old rats. Moreover, these changes were not accompanied by changes in IRP2 mRNA expression, raising the possibility that other regulatory mechanisms might be involved.

An age-related increase in TfR and decrease in H-ferritin mRNA expression was observed, which might be implicated, at least in part, with the increased iron levels observed in aged rats [6, 7]. An age-dependent increase in brain ferritin levels would be expected, as brain iron concentrations do increase with age, and it has been proposed that a failure to synthesize ferritin may result in age-related neurodegenerative disease.

IRP2 is regulated in response to iron and oxygen availability. It is synthesized under conditions of iron deficiency [28], continues stable in iron poor or hypoxic cells [39], and suffers proteasomal degradation in iron-rich and normoxic cells [40]. In spite of the high similarity displayed by IRP1 and IRP2 and the fact that both are ubiquitously expressed, it has been suggested that IRP2 dominates regulation of iron homeostasis [41]. Since IRP2 knockout produces severe misregulation of the target proteins of IRPs, IRP2 appears to be the protein responsible for the sensing and regulation of acute variations in cellular iron concentration. IRP2 knockout mice develop microcytic anemia and neurodegeneration associated with functional cellular iron depletion caused by low TfR and high ferritin expression observed in these animals [42]. Piñero et al. [43] reported that IRPs in rat brain are responsive to dietary iron changes in a manner that is consistent with

changes in TfR and ferritin. They found that IRP activity is altered in the brain subsequent to dietary iron deficiency and excess but these changes in binding activity are region specific; developmentally sensitive and the excess dietary iron had a limited effect on IRP binding activity in the brain. The changes in IRP binding activity in the brain regions analyzed were consistent with the changes in TfR, ferritin, transferrin and iron status found in the same brain regions.

In our study, IRP2 mRNA expression in the cortex was significantly reduced in control adult animals when compared to young control animals. In the striatum, aged control rats showed increased levels of IRP2 compared to either young or adult animals. To our knowledge there are no previous studies investigating IRP2 expression in aged rats. Here we show that aged rats express higher IRP2 mRNA than adult control rats. It is possible that these higher levels might contribute to the increase in iron levels observed with aging, but more studies will be required to understand these complex interactions. Also, it was observed that the neonatal iron treatment induced a transient decrease in IRP2 mRNA expression in the cortex in young rats, showing no long-term changes. A more precise conclusion on the regulatory mechanisms involved, would certainly require the investigation of IRP2 protein levels.

In summary, here we show age-related alterations in mRNA expression of proteins involved in iron homeostasis. Moreover, results indicate that an early intervention in iron status may produce long-term consequences to the mRNA expression of proteins related to iron regulation. Since the disruption of iron homeostasis in the brain may be critically implicated in the pathogenesis of age-associated neurodegenerative disorders, the present study may contribute to the comprehension of the complex mechanisms involved in iron accumulation observed in those diseases.

**Acknowledgments** A.S.D. is recipient of a CAPES fellowship. G.V. is supported by a PIBIC/CNPq fellowship. NS and MRB are CNPq research fellows.

## References

- Zhang P, Land W, Lee S et al (2005) Electron tomography of degenerating neurons in mice with abnormal regulation of iron metabolism. *J Struct Biol* 150:144–153
- van Gelder W, Huijskes-Heins MIE, Cleton-Soeteman MI et al (1998) Iron uptake in blood-brain barrier endothelial cells cultured in iron-depleted and iron-enriched media. *J Neurochem* 71:1134–1140
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117:285–297
- Papanikolaou G, Pantopoulos K (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 202:199–211
- Gaasch JA, Lockman PR, Geldenhuys WJ et al (2007) Brain iron toxicity: differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells. *Neurochem Res* 32:1196–1208
- Benkovic SA, Connor JR (1993) Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J Comp Neurol* 338:97–113
- Focht SJ, Snyder BS, Beard JL et al (1997) Regional distribution of iron, transferrin, ferritin, and oxidatively-modified proteins in young and aged fischer 344 rat brains. *Neuroscience* 79:255–261
- Bartzokis G, Tishler TA, Lu PH et al (2007) Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 28:414–423
- Connor JR, Menzies SL, Martin SM et al (1992) A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains. *J Neurosci Res* 31:75–83
- Smith MA, Harris PLR, Sayre LM et al (1997) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9866–9868
- Hirsch EC, Faucheux BA (1998) Iron metabolism and Parkinson's disease. *Mov Disord* 13:39–45
- Berg D, Gerlach M, Youdim MBH et al (2001) Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 79:225–236
- Chen Y, Qian ZM, Du J et al (2005) Iron loading inhibits ferroportin 1 expression in PC12 cells. *Neurochem Int* 47:507–513
- Anderson GJ, Powell LW (2000) Of metals, mice, and men: what animals models can teach us about body iron loading. *J Clin Invest* 105:1185–1186
- Grabill C, Silva AC, Smith SS et al (2003) MRI detection of ferritin iron overload and associated neuronal pathology in iron regulatory protein-2 knockout mice. *Brain Res* 971:95–106
- Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P et al (1999) Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 159:25–30
- Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P et al (2000) Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period. *Brain Res Dev Brain Res* 119:65–74
- Schröder N, Fredriksson A, Vianna MR et al (2001) Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav Brain Res* 24:77–85
- de Lima MN, Polydoro M, Laranja DC et al (2005) Recognition memory impairment and brain oxidative stress by postnatal iron administration. *Eur J Neurosci* 21:2521–2528
- de Lima MN, Laranja DC, Caldana F et al (2005) Selegiline protects against recognition memory impairments induced by neonatal iron treatment. *Exp Neurol* 196:177–183
- de Lima MN, Presti-Torres J, Caldana F et al (2007) Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 570:111–114
- de Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA et al (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
- Koppenol WH (1993) The centennial of the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 15:645–651
- Rouault TA (2001) Systemic iron metabolism: a review and implications for brain iron metabolism. *Pediatr Neurol* 25:130–137
- Floris G, Medda R, Padiglia A et al (2000) The physiopathological significance of ceruloplasmin. *Biochem Pharmacol* 60:1735–1741
- Pantopoulos K (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system. *Ann N Y Acad Sci* 1012:1–13
- Ponka P (2004) Hereditary causes of disturbed iron homeostasis in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1012:267–281

28. Ke Y, Qian ZM (2003) Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 2:246–253
29. Taylor EM, Morgan EH (1990) Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 55(1):35–42
30. Dwork AJ, Lawler G, Zybert PA et al (1990) An autoradiographic study of the uptake and distribution of iron by the brain of the young rat. *Brain Res* 518(1–2):31–39
31. Da Silva RS, Richetti SK, da Silveira VG et al (2007) Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *Int J Dev Neurosci* 26:339–343
32. Cognato GP, Czepielewski RS, Sarkis JF et al (2008) Expression mapping of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1–3 (E-NPP1–3) in different brain structures during rat development. *Int J Dev Neurosci* 26:593–598
33. Hentze MW, Kühn LC (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8175–8182
34. Rouault TA (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* 8:406–414
35. Cairo G, Recaldi S (2007) Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications. *Expert Rev Mol Med* 33:1–13
36. Moos T, Oates PS, Morgan EH (1998) Expression of the neuronal transferrin receptor is age dependent and susceptible to iron deficiency. *J Comp Neurol* 398:420–430
37. Han J, Day JR, Thomson K et al (2000) Iron deficiency alters H- and L-ferritin expression in rat brain. *Cell Mol Biol* 46:517–528
38. Han J, Day JR, Connor JR et al (2003) Gene expression of transferrin and transferrin receptor in brains of control vs. iron-deficient rats. *Nutr Neurosci* 6:1–10
39. Hanson ES, Foot LM, Leibold EA (1999) Hypoxia post-translationally activates iron-regulatory protein 2. *J Biol Chem* 274:5047–5052
40. Guo B, Phillips JD, Yu Y et al (1995) Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J Biol Chem* 270:21645–21651
41. Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Iwai K et al (2004) Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J* 23:386–395
42. Ghosh MC, Tong WH, Zhang D et al (2008) Tempol-mediated activation of latent iron regulatory protein activity prevents symptoms of neurodegenerative disease in IRP2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:12028–12033
43. Piñero DJ, Li N, Hu J et al (2001) The intracellular location of iron regulatory proteins is altered as a function of iron status in cell cultures and rat brain. *J Nutr* 131:2831–2836

## **CAPÍTULO 3**

**Artigo científico submetido a revista *Brain Research Bulletin***

## Research report

### Section

*Cellular and Molecular Neurobiology*

### Section Editor

Ian S. Zagon

### **Age and neonatal iron overload alter mRNA expression of DMT1 and ceruloplasmin in rat brain regions**

**Running title:** mRNA expression of DMT1 and Ceruloplasmin

**Arethusa S. Dornelles<sup>1</sup>, Vanessa A. Garcia<sup>1</sup>, Maria N. M. de Lima<sup>1</sup>, Gustavo Vedana<sup>1</sup>, Luisa A. Alcalde<sup>1</sup>, Maurício R. Bogo<sup>2,3</sup>, Nadja Schröder<sup>1,3\*</sup>**

<sup>1</sup>*Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>2</sup>*Genomics and Molecular Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>3</sup>*National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil*

\*Correspondence to: N. Schröder, Department of Physiological Sciences, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12C, Sala 340, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203545; fax: +55 51 33203612.

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

## **Abstract**

Systemic and cellular iron homeostasis is regulated by a series of proteins that control iron uptake, transport, storage and utilization. The neonatal period is critical for the establishment of iron content in the adult brain; also it is known that iron content increases in brain regions during the aging process. Over the years, iron accumulation in brain regions has been implicated with the pathogenesis of neurodegenerative disorders; however, the mechanisms involved in iron accumulation are poorly understood. In the present study we investigated the effects of aging and neonatal iron overload on the mRNA expression of proteins critically involved in controlling iron homeostasis, i.e. Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) and ceruloplasmin (CP). Wistar rat pups received a single daily dose of vehicle or iron (10 mg/kg of b.w. of  $\text{Fe}^{2+}$ ), at postnatal days 12-14. The mRNA expression of DMT1 and CP were analyzed by a semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in cortex, hippocampus and striatum obtained from rats sacrificed at three different ages (15-day-old; 90-day-old and 2-year old rats). Results indicate that DMT1 and CP mRNA expression is influenced by age in control rats. Moreover, the present results suggest that neonatal iron treatment differentially impacts DMT1 mRNA expression in the cortex and striatum of young rats; and CP mRNA expression in the cortex of young rats, and in the hippocampus of aged rats. These findings might have implications for the understanding of iron homeostasis' misregulation associated with neurodegenerative disorders.

**Key words:** iron – divalent metal transporter 1 – ceruloplasmin – aging – neurodegenerative disorders

## 1. Introduction

Iron is an important element for central nervous system (CNS) development and functioning, where it participates in many metabolic processes including myelination of axons, neurotransmitter synthesis [26; 39], oxygen transport, electron transport, and DNA synthesis [9]. As a transition metal, iron undergoes oxidation-reduction reactions ( $\text{Fe}^{+2}$ - $\text{Fe}^{+3}$ ), which allow it to take part in all these metabolic processes [14]. Although this ability contributes to iron's role in physiological processes, it can also lead to oxidative damage via free radical production in the brain when excessive iron is present [28]. Increased levels of iron have been reported in normal brain aging in rats [32; 33] and humans [10]. Iron accumulation has been detected in the brains of patients suffering from many forms of neurodegenerative disorders, including Parkinson's and Alzheimer's disease. It is increasingly recognized that changes in brain iron metabolism could be a pathogenic co-factor in these disorders [36; 41]. However, the reason to this characteristic accumulation remains unclear until now [40].

Systemic and cellular iron homeostasis is achieved through the controlled synthesis of several proteins involved in the transport, storage and utilization of iron [8] to guarantee that iron uptake meets the requirement for adequate cellular function and to prevent iron-induced free radical production [18]. The total number of proteins involved in mammalian iron metabolism remains unknown. However, many important iron metabolism proteins have been cloned and characterized over the last years and much is now understood about how their expression is integrated to maintain homeostasis [36].

The pathway that dietary iron takes to get into the brain begins in the intestines where  $\text{Fe}^{+3}$  is reduced by duodenal cytochrome b to  $\text{Fe}^{+2}$ . In this reduced form, the divalent metal transporter (DMT1) can carry iron across the duodenal epithelium into the blood [11; 17; 29]. In the brain, DMT1 mRNA and protein are found in many regions such as cortex, hippocampus, striatum and *substantia nigra* [42]. The cellular localization and functional characterization suggest that DMT1 can be expressed on the endosomal membrane, exporting iron from the endosome into the cytoplasm of the cell and on the plasma membrane [37].

In the blood,  $\text{Fe}^{+2}$  is oxidized to  $\text{Fe}^{+3}$  by ceruloplasmin (CP).  $\text{Fe}^{+3}$  is the only iron form that can be coupled to the iron transporter protein, transferrin [11; 17; 29]. So, CP plays an important role in

the movement of iron and display an effective antioxidant role, because of its ability to oxidize highly toxic ferrous iron to the relatively nontoxic ferric form and thus help prevent oxidative damage to proteins, lipids and DNA [15]. A secreted form of CP is expressed mainly by the hepatocytes, astrocytes, choroid plexus and Sertoli cells [34]. In addition, a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored form is expressed in the CNS by astrocytes [6]. CP is required for iron efflux from cells and the absence of this enzyme in humans leads to iron accumulation in the CNS and neurodegeneration [35]. However, it has been suggested that CP might also play a role in iron influx into neurons due to its ferroxidase activity [43].

In order to better understand the mechanisms regulating iron levels in the brain and their potential role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, many animal models have been used over the last years [7; 12; 30]. In previous reports we have demonstrated that iron supplementation in the neonatal period induces selective iron accumulation in brain regions in mice and rats, which was associated with long-term memory deficits in adulthood [1; 2; 22; 23; 24; 25; 27]. Moreover, we have previously reported that iron-overload in the neonatal period increases oxidative stress parameters in brain regions of adult rats [22]. Thus, we have used this animal model in order to investigate the involvement of iron in cognitive deficits associated with neurodegenerative disorders. Dwork and colleagues [3] intraperitoneally injected  $^{59}\text{Fe}$  in 15-day-old rat pups and sacrificed the animals at various intervals. The authors found that cerebral levels of  $^{59}\text{Fe}$  in these animals did not change in spite of the rapidly decreasing  $^{59}\text{Fe}$  serum levels observed. They concluded that, once acquired by the brain early in postnatal development, iron becomes sequestered in that organ. Hence, we based our animal model on iron administration during this critical neonatal period.

The mechanisms that regulate iron uptake, storage and distribution resulting in selective accumulation of this metal in brain regions in neurodegenerative disorders are not completely understood. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of age and iron overload in the neonatal period on the mRNA expression of DMT1 and CP in different brain regions.

## **2. Materials and Methods**

## *Animals*

Pregnant Wistar rats were obtained from the State Foundation for Health Research (FEPPS-RS, Porto Alegre, Brazil). After birth, each litter was adjusted within 48h to contain eight rat pups. Each pup was maintained together with its respective mother in an individually ventilated cage in a room at temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  and a 12h light/dark cycle. At the age of four weeks the pups were weaned and the males were selected and raised in groups of three to five rats. At postnatal treatment, the animals were supplied with standardized pellet food and tap water *ad libitum*. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23 revised 1996) and approved by the Ethics Committee of the Pontifical Catholic University (053/08-CEUA).

## *Neonatal iron treatment*

The neonatal iron treatment has been described in detail elsewhere [22; 23; 24; 25; 27]. Briefly, 12-day-old rat pups received orally a single daily dose (10 ml/kg solution volume) of vehicle (5% sorbitol in water) (control group) or 10 mg/kg of body weight of  $\text{Fe}^{2+}$  (Ferromyn®, AB Hässle, Göteborg, Sweden) via a metallic gastric tube, over three days (postnatal days 12-14). In this model, iron is given orally during the period of maximal iron uptake by the brain, so that the model correlates with dietary iron supplementation to infants.

## *Experimental groups*

Twelve rat pups received vehicle, and twelve rat pups received a single oral daily dose of 10.0 mg/kg of body weight of  $\text{Fe}^{2+}$ . Vehicle-treated and iron-treated rats were euthanized by decapitation at one of the following ages: young (24 hours after the treatments, i.e., 15 days-old, n = 4 per group), adult (90 days-old, n = 4 per group) or aged (two years-old, n = 4 per group). Cortex, hippocampus and striatum were quickly dissected and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for RT-PCR assays.

## *Chemicals*

Trizol reagent, SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) kit, and Taq DNA polymerase were purchased from Invitrogen.

## *Analysis of gene expression by semi-quantitative RT-PCR*

The expression analysis of CP and DMT1(+IRE) was carried out by a semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Cerebral cortex, hippocampus and striatum from rats with 15 days, 90 days or 2 years of age were isolated for total RNA extraction with Trizol reagent in accordance with the manufacturer instructions. The cDNA species were synthesized with SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR from 2 µg of total RNA and oligo (dT) primer in accordance with the suppliers. RT reactions were performed for 50 min at 50°C. cDNA (1µl) was used as a template for PCR with the specific primers which were designed using the program Oligos 9.6. β-actin-PCR was carried out as an internal standard. The following set of primers was used: for CP: forward 5'- CCT GCA CAC TGT ACA CTT CCA CGG CCA C -3'; and reverse 5'- GGT GAT GGA GGA AGC CCC TGA GCT G -3'; for DMT1(+IRE): forward 5'- CCC TAT CCT CAC CTT CAC AAG CCT GC -3'; and reverse 5'- CCA CCG CTG GTA TCT TCG CTC AGC AG -3'; for β-actin: forward 5'- TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG -3'; and reverse 5'- TAC TCC TGC TTC CTG ATC CAC AT -3' [31]. PCR reactions were performed (total volume of 25 µl) using a concentration of 0.2µM of each primer indicated below and 200 µM and 1 U Taq polymerase in the supplied reaction buffer. RT-PCR conditions were optimized in order to determine the number of cycles that would allow product detection within the linear phase of mRNA transcripts amplifications. Conditions for all PCR reactions were as follows: initial 1 min denaturation step at 94°C, 1 min at 94°C, 1 min annealing step at 62°C, 1 min extension step at 72°C for 30 cycles and a final 10 min extension at 72°C. Conditions for β-actin PCR were as follows: initial 1 min denaturation step at 94°C, 1 min at 94°C, 1 min annealing step at 58,5°C, 1 min extension step at 72°C for 34 cycles and a final 10 min extension at 72°C.

The amplification products were: CP 406bp; DMT1 309bp; β-actin 210 bp [31]. The fragment length of PCR reactions was confirmed with Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, USA). PCR

products were submitted to electrophoresis using a 1% agarose gel and the relative abundance of mRNA versus  $\beta$ -actin was determined by densitometry using freeware ImageJ 1.37 for Windows [13].

### *Statistical analysis*

The results were analyzed using SPSS software by one-way analysis of variance (ANOVA). Main effects were further analyzed by multiple comparisons of means using Tukey HSD Post-Hoc Tests. Statistical significance was attributed as  $P < 0,05$ .

## **3. Results**

### *Alterations in brain CP mRNA expression related to aging and iron overload*

There were significant differences on CP mRNA expression among groups in the hippocampus ( $F_{(5,18)} = 12.67$ ,  $P < 0.001$ ) and striatum ( $F_{(5,17)} = 19.98$ ,  $P < 0.001$ ), whereas in the cortex the ANOVA comparison fell short of significance ( $F_{(5,18)} = 2.76$ ,  $P = 0.051$ ). Further analysis using Tukey post-hoc tests showed that, in the hippocampus aged control rats showed increased levels of CP compared to either young or adult animals (both  $P$ s = 0.000, Fig. 1B). In the striatum, adult animals showed significantly lower CP expression compared to either young or aged rats ( $P = 0.009$  and 0.001, respectively, Fig. 1C).

In the hippocampus, iron treatment induced a significant decrease in CP mRNA levels in aged rats ( $P = 0.02$ ), but not in young and adult animals ( $P = 0.94$  and  $P = 0.99$ , respectively, Fig. 1B). In the striatum, young rats given iron showed a significant increase on CP mRNA levels ( $P = 0.002$ ) but in adult and aged animals no differences were observed ( $P = 0.74$  and  $P = 0.11$ , respectively, Fig. 1C). The results indicate that the neonatal iron treatment produces an early and transient increase in CP mRNA expression in the striatum of young animals, while a decrease was found in the hippocampus of aged rats.

### *Alterations in brain DMT1 mRNA expression related to aging and iron overload*

There were significant differences on DMT1 mRNA expression among groups in the cortex ( $F_{(5,18)}= 22.58, P<0.001$ ) and striatum ( $F_{(5,17)}= 20.86, P<0.001$ ), whereas in the hippocampus the ANOVA comparison showed no significant difference ( $F_{(5,18)}= 1.48, P=0.24$ , Fig. 2B). Tukey tests showed a similar age-related pattern of DMT1 mRNA expression in the cortex and in the striatum. Control young rats showed significantly higher levels of DMT1 mRNA when compared to adult or aged rats treated with vehicle (both  $P$ s= 0.000, in the cortex, Fig. 2A;  $P= 0.005$ , young versus adult, and  $P= 0.039$ , young versus aged, in the striatum, Fig. 2C ).

Neonatal iron administration produced a significant decrease on DMT1 mRNA levels in cortex of young rats ( $P=0.001$ , Fig. 2A) and a significant increase on DMT1 expression in striatum ( $P=0.007$ , Fig. 2C). Iron treatment have not affected DMT1 mRNA expression in the cortex or striatum of adult and aged rats. The results indicate that neonatal iron overload produces a transient, regionally specific effect on DMT1 expression.

#### 4. Discussion

The results presented in the current study show that age has a significant effect on CP and DMT1 mRNA expression. Moreover, iron status in the neonatal period, which has been suggested to determine iron levels in the central nervous system later in life, also significantly affects CP and DMT1 mRNA expression. To our knowledge this is the first study aimed to examine the long-term consequences of iron treatment in the neonatal period on CP and DMT1 mRNA expression in aged rats. The main findings can be summarized as follows: CP mRNA expression is higher in the striatum of two-year old rats compared to adult rats and in the hippocampus compared to both young and adult rats, while DMT1 mRNA expression is higher in the hippocampus and cortex of 15 day-old compared to adult and aged control rats. Iron loading in the neonatal period differentially affected CP and DMT1 mRNA expression. An early and transient increase in CP mRNA expression was found in the striatum of iron-overloaded rats. Interestingly, iron treatment in the neonatal period produced a decrease in CP mRNA expression in the hippocampus of aged rats. Also, iron treatment in the neonatal period significantly reduced DMT1 mRNA expression in the cortex and increased in the striatum only in 15-day old rats.

Over the years we have characterized that iron administered over only three days in the neonatal period dose-dependently accumulates in brain regions, such as *substantia nigra* in rats

[27], and in basal ganglia structures in mice [1; 2]. Subsequently, we found that this neonatal iron treatment induces oxidative stress in the hippocampus, cortex, *substantia nigra* and striatum [22]. Most importantly, we have demonstrated that iron-treated rats present severe and persistent memory deficits [22; 23; 24; 25; 27]. Taken together these results indicate that iron, administered in a critical period in which the transport into the brain reaches maximal rates, may have long-term deleterious consequences to the normal functioning of the nervous system. These results are in agreement with a body of clinical evidence indicating that iron might play a role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders [for a review see 19], as well as in the age-associated cognitive impairment [21]. Although disturbances in iron homeostasis in the CNS have been unequivocally associated with neurodegenerative disorders, the question of whether iron accumulation plays a causative role or is a consequence of the neurodegenerative process remains to be answered. Thus, it is important to investigate the consequences of iron loading in the neonatal period in mRNA expression of proteins critically involved in iron homeostasis. We have recently shown that both neonatal iron and aging alter mRNA expression of the transferrin receptor, a membrane protein involved in iron uptake, ferritin, the main iron storage protein, and the Iron Regulatory Protein 2 [5].

It is now clear that CP is critically involved in iron homeostasis in the CNS. Accordingly, patients with autosomal recessive aceruloplasminemia develop iron accumulation within the nervous system associated with neurodegeneration [34; 38]. Misregulation of CP has also been implicated in other neurodegenerative disorders, including Parkinson's and Alzheimer's disease [20]. Jeong and David [35] reported a slow accumulation of iron in astrocytes over a period of 12-24 months of age accompanied by a significant astrocytic and neuronal loss in the cerebellum of ceruloplasmin null (Cp<sup>-/-</sup>) mice. They also found a small but significant reduction in the expression of CP in the cerebellum of 24 month-old wild type mice compared to 6 month-old wild type mice. Authors suggest that the reduction in the expression of CP in the CNS may contribute to iron accumulation in normal aging. In the present study, control aged rats presented higher CP mRNA levels than adult animals in the hippocampus and striatum, although we have not measured CP mRNA expression in the cerebellum of aged rats. However, Chang and coworkers [42] showed an age-related increase in CP mRNA expression in the cortex, hippocampus and striatum of rats, measured from post natal day seven through post natal day 196. They found a similar pattern of CP mRNA and protein expression.

It is possible that, in normal rats, the age-associated increase on CP found in the present study may be related to a compensatory response to higher iron levels.

The effects of iron status on CP mRNA and protein levels were also studied by Chang and colleagues [42]. No significant differences in CP mRNA expression were found in the cortex, hippocampus, striatum, and *substantia nigra* of adult rats fed a low iron diet and a standard diet supplement with 2.5% carbonyl iron for 6 weeks. Our neonatal iron treatment induced a decrease in CP mRNA in the hippocampus of aged animals and an increase in the striatum of young animals. These regional differences may be related to a differential distribution of iron content in the brain. The major difference between the present study and that from Chang and coworkers [42] resides in the period of iron supplementation. Neonatal iron administration has been shown to produce consistent long-term consequences on iron homeostasis in the CNS.

Disruption of DMT1 expression may be involved in the increased iron accumulation observed in neurodegenerative disorders. DMT1 expression is increased in the neurons of the *substantia nigra* in Parkinson's disease patients, which correlates to the abnormal iron deposition in the same area. In addition, it has been demonstrated that DMT1 expression increases in the ventral mesencephalon of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) intoxicated mice, concomitant with iron accumulation, oxidative stress, and dopaminergic cell loss [16].

Ke and coworkers [42] demonstrated that the development has a significant effect on DMT1 mRNA expression and protein content in the cortex, hippocampus, striatum and *substantia nigra*. Results indicated that DMT1(+IRE) expression reaches its highest level at post natal week 3, then decreases at post natal week 29. These findings are in agreement with the present results, where young rats expressed higher DMT1 mRNA than adult and aged rats in the cortex and striatum. The reason why the same was not confirmed in the hippocampus in the present study remains unknown. Ke and coworkers [42] also investigated the effects of low-iron and high-iron diet in adult rats. They did not find significant changes in DMT1 (+IRE) mRNA expression and protein content in all brain regions examined. In contrast to those findings, our study shows that iron, when administered in a critical period of development, may cause significant changes on mRNA expression of DMT1. Iron-induced DMT1 mRNA expression may be regionally regulated, since our iron treatment induces a decrease in cortex of young animals and an increase in the striatum of young animals, with no persistent changes later in life. It has been demonstrated that perinatal iron deficiency increased the

percentage of neurons expressing DMT1 in the hippocampus and cerebral cortex, but had no effect on the percentage of cells with positive staining for the protein in other regions [4]. It has been proposed that DMT1(+IRE) expression is sensitive to cellular iron levels [17; 36], so one could expect that DMT1 mRNA levels would decrease in response to neonatal iron overload, which happened in the cortex of young animals, but not in the hippocampus or striatum. Surprisingly, DMT1 mRNA expression increased in the striatum in response to the neonatal iron treatment. Again, regional differences in iron content may be a plausible explanation for this difference. It is noteworthy that the striatum is one of the CNS regions with highest iron content [32]. Another possibility, suggested also by Ke and coworkers [42] may be related to the lack of maturity of iron homeostasis in the brain during the neonatal period.

In summary, here we show that DMT1 and CP are differentially expressed during the different phases of life and that iron status in the neonatal period may affect CP and DMT1 mRNA expression. With the knowledge that iron content increases in the brain during the normal aging process and accumulates in selective brain regions in neurodegenerative disorders, the understanding of the regulatory mechanism involved in iron homeostasis may contribute to discovering novel therapeutic targets.

## Figure legends

**Figure 1** – Effect of neonatal treatment with vehicle (white bars) or iron (dark bars) on ceruloplasmin (CP) transcripts in the cortex (A), hippocampus (B) and striatum (C) of young, adult and aged rats. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel, using  $\beta$ -actin as constitutive gene. Figure 1D shows a representative gel and the CP/ $\beta$ -actin mRNA ratio (expressed as arbitrary units) obtained by optical densitometry analysis of three independent experiments from striatum. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey HSD Post-Hoc Tests. Statistical significance is indicated by letters (a, for  $p < 0.05$  and b, for  $p < 0.01$ ) for comparisons between vehicle-treated (control) groups at different age points. \* ( $p < 0.05$ ) and # ( $p < 0.01$ ) indicate statistically significant differences between control groups and iron-treated groups within each age point.

**Figure 2** – Effect of neonatal treatment with vehicle (white bars) or iron (dark bars) on Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) transcripts in cortex (A), hippocampus (B) and striatum (C) of young, adult and aged rats. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel, using  $\beta$ -actin as constitutive gene. The figure D shows a representative gel and the DMT1/ $\beta$ -actin mRNA ratio (expressed as arbitrary units) obtained by optical densitometry analysis of three independent experiments, from cortex. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey HSD Post-Hoc Tests. Statistical significance is indicated by letters (a, for  $p < 0.05$  and b, for  $p < 0.01$ ) for comparisons between vehicle-treated (control) groups at different age points. \* ( $p < 0.05$ ) and # ( $p < 0.01$ ) indicate statistically significant differences between control groups and iron-treated groups within each age point.

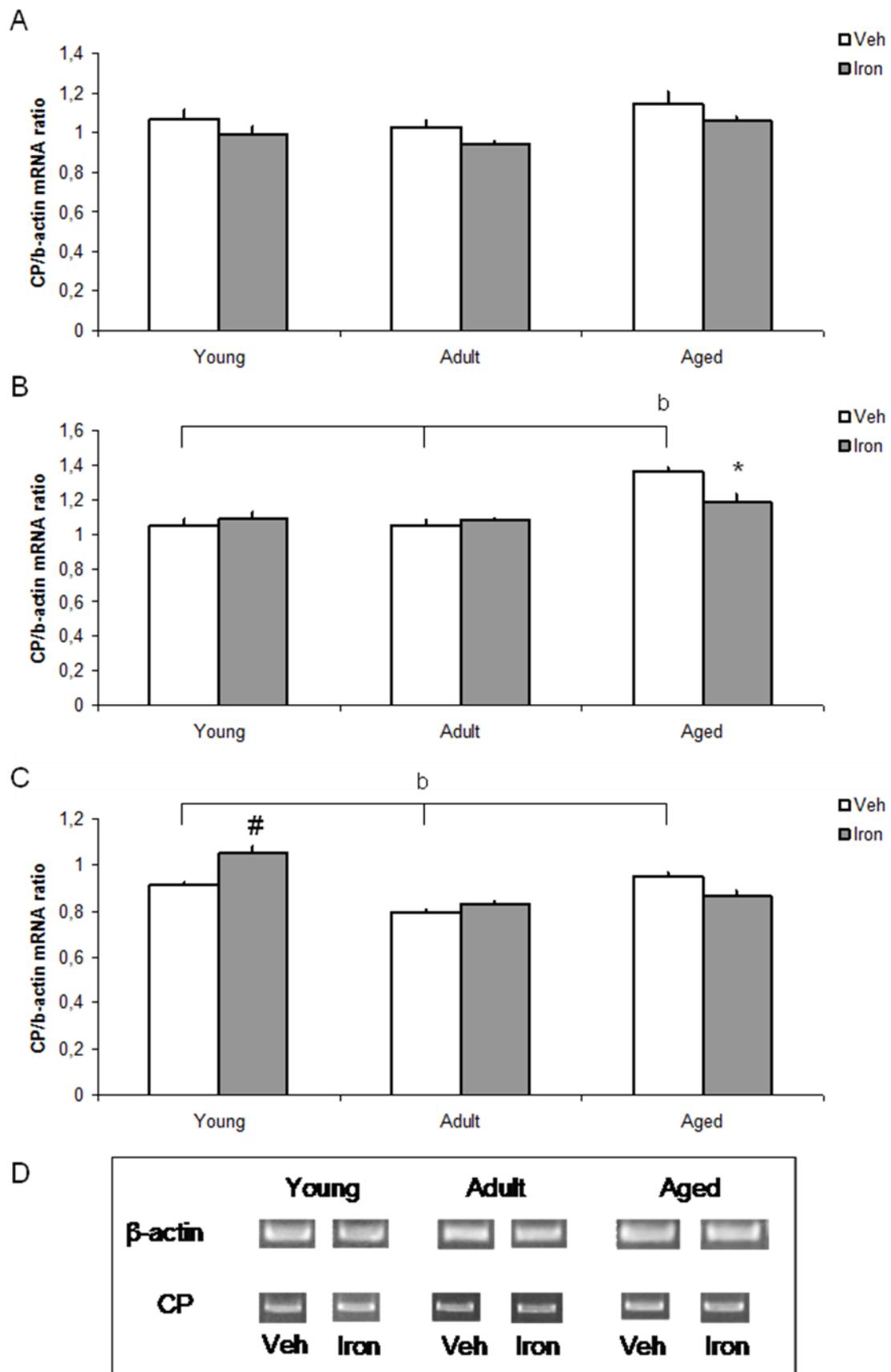
## References

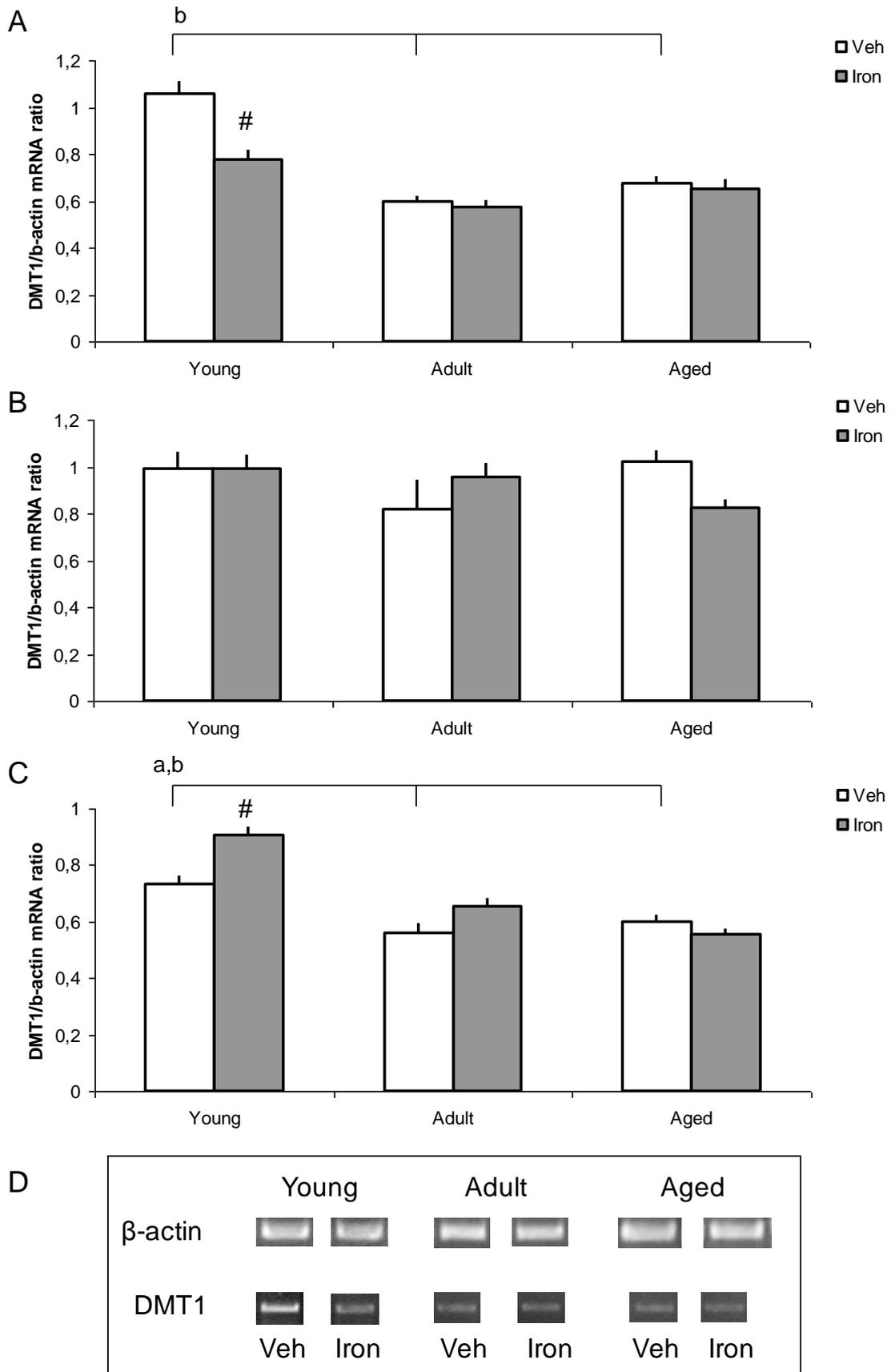
- [1] A. Fredriksson, N. Schröder, P. Eriksson, I. Izquierdo, T. Archer, Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159 (1999) 25-30.
- [2] A. Fredriksson, N. Schröder, P. Eriksson, I. Izquierdo, T. Archer, Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 119 (2000) 65-74.
- [3] A. J. Dwork, G. Lawler, P. A. Zybert, M. Durkin, M. Osman, N. Willson, A. I. Barkai, An autoradiographic study of the uptake and distribution of iron by the brain of the young rat. *Brain Res.* 518 (1990) 31-39.
- [4] A. J. Siddappa, R. B. Rao, J. D. Wobken, K. Casperson, E. A. Leibold, J. R. Connor, M. K. Georgieff, Iron deficiency alters iron regulatory protein and iron transport protein expression in the perinatal rat brain. *Pediatr. Res.* 53 (2003) 800-807.
- [5] A. S. Dornelles, V. A. Garcia, M. N. de Lima, G. Vedana, L. A. Alcalde, M. R. Bogo, N. Schröder, mRNA Expression of proteins involved in iron homeostasis in brain regions is altered by age and by iron overloading in the neonatal period. *Neurochem. Res.* (2010) *In press*, Doi: 10.1007/s11064-009-0100-z.
- [6] B. N. Patel, R. J. Dunn, S. David, Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 4305-4310.
- [7] C. Grabill, A. C. Silva, S. S. Smith, A. P. Koretsky, T. A. Rouault, MRI detection of ferritin iron overload and associated neuronal pathology in iron regulatory protein-2 knockout mice. *Brain Res.* 971(2003) 95-106.
- [8] D. J. Piñero, N. Li, J. Hu, J. L. Beard, J. R. Connor, The intracellular location of iron regulatory proteins is altered as a function of iron status in cell cultures and rat brain. *J. Nutr.* 131 (2001) 2831- 2836.
- [9] E. Huang, W. Y. Ong, M. L. Go, J. R. Connor, Upregulation of iron regulatory proteins and divalent metal transporter-1 isoforms in the rat hippocampus after kainate induced neuronal injury. *Exp. Brain Res.* 170 (2006) 376-386.
- [10] G. Bartzokis, T. A. Tishler, P. H. Lu, P. Villablanca, L. L. Altshuler, M. Carter, D. Huang, N. Edwards, J. Mintz, Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 28 (2007) 414-423.

- [11] G. Floris, R. Medda, A. Padiglia, G. Musci, The physiopathological significance of ceruloplasmin. A possible therapeutic approach. *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1735-1741.
- [12] G. J. Anderson, L. W. Powell, Of metals, mice, and men: what animal models can teach us about body iron loading. *J. Clin. Invest.* 105 (2000) 1185-1186.
- [13] G. P. Cognato, R. S. Czepielewski, J. J. Sarkis, M. R. Bogo, C. D. Bonan, Expression mapping of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1-3 (E-NPP1-3) in different brain structures during rat development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26 (2008) 593-598.
- [14] G. Papanikolaou, K. Pantopoulos, Iron metabolism and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202 (2005) 199-211.
- [15] J. M. Gutteridge, Iron and oxygen radicals in brain. *Ann. Neurol.* 32 (1992) S16-S21.
- [16] J. Salazar, N. Mena, S. Hunot, A. Prigent, D. Alvarez-Fischer, M. Arredondo, C. Duyckaerts, V. Sazdovitch, L. Zhao, L. M. Garrick, M. T. Nuñez, M. D. Garrick, R. Raisman-Vozari, E. C. Hirsch, Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 18578-18583.
- [17] K. Pantopoulos, Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012 (2004) 1-13.
- [18] L. A. Shinobu, M. F. Beal, The role of oxidative processes and metal ions in aging and Alzheimer's Disease. In: J. R. Connor ed. *Metals and oxidative damage in neurological disorders.* New York: Plenum Press (1997) 237-276.
- [19] L. Zecca, M. B. Youdim, P. Riederer, J. R. Connor, R. R. Crichton. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004) 863-873.
- [20] M. C. Boll, M. Alcaraz-Zubeldia, S. Montes, C. Rios, Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* 33 (2008) 1717-1723.
- [21] M. J. House, T. G. St Pierre, J. K. Foster, R. N. Martins, R. Clarnette, Quantitative MR imaging R2 relaxometry in elderly participants reporting memory loss. *AJNR Am J. Neuroradiol.* 27 (2006) 430-439.
- [22] M. N. de Lima, M. Polydoro, D. C. Laranja, F. Bonatto, E. Bromberg, J. C. Moreira, F. Dal-Pizzol, N. Schröder, Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur. J. Neurosci* 21 (2005a) 2521-2528.

- [23] M. N. de Lima, D. C. Laranja, F. Caldana, M. M. Grazziotin, V. A. Garcia, F. Dal-Pizzol, E. Bromberg, N. Schröder, Selegiline protects against recognition memory impairments induced by neonatal iron treatment. *Exp. Neurol.* 196 (2005b) 177-183.
- [24] M. N. de Lima, J. Presti-Torres, F. Caldana, M. M. Grazziotin, F. S. Scalco, M. R. Guimarães, E. Bromberg, S. I. Franke, J. A. Henriques, N. Schröder, Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 570 (2007) 111-114.
- [25] M. N. de Lima, J. Presti-Torres, V. A. Garcia, M. R. Guimarães, F. S. Scalco, R. Roesler, N. Schröder, Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology* 55 (2008) 788-792.
- [26] M. W. Hentze, M. U. Muckenthaler, N. C. Andrews, Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117 (2004) 285-297.
- [27] N. Schröder, A. Fredriksson, M. R. Vianna, R. Roesler, I. Izquierdo, T. Archer, Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav. Brain Res.* 124 (2001) 77-85.
- [28] P. Aisen, C. Enns, M. Wessling-Resnick, Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (2001) 940-959.
- [29] P. Ponka, Hereditary causes of disturbed iron homeostasis in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012 (2004) 267-281.
- [30] P. Zhang, W. Land, S. Lee, J. Juliani, J. Lefman, S. R. Smith, D. Germain, M. Kessel, R. Leapman, T. A. Rouault, S. Subramaniam, Electron tomography of degenerating neurons in mice with abnormal regulation of iron metabolism. *J. Struct. Biol.* 150 (2005) 144-153.
- [31] R. S. da Silva, S. K. Richetti, V. G. da Silveira, A. M. Battastini, M. R. Bogo, D. R. Lara, C. D. Bonan, Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26 (2008) 339-343.
- [32] S. A. Benkovic, J. R. Connor, Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.* 338 (1993) 97-113.
- [33] S. J. Focht, B. S. Snyder, J. L. Beard, W. van Gelder, L. R. Williams, J. R. Connor, Regional distribution of iron, transferrin, ferritin, and oxidatively-modified proteins in young and aged fischer 344 rat brains. *Neuroscience* 79 (1997) 255-261.

- [34] S. J. Texel, X. Xu, Z.L. Harris, Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 36 (2008) 1277-1281.
- [35] S. Y. Jeong, S. David, Age-related changes in iron homeostasis and cell death in the cerebellum of ceruloplasmin-deficient mice. *J. Neurosci.* 26 (2006) 9810-9819.
- [36] T. A. Rouault, Systemic Iron Metabolism: a review and implications for brain iron metabolism. *Pediatr. Neurol.* 25 (2001) 130-137.
- [37] T. Moos, E. H. Morgan, The significance of the mutated divalent metal transporter (DMT1) on iron transport into Belgrade rat brain. *J. Neurochem.* 88 (2004) 233-245.
- [38] V. Vassiliev, Z. L. Harris, P. Zatta, Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49 (2005) 633-40.
- [39] W. van Gelder, M. I. Huijskes-Heins, M. I. Cleton-Soeteman, J. P. van Dijk, H. G. van Eijk, Iron uptake in blood-brain barrier endothelial cells cultured in iron-depleted and iron-enriched media. *J. Neurochem.* 71 (1998) 1134-1140.
- [40] Y. Chen, Z. M. Qian, J. Du, X. Duan, Y. Chang, Q. Wang, C. Wang, Y. M. Ma, Y. Xu, L. Li, Y. Ke, Iron loading inhibits ferroportin 1 expression in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 47 (2005) 507-513.
- [41] Y. Ke, Z. M. Qian, Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2 (2003) 246-253.
- [42] Y. Ke, Y. Z. Chang, X. L. Duan, J. R. Du, L. Zhu, K. Wang, X. D. Yang, K. P. Ho, Z. M. Qian, Age-dependent and iron-independent expression of two mRNA isoforms of divalent metal transporter 1 in rat brain. *Neurobiol. Aging.* 26 (2005) 739-748.
- [43] Y. Z. Chang, Z. M. Qian, K. Wang, L. Zhu, X. D. Yang, J. R. Du, L. Jiang, K. P. Ho, Q. Wang, Y. Ke, Effects of development and iron status on ceruloplasmin expression in rat brain. *J. Cell Physiol.* 204 (2005) 623-631.



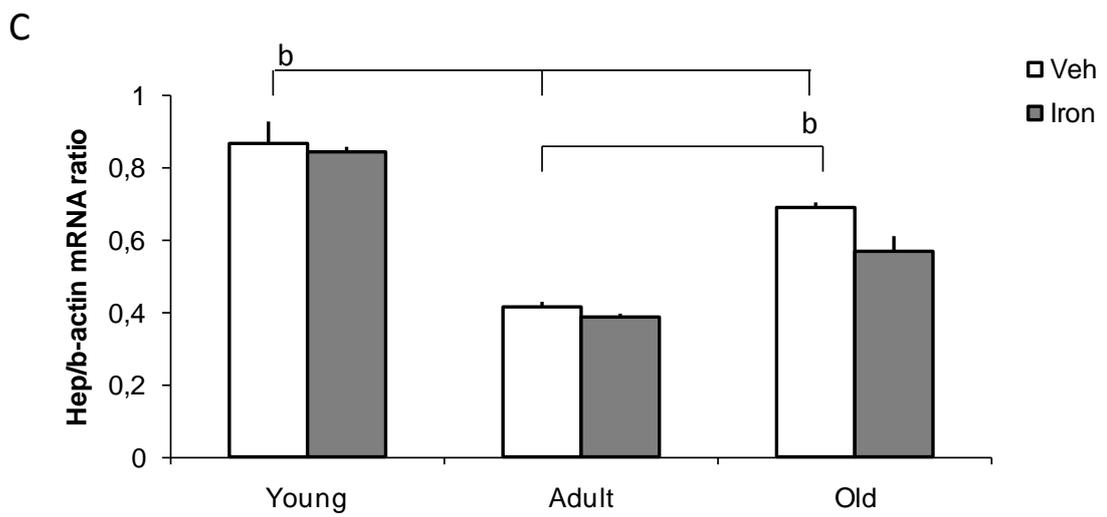
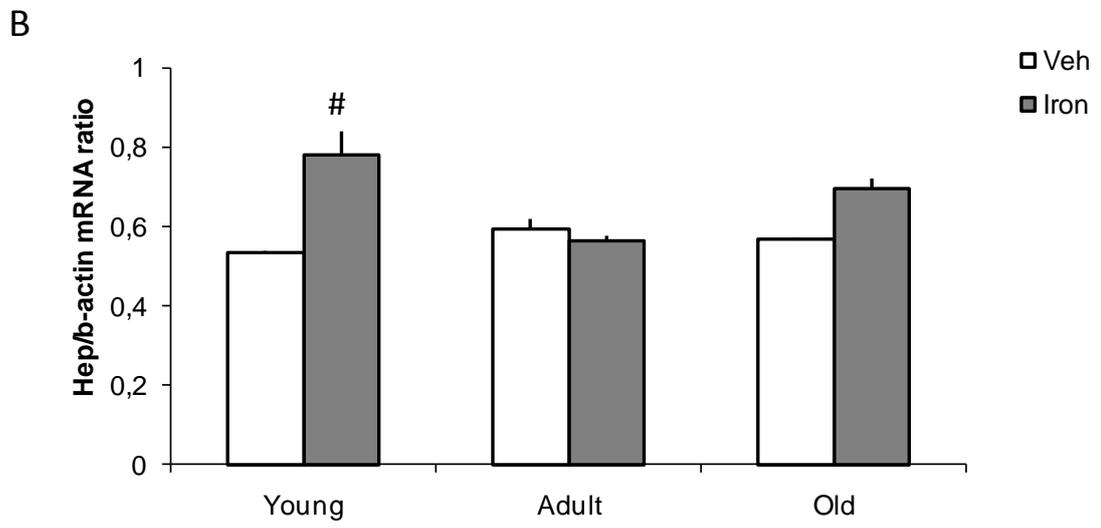
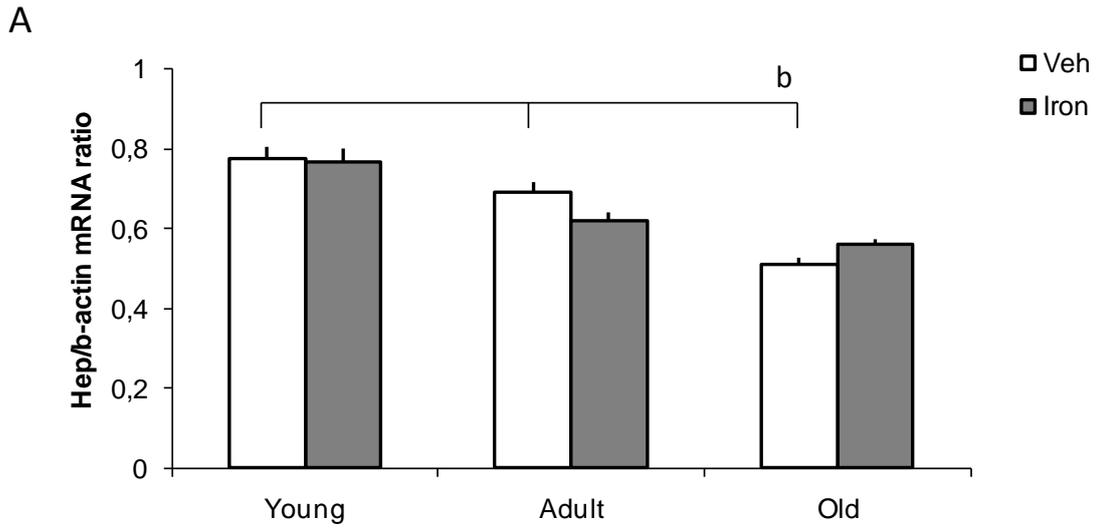


## **CAPÍTULO 4**

#### 4.1 RESULTADOS PRELIMINARES DA HEPICIDINA

A análise estatística através de ANOVA mostrou que houve diferença significativa na expressão de RNAm de hepcidina entre os grupos no hipocampo ( $F_{(5,14)}=10,37$ ,  $P<0,001$ ), córtex ( $F_{(5,16)}=18,67$ ,  $P<0,001$ ) e estriado ( $F_{(5,16)}=39,59$ ,  $P<0,001$ ). Análises posteriores usando teste Tukey, mostraram um decréscimo nos níveis de RNAm de hepcidina no córtex de animais controle quando comparados os animais velhos com os jovens e com os adultos ( $P=0,000$  e  $P=0,002$ , respectivamente, Fig. 3A). No estriado, animais jovens mostraram expressão significativamente mais alta de RNAm de hepcidina quando comparados com animais adultos ( $P=0,000$ ) e velhos ( $P=0,014$ ). E os animais velhos, por sua vez, apresentaram expressão mais alta quando comparados com os animais adultos ( $P=0,000$ ) (Fig. 3C). A análise com teste Tukey não apresentou diferença significativa nos níveis de RNAm de hepcidina no hipocampo nas diferentes idades (Fig. 3B).

A administração de ferro no período neonatal induziu um aumento significativo nos níveis de RNAm de hepcidina no hipocampo dos animais jovens ( $P=0,001$ ). No córtex e no estriado nenhum efeito do tratamento foi encontrado. Mas, no estriado, houve um decréscimo nos níveis de RNAm de hepcidina quando comparados os animais velhos tratados e não-tratados, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $P=0,185$ ) (Fig. 3C). Esses resultados indicam que o tratamento com ferro no período neonatal produz um aumento nos níveis de RNAm de hepcidina somente no hipocampo de animais jovens.



**FIG. 3** – Efeito do tratamento neonatal com veículo (barras brancas) ou ferro (barras escuras) nos transcritos de hepcidina (Hep) no córtex (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos jovens, adultos e velhos. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do teste de Tukey.

A significância estatística é indicada por letras (a, para  $P < 0.05$  a b, para  $P < 0.01$ ) para comparações entre grupos tratados com veículo (controle) nas diferentes idades. \* ( $P < 0.05$ ) e # ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratados com ferro dentro de cada idade.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ferro é um metal essencial para uma variedade de funções biológicas, mas também pode gerar radicais livres altamente tóxicos por ser um metal de transição. Por isso, são necessários mecanismos que mantenham a homeostasia do ferro a nível celular podendo, a falta ou o excesso de ferro celular, causar a morte das mesmas. Os efeitos da toxicidade causada pelo excesso deste metal são especialmente importantes em várias regiões do Sistema Nervoso Central (SNC), por este não apresentar capacidade regenerativa (Jeong & David, 2003). As evidências do envolvimento do metabolismo anormal do ferro em diversas patologias relacionadas ao SNC, como a Doença de Parkinson (Dexter *et al.*, 1991; Jellinger *et al.*, 1993; Faucheux *et al.*, 1993; Kienzl *et al.*, 1995; Ebadi *et al.*, 1996; Griffiths *et al.*, 1999) e de Alzheimer (Lynch *et al.*, 2000), têm despertado um grande interesse nos pesquisadores que vem tentando entender os mecanismos que participam da captura, distribuição e compartimentalização desse metal no encéfalo.

À medida que os estudos sobre o ferro avançaram, ficou evidente o impacto do conteúdo deste metal presente na dieta sobre o metabolismo do mesmo no SNC. Também foi demonstrado que o período neonatal é crítico para o estabelecimento do conteúdo de ferro cerebral nos adultos, tornando importante estudar os possíveis efeitos tóxicos da sobrecarga desse metal nessa fase.

Devido ao equilíbrio necessário, a aquisição de ferro é um processo que envolve muitas proteínas para assegurar que a captura do mesmo seja suficiente e apropriada às necessidades das células e organismos. Além disso, as proteínas envolvidas no transporte e armazenamento de ferro precisam se ligar a este para prevenir a formação de radicais livres. O número total de proteínas que participam do metabolismo do ferro em mamíferos é desconhecido, entretanto, muitas têm sido caracterizadas nos últimos anos e muito já é sabido sobre como suas expressões são integradas para manter a homeostasia (Rouault, 2001).

Na tentativa de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na homeostasia do ferro, realizamos o presente estudo com sobrecarga de ferro no período neonatal e analisamos, em diferentes idades, a expressão de diferentes proteínas que participam deste processo em diferentes regiões do SNC.

Acredita-se que a expressão das proteínas responsáveis pelo armazenamento e transporte do ferro esteja diretamente relacionada com a concentração de ferro presente e com as funções que estas desempenham. Com uma sobrecarga de ferro, como a realizada neste trabalho, por exemplo, seria esperado que os níveis de RNAm de ferritina, proteína responsável pelo armazenamento de ferro, aumentassem numa tentativa de proteger o SNC contra o excesso deste metal, o que foi observado no estriado de animais jovens e adultos. De acordo com os dados na literatura a respeito da homeostasia do ferro a nível sistêmico, nossa hipótese era que encontrássemos no SNC, um aumento da concentração de RNAm de CP, como encontramos no estriado de ratos jovens, devido a sua ação antioxidante e ao conhecimento sobre aceruloplasminemia, doença causada pela falta deste enzima que provoca acúmulo de ferro e conseqüente neurodegeneração. Mas uma inesperada diminuição do nível de RNAm de CP foi encontrada no hipocampo de animais velhos, mostrando que o tratamento no período neonatal pode apresentar conseqüências a longo prazo e que o mecanismo de compensação esperado não está ocorrendo, podendo ser esta uma das causas do acúmulo de ferro encontrado no cérebro de pessoas com doenças neurodegenerativas. Com este tratamento, também supnhamos que fossemos encontrar aumento dos níveis de RNAm de Heficidina como encontramos no hipocampo de animais jovens e velhos, uma vez que esta proteína tem como função degradar a ferroportina, impedindo a liberação de ferro no plasma e, conseqüentemente, diminuindo a concentração do mesmo disponível para ser transportado para as células. Por outro lado, baseado no conhecimento a nível sistêmico, supnhamos que os níveis de RNAm das proteínas transportadoras de ferro, como TfR e

DMT1, estivessem diminuídos, impedindo, assim, o acúmulo de ferro nessas regiões do SNC. Essa diminuição foi observada nos níveis de TfR no hipocampo e córtex de ratos velhos, mostrando uma tentativa de compensar os altos níveis de ferro presentes. Mas, no estriado, tanto de animais jovens quanto de adultos, ao invés da diminuição, encontramos aumento nos níveis de RNAm de TfR, o que indica que apesar das várias proteínas envolvidas, a regulação esperada para manter os níveis adequados de ferro nem sempre ocorre, podendo ser esta uma das causas das doenças neurodegenerativas, nas quais acúmulos de ferro são encontrados. O nível de RNAm de DMT1, no córtex de animais jovens, também diminuiu com o tratamento neonatal com sobrecarga de ferro como esperávamos, mas no estriado de ratos jovens, encontramos um aumento, mostrando mais uma vez que a compensação ao excesso de ferro depende da estrutura e idade analisadas. Nossa hipótese em relação à expressão de RNAm de IRP era que a mesma diminuísse, o que provocaria a degradação do RNAm de TfR e a transcrição de ferritina, mecanismo que compensaria o excesso de ferro presente, permitindo que o mesmo permanecesse armazenado e não fosse transportado para as células. Essa diminuição foi encontrada no córtex de animais jovens, o que sugere uma tentativa de impedir o dano causado pelo excesso de ferro nesta estrutura do SNC.

A partir dos nossos resultados, podemos concluir que uma sobrecarga de ferro no período neonatal pode trazer conseqüências a curto prazo, como observamos na expressão de alguns dos RNAm analisados no cérebro de ratos jovens, mas também vimos que o tratamento provocou alterações que se manifestaram nos animais velhos, o que mostra que existe um efeito desta sobrecarga a longo prazo. Estes resultados sugerem a ocorrência de uma desregulação da homeostasia do ferro causada pelo excesso deste metal no início do desenvolvimento, o que seria uma possível razão para o acúmulo de ferro característico de doenças neurodegenerativas.

Muitos estudos têm mostrado que a concentração de ferro aumenta com o envelhecimento. Com base nisso, nossa expectativa era que encontrássemos maior expressão de RNAm das proteínas relacionadas com armazenamento de ferro e uma diminuição das proteínas responsáveis pelo transporte deste metal de acordo com o aumento da idade dos animais utilizados. Entretanto, nossos resultados não mostraram essa relação entre as taxas de expressão e envelhecimento, o que nos leva a sugerir que o mecanismo envolvendo várias proteínas para evitar os danos causados pelo excesso de ferro no SNC não é “finamente” regulado como imaginávamos, o que possivelmente esteja relacionado com as doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento.

Uma vez que alterações na homeostasia do ferro no cérebro podem estar envolvidas na patogênese de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, o presente estudo pode contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no acúmulo de ferro característico destas doenças.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allerson, C. R., Cazzola, M., Rouault, T. A. **Clinical severity, thermodynamic effects of iron-responsive element mutations in hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome.** *J Biol Chem.* 274 (1999) 26439-26447.
- Andrews, N. C. **Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link.** *J Clin Invest,* 113 (2004) 1251-1253.
- Attieh, Z. K., Mukhopadhyay, C. K., Seshadri, V., Tripoulas, N. A., Fox, P. L. **Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport.** *J Biol Chem.* 274 (1999) 1116-1123.
- Bartzokis, G., Cummings, J., Perlman, S., Hance, D. B., Mintz, J. **Increased basal ganglia iron levels in Huntington disease.** *Arch Neurol.* 56 (1999) 569-574.
- Benkovic, S.A., Connor, J.R. **Ferritin, Transferrin, and Iron in Selected Regions of the Adult and Aged Rat Brain.** *J. Comp. Neurol.* 338 (1993) 97-113.
- Bothwell, T.H. **Overview and mechanisms of iron regulation.** *Nutr. Rev.* 53 (1995) 237- 245.
- Broadwell, R. D., Baker-Caimes, B. J., Friden, P. M., Oliver, C., Villegas, J. C. **Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. III. Receptor-mediated transcytosis through the blood-brain barrier of blood-borne transferrin and antibody against the transferrin receptor.** *Exp. Neurol.* 142 (1996) 47-65.
- Clardy S. L., Wang, X., Boyer, P. J., Earley, C. J., Allen, R. P. and Connor, J. R. **Is ferroportin-hepcidin signaling altered in restless legs syndrome?** *J Neurol Sci.* 247 (2006) 173-179.
- Connor, J. R., Boeshore, K. L., Benkovic, S. A., Menzies, S. L. **Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain.** *J. Neurosci. Res.* 37(1994) 461-465.
- Connor, J. R. Snyder, B. S., Arosio, P., Loeffler, D. A., LeWitt, P. **A quantitative analyses of isoferritins in select regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer´s diseased brains.** *J. Neurochem.* 65 (1995) 717-724.
- Connor, J.R. Menzies, S. L., Burdo, J. R., Boyer, P. J. **Iron and Iron Management Proteins in Neurobiology.** *Pediatr Neurol* 25 (2001) 118-129.
- Coon, K.D., Siegel, A. M., Yee, S. J., Dunckley, T. L., Mueller, C., Nagra, R. M., Tourtellotte, W. W., Reiman, E. M., Papassotiropoulos, A., Petersen, F. F., Stephan, D. T., Kirsch, W. M. **Preliminary demonstration of an allelic association of the IREB2 gene with Alzheimer´s disease.** *J. Alzheimers Dis.* 9 (2006). 225-233.
- Crichton, R.R., Wilmet, S., Legssyer, R., Ward, R. J. **Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells.** *J Inorg Biochem.* 91(2002) 9-18.

- 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(2005) 2521-2528.
- 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 (1991) 1953-1975.
- Ebadl, M., Srinivasan, S. K., Baxi, M. D. **Oxidative stress and oxidant therapy in Parkinson's disease.** *Prog. Neurobiol.* 48 (1996) 1-19.
- Eisenstein, R.S., Blemings, K.P. **Iron Regulatory Proteins, Iron Responsive Elements and Iron Homeostasis.** *J. Nutr.* 128 (1998) 2295-2298.
- Erlitzki, R., Long, J. C., Theil, E. C. Multiple, **Conserved Iron-responsive Elements in the 3'- Untranslated Region of Transferrin Receptor mRNA Enhance Binding of Iron Regulatory Protein 2.** *J Biol Chem.* 277 (2002) 42579-42587.
- Espinosa de los Monteros, A., Foucaud, B. **Effect of iron and transferrin on pure oligodendrocytes in culture; Characterization of a high-affinity transferrin receptor at different ages.** *Brain. Res.* 432 (1987) 123-130.
- Faucheux, B.A., Hirsch, E. C., Villares, J., Selimi, F., Mouatt-Pringent, A., Javoy-Agid, F., Hauw, J. J., Agid, Y. **Distribution of <sup>125</sup>I-ferrotransferrin binding sites in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's disease.** *J. Neurochem.* 60 (1993) 2338-2341.
- Ferreira, C. Bucchini, D., Martin, M. E., Levi, S., Arosio, P., Grandchamp, B., Beaumont, C. **Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice.** *J Biol Chem.* 275 (2000) 3021-3024.
- Focht, S.J., Snyder, B. S., Beard, J. L., Van Gelder, W., Williams, L. R., Connor, J. R. **Regional distribution of iron, transferrin, ferritin, and oxidatively-modified proteins in young and aged fischer 344 rat brains.** *Neuroscience.* 79 (1997) 255-261.
- Fredriksson, A., Schröder, N., Eriksson, P., Izquierdo, I., Archer, T. **Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 159 (1999) 25-30.
- Fredriksson A., Schröder, N., Eriksson, P., Izquierdo, I., Archer, T. **Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period.** *Brain Res Dev Brain Res.* 119 (2000) 65-74.
- Gaasch, J.A., Lockman, P. R., Geldenhuys, W. J., Allen, D. D., Van der Schyf, C. J. **Brain Iron Toxicity: Differential Responses of Astrocytes, Neurons, and Endothelial Cells.** *Neurochem Res.* 32 (2007) 1196-1208.

- Galvin, J.E., Giasson, B., Hurtig, H. I., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. **Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1 is characterized by alpha-, beta-, and gamma-synuclein neuropathology.** *Am J Pathol.* 157 (2000) 361-368.
- Ganz T. **Hepcidin in iron metabolism.** *Curr Opin Hematol.* 11(2004) 251-254.
- Ganz T. **Hepcidin—a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 306 (2006) 183-198.
- Giometto, B., Bozza, F., Argentiero, V., Gallo, P., Pagni, S., Piccinno, M. G., Tavolato, B. **Transferrin receptors in the rat central nervous system. An immunocytochemical study.** *J Neurol Sci.* 98 (1990) 81-90.
- Griffiths, P.D., Dobson, B. R., Jones, G. R., Clarke, D. T. **Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease. An in vivo study using extended X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy.** *Brain.* 122 (1999) 667-673.
- Gunshin, H., Allerson, C. R., Polycarpou-Schwarz, M., Rofts, A., Rogers, J. T., Kisch, F., Hentze, M. W., Rouault, T. A., Andrews, N. C., Hediger, M. A. **Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter.** *FEBS Letters.* 509 (2001) 309-316.
- Grunheid, S., Cellier, M., Vidal, S., Gros, P. **Identification and characterization of a second mouse Nramp gene.** *Genomics.* 25 (1995) 514-525.
- Han, J., Day, J. R., Connor, J. R., Beard, J. L. **Gene expression of transferrin and transferrin receptor in brains of control vs. iron-deficient rats.** *Nutr Neurosci.* 6 (2003).1-10.
- Harford, J., Rouault, T. A., Klausner, R. D. **The control of cellular iron homeostasis.** In Brock, J. H., Halliday, J. W., Pippard, M. J., & Powell, L. W. (eds), *Iron Metabolism in Health and Disease.* (1994) 123-149.
- Harris, Z. L., Durley, A. P., Man, T. K., Gitlin, J. D. **Target gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (1999) 10812-10817.
- Henderson, B. R., Seiser, C., Kuhn, L. C. **Characterization of a second RNA-binding protein in rodents with specificity for iron responsive elements.** *J Biol Chem.* 268 (1993) 27327-27334.
- Hill, J. M., Ruff, M. R., Weber, R. J., Pert, C. B. **Transferrin receptors in rat brain: Neuropeptide-like pattern and relationship to iron distribution.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 (1985) 4553-4557.
- Hintze, K. J., Theil, E. C. **DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and control ferritin-L expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (2005) 15048-15052.
- Hirling, H., Emery-Goodman, A., Thompson, N., Neupert, B., Seiser, C., Kuhn, L. C. **Expression of active iron regulatory factor from a full-length human cDNA by in vitro transcription/translation.** *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 33-39.

- Huang, E., Ong, W. Y., Go, M. L., Connor, J. R. **Upregulation of iron regulatory proteins and divalent metal transporter-1 isoforms in the rat hippocampus after kainate induced neuronal injury.** *Exp Brain Res.* 170 (2006) 376-386.
- Ill, A. M., Mitchell, T. R., Neely, E. B., Connor, J. R. **Metabolic analysis of mouse brains that have compromised iron storage.** *Metab. Brain Dis.* 21(2006) 77-87.
- Irace, C., Scorziello, A., Maffettone, C., Pignataro, G., Matrone, C., Adornetto, A., Santamaria R., Annunziato, L., Colonna, A. **Divergent modulation of iron regulatory proteins and ferritin biosynthesis by hypoxia/reoxygenation in neurons and glial cells.** *J Neurochem.* 95 (2005) 1321-1331.
- Jefferies, W. A., Brandon, M. R., Hunt, S. V., Williams, A. F., Gater, K. C., Mason, D. Y. **Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries.** *Nature.* 312 (1984) 162-163.
- Jellinger, K. A., Kienzl, E., Rumpelmaier, G., Paulus, W., Riederer, P., Stachelberger, H., Youdim, M. B., Ben-Shachar, D. **Iron and ferritin in substantia nigra in Parkinson's disease.** *Adv Neurol.* 60 (1993) 267-272.
- Jeong, S. Y., David, S. **Glycosylphosphatidylinositol-anchored Ceruloplasmin Is Required for Iron Efflux from Cells in the Central Nervous System.** *J Biol Chem.* 278 (2003) 27144-27148.
- Kalaria, R. N., Sromek, S. M., Grahovac, I., Harik, S. I. **Transferrin receptors in rat human brain and cerebral microvessels and their status in Alzheimer's disease.** *Brain Res.* 585 (1992) 87-93.
- Kaur, C.; Ling, E. A. **Transient expression of transferrin receptors and localization of iron in amoeboid microglia in postnatal rats.** *J. Anat.* 186 (1995) 165-173.
- Kaur, D., Yantiri, F., Rajagopalan, S., Kumar, J., Mo, J. Q., Boonplueang, R., Viswanath, V. Jacobs, R., Yang, L., Beal, M. F., DiMonte, D., Volitaskis, I., Ellerby, L., Chemy, R. A., Bush, A. I., Andersen, J. K. **Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: A novel therapy for Parkinson's Disease.** *Neuron.* 37 (2003) 899-909.
- Ke, Y., Chang, Y. Z., Duan, X. L., Du, J. R., Zhu, L., Wang, K., Yang, X. D., Ho, K. P., Qian, Z. M. **Age-dependent and iron-independent expression of two mRNA isoforms of divalent metal transporter 1 in rat brain.** *Neurobiol Aging.* 26 (2005) 739-748.
- Kienzl, E., Puchinger, L., Jellinger, K., Linert, W., Stachelberger, H. Jameson, R. F. **The role of transition metals in the pathogenesis of Parkinson's disease.** *J Neurol Sci.* 134 (1995) 69-78.

- Kim, D. W., Kim, K. Y., Choi, B. S., Youn, P., Ryu, D. Y., Klaassen, C. D., Park, J. D. **Regulation of metal transporters by dietary iron, and the relationship between body iron levels and cadmium uptake.** *Arch Toxicol.* 81 (2007) 327-334.
- Kim, H. Y., Klausner, R. D., Rouault, T. A. **Translational repressor activity is equivalent and is quantitatively predicted by in vitro RNA binding for two iron-responsive element binding proteins, IRP1 and IRP2.** *J Biol Chem.* 270 (1995) 4983-4986.
- Kühn, L. C., Schulman, H. M., Ponka, P. **Iron-transferrin requirements and transferrin receptor expression in proliferating cells.** In *Iron Transport and Storage* 1990; edited by Ponka P, Schulman H. M., Woodworth R. D. Boca Raton, *CRC Press* (1990) 149–191.
- Lawson, D. M., Treffry, A., Artymiuk, P. J., Harrison, P. M., Yewdall, S. J., Luzzago, A., Cesareni, G., Levi, S., Arosio, P. **Identification of the ferroxidase centre in ferritin.** *FEBS Lett.* 254 (1989) 207-210.
- Levi, S., Santambrogio, P., Cozzi, A., Rovida, E., Corsi, B., Tamborini, E., Spada, S., Albertini, A., Arosio, P. **The role of the L-chain in ferritin iron incorporation: studies of homo and heteropolymers.** *J Mol Biol* 238 (1994) 649-654.
- Lieu, P.T., Heiskala, M. Peterson, P. A., Yang, Y. **The roles of iron in health and disease.** *Mol Aspects Med.* 22 (2001) 1-87.
- Lynch, T., Chemy R. A., Bush, A. I. **Oxidative processes in Alzheimer's disease: the role of Abeta-metal interactions.** *Exp Gerontol.* 35 (2000) 445-451.
- Markelonis, G. J., Oh, T. H., Park, L. P., Cha, C. Y., Sofia, C. A., Kim, J. W., Azari, P. **Synthesis of transferrin receptor by cultures of embryonic chicken spinal neurons.** *J Cell Biol.* 100 (1985) 8-17.
- Martin, W. R., Ye, F. Q., Allen, P. S. **Increasing striatal iron content associated with normal aging.** *Mov Disord.* 13 (1998) 281-286.
- Martini, L. A., Tchack, L., Wood, R. J. **Iron Treatment Downregulates DMT1 and IREG1 mRNA Expression in Caco-2 Cells.** *J Nutr.* 132 (2002) 693-696.
- Meyron-holtz, E. G., Ghosh, M. C., Iwai, K., La Vaute, T., Brazzolotto, X., Berger, U. V., Land, W., Ollivierre-Wilson, H., Grinberg, A., Love, P., Rouault, T. A. **Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis.** *EMBO J.* 23 (2004) 386-395.
- Miyajima, H., Nishimura, Y., Mimguchi, K., Sakamoto, M., Shimizu, T., Honda, N. **Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration.** *Neurology.* 37 (1987) 761-767.

- Miyajima, H., Fujimoto, M., Kohno, S., Kaneko, E., Gitlin, D. **CSF abnormalities in patients with aceruloplasminemia.** *Neurology.* 51 (1998) 1188-1190.
- Moos, T. **Age-dependent uptake and retrograde axonal transport of exogenous albumin and transferrin in rat motor neurons.** *Brain Res.* 672 (1995a) 14-23.
- Moos, T. **Increased accumulation of transferrin by motor neurons of the mouse mutant progressive motor neuronopathy (pmn/pmn).** *J Neurocytol.* 24 (1995b) 389-398.
- Moos, T., Morgan, E. H. Transferrin and Transferrin Receptor Function in Brain Barrier Systems. *Cell Mol Neurobiol.* 20 (2000) 77-95.
- Morris, C. M., Candy, J. M., Bloxham, C. A., Edwardson, J. A. **Distribution of transferrin receptors in relation to cytochrome oxidase activity in the human spinal cord, lower brainstem and cerebellum.** *J Neurol Sci* 111 (1992) 158-172.
- Mukhopadhyay, C. K., Attieh, Z. K., Fox, P. L. **Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake.** *Science.* 279 (1998) 714-717.
- Mullner, E. W., Rothenberger, S., Muller, A. M., Kuhn, L. C. **In vivo and in vitro modulation of the mRNA-binding activity of iron regulatory factor. Tissue distribution and effects of cell proliferation, iron levels and redox state.** *Eur J Biochem.* 208 (1992) 597-605.
- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T. and Kaplan, J. **Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization.** *Science*, 306 (2004) 2090-2093.
- Nemeth, E., Ganz, T. **Regulation of iron metabolism by hepcidin.** *Annu Rev Nutr.* 26 (2006) 323-342.
- Oh, T.H., Markelonis, G. J., Royal, G. M., Bregman, B. S. **Immunocytochemical distribution of transferrin and its receptor in the developing chicken nervous system.** *Brain Res.* 30 (1986) 207-220.
- Orita, T., Akimura, T., Nichizaki, T., Kamiryo, T., Ikeyama, Y., Aoki, H., Ito, H. **Transferrin receptors in injured brain.** *Acta Neuropathol.* 79 (1990) 686-688.
- Osaki, S., Johnson, D. A. Frieden, E. **The possible role of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum.** *J Biol Chem.* 241 (1996) 11490-11491.
- Pardridge, W. M., Eisenberg, J. Yang, J. **Human blood-brain barrier transferrin receptor.** *Metabolism* 36 (1987) 892-895.

- Park C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., Ganz, T. **Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver.** *J Biol Chem.* 276 (2001) 7806-7810.
- Patel, B. N., Dunn, R. J., David, S. **Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositolanchored form of ceruloplasmin in mammalian.** *J Biol Chem.* 275 (2000) 4305-4310).
- Patel, B. N., Dunn, R. J., Jeong, S. Y., Zhu, Q., Julien, J., David, S. **Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury.** *J. Neurosci.* 22 (2002) 6578-6586.
- Patino, M. M., Walden, W. E. **Cloning of a functional cDNA for the rabbit ferritin mRNA repressor protein: demonstration of a tissue specific pattern of expression.** *J Biol Chem.* 267 (1992) 19011-19016.
- Pigeon, C. Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., Loréal, O. **A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload.** *J Biol Chem.* 267 (2001) 7811-7819.
- Polla, A. S., Polla L. L., Polla, B. S. **Iron as the malignant spirit in successful ageing.** *Ageing Res Rev.* 2 (2003) 25-37.
- Qian, Z. M., Shen, X. **Brain iron transport and neurodegeneration.** *Trends Mol Med.* 7 (2001) 103-108.
- Reilly, C. A., Aust, S. D. **Stimulation of the ferroxidase activity of ceruloplasmin during iron loading into ferritin.** *Arch Biochem Biophys.* 347 (1997) 242-248.
- Risau, W., Hallmann, R., Albrecht, U. **Differentiation-dependent expression of proteins in brain endothelium during development of the blood-brain barrier.** *Dev Biol.* 117 (1986) 537-545.
- Robb, A., Wessling-resnick, M. **Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin.** *Blood.* 104 (2004) 4294-4299.
- Rossi, E. **Hepcidin- the iron regulatory hormone.** *Clin Biochem Rev.* 26 (2005) 47-49.
- Rouault, T. A., Tang, C. K., Kaptain, S., Burgess, W. H., Haile, D. J., Samaniego, F., McBride, O. W., Harford, J. B., Klausner, R. D. **Cloning of the cDNA encoding an RNA regulatory protein – the human iron responsive element-binding protein.** *Proc Natl Acad U S A.* 87 (1990) 7958-7962.
- Rouault, T. A. **Systemic Iron Metabolism: A Review and Implications for Brain Iron Metabolism.** *Pediatr Neurol.* 25 (2001) 130-137.
- Rouault T. A., Cooperman S. **Brain iron metabolism.** *Semin Pediatr Neurol.* 13 (2006) 142-148.

- Roy, C. N., Andrews, N. C. **Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers.** *Hum Mol Genet.* 10 (2001) 2181-2186.
- Salzer, J. L., Lovejoy, L., Linder, M. C., Rosen, C. **Ran-2, a glial lineage marker is a GPI-anchored form of ceruloplasmin.** *J Neurosci Res.* 54 (1998) 147-157.
- Santamaria, R., Bevilacqua, M. A., Maffettone, C., Irace, C., Iovine, B., Colonna, A. **Induction of H-ferritin synthesis by oxalomalate is regulated at both the transcriptional and post-transcriptional levels.** *Biochim Biophys Acta.* 1763 (2006) 815-822.
- Schenck, J. F., Zimmerman, E. A. **High-field magnetic resonance imaging of brain iron: birth of a biomarker?** *NMR Biomed.* 17 (2004) 433-445.
- 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 (2001) 77-85.
- Smith, S. R., Cooperman, S., Lavaute, T., Tresser, N., Ghosh, M., Meyron-Holtz, E., Land, W., Ollivierre, H., Jortner, B., Switzer III, R., Messing, A., Rouault, T. A. **Severity of neurodegeneration correlates with compromise of iron metabolism in mice with iron regulatory protein deficiencies.** *Ann NY Acad Sci.* 1012 (2004) 83.
- Stankiewicz, J., Panter, S. S., Neema, M., Arora, A. Batt, C. E., Bakshi, R. **Iron in Chronic Brain Disorders: Imaging and Neurotherapeutic Implications.** *Neurotherapeutics.* 4 (2007) 371-386.
- Taylor, E. M., Morgan, E. H. **Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat.** *Brain Res Dev Brain Res.* 55 (1990) 35-42.
- Taylor, E. M., Crowe, A., Morgan, E. H. **Transferrin and iron uptake by the brain: effects of altered iron status.** *J Neurochem.* 57 (1991) 1584-1592.
- Tchernitchko, D., Bourgeois, M. Martin, M. E., Beaumont, C. **Expression of the two mRNA isoforms of the iron transporter Nrmap2/DMT1 in mice and function of the iron responsive element.** *Biochem J.* 363 (2002) 449-455.
- Theil, E. C. **Coordinating responses to iron and oxygen stress with DNA and mRNA promoters: The ferritin story.** *Biomaterials.* 20 (2007) 513-521.
- Thompson, K., Menzies, S., Muckenthaler, M., Torti, F. M., Wood, T., Torti, S. V., Hentze, M. W., Beard, J., Connor, J. **Mouse brains deficient in H-ferritin have normal iron concentration but a protein profile of iron deficiency and increased evidence of oxidative stress.** *J Neurosci Res.* 71 (2003) 46-63.

- Tong, X., Kawabata, H., Koeffler, H. P. **Iron deficiency can upregulate expression of transferrin receptor at both the mRNA and protein level.** *Br J Haematol.* 116 (2002) 458–464.
- Wang, Q., Du, F., Qian, Z. M., Ge, X. H., Zhu, L., Yung, W. H., Yang, L., Ke, Y. **Lipopolysaccharide induces a significant increase in expression of iron regulatory hormone hepcidin in the cortex and substantia nigra in rat brain.** *Endocrinology.* 149 (2008) 3920-3925.
- 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 the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and blood-brain barrier.** *Brain Res.* 1001 (2004) 108-117.
- Yoshida, K., Furihata, K., Takeda, S., Nakamura, A., Yamamoto, K., Morita, H., Hiyamuta, S., Ikeda, S., Shimizu, N., Yanagisawa, N. **A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans.** *Nat Genet.* 9 (1995) 267-272.
- Young, S. P., Fahmy, M. Golding, S. **Ceruloplasmin, transferrin and apotransferrin facilitate iron release from human liver cells.** *FEBS Lett.* 411 (1997) 93-96.
- Yu, Y., Radisky, E., Leibold, E. A. **The iron-responsive element binding protein: purification, cloning and regulation in rat liver.** *J Biol Chem.* 267 (1992) 19005-19010.
- Zecca, L., Gallorini, M., Schünemann, V., Trautwein, A. X., Gerlach, M., Riederer, P., Vezzoni, P., Tampellini, D. **Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes.** *J Neurochem.* 76 (2001) 1766-1773.
- Zecca, L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R., Crichton, R. R. **Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders.** *Nat Rev Neurosci.* 5 (2004) 863-873.
- Zechel, S., Huber-Wittmer, K., van Bohlen und Halbach, O. **Distribution of the iron-regulating protein hepcidin in the murine central nervous system.** *J Neurosci Res.* 84 (2006) 790-800.
- Zhang, P., Land, W., Lee, S., Juliani, J., Lefman, J., Smith, S. R., Germain, D., Kessel, M., Leapman, R., Rouault, T. A., Subramaniam, S. **Electron tomography of degenerating neurons in mice with abnormal regulation of iron metabolism.** *J Struct Biol.* 150 (2005) 144-153.

## **7 ANEXO**

**Comprovante de Submissão do Segundo artigo científico.**

**Submission Confirmation**

ees.brb.0.6348b.f40b9b7e@eesmail.elsevier.com em nome de Brain Research Bulletin

**Para:** Nadja Schroder

**Cc:**

---

Dear Nadja,

Your submission entitled "Age and neonatal iron overload alter mRNA expression of DMT1 and ceruloplasmin in rat brain regions" has been received by Brain Research Bulletin

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/brb/>.

Your username is: NSchroder

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/BRB/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/BRB/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Brain Research Bulletin

Ms. Ref. No.: BRB-D-10-00016

Title: Age and neonatal iron overload alter mRNA expression of DMT1 and ceruloplasmin in rat brain regions  
Brain Research Bulletin

Dear Nadja,

Your submission entitled "Age and neonatal iron overload alter mRNA expression of DMT1 and ceruloplasmin in rat brain regions" will be handled by Section Editor Ian S. Zagon, Ph.D..

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/brb/>.

Your username is: NSchroder

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/BRB/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/BRB/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Brain Research Bulletin