

PUCRS

FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LUISA AZAMBUJA ALCALDE

ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DO FATOR NEURÓTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO  
(BDNF) E DO METABOLISMO GLICOLÍTICO CEREBRAL ATRAVÉS DO  
ESCANEAMENTO COM MICROPET NA DISFUNÇÃO COGNITIVA INDUZIDA PELO  
ACÚMULO DE FERRO CEREBRAL

Porto Alegre

2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul



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

**LUISA AZAMBUJA ALCALDE**

**Análise do envolvimento do Fator Neutrófico Derivado do Cérebro (BDNF)  
e do metabolismo glicolítico cerebral através do escaneamento com  
microPET na disfunção cognitiva induzida pelo  
acúmulo de ferro cerebral**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadja Schröder  
Orientadora

Porto Alegre  
2017

### Ficha Catalográfica

A346   Alcalde, Luisa Azambuja

Análise do envolvimento do Fator Neutrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e do metabolismo glicolítico cerebral através do escaneamento com microPET na disfunção cognitiva induzida pelo acúmulo de ferro cerebral / Luisa Azambuja Alcalde . – 2017.

73 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Nadja Schroder.

1. deferiprona. 2. ferro. 3. doenças neurodegenerativas. 4. BDNF. 5. memória de reconhecimento. I. Schroder, Nadja. II. Título.

LUISA AZAMBUJA ALCALDE

**Análise do envolvimento do Fator Neutrófico Derivado do Cérebro (BDNF)  
e do metabolismo glicolítico cerebral através do escaneamento com  
microPET na disfunção cognitiva induzida pelo  
acúmulo de ferro cerebral**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nadja Schröder.

Porto Alegre

2017

## AGRADECIMENTOS

Esse período do mestrado foi marcado por desafio, perseverança, construção e amadurecimento.

A conclusão dessa caminhada somente foi possível porque fui abençoada no instante que encontrei pessoas altamente capacitadas e qualificadas para a realização deste projeto.

Meu respeitoso agradecimento à minha orientadora, Nadja Schröder, por ser minha primeira guia no mundo da pesquisa e da ciência e por tudo que me ensinou desde a iniciação científica. Para mim, és um exemplo de mulher, de profissional, de dedicação, de inteligência, de sabedoria e de paciência. Serei sempre grata pelo seu incansável suporte.

Agradeço aos colegas de laboratório por toda a ajuda fornecida durante o desenvolvimento dos experimentos, em especial à profissional Betânia Souza de Freitas. Sem o teu esforço nada teria se tornado realidade. Muito obrigada.

Agradeço ao meu amado esposo, Lucas, pelo amor, incentivo, compreensão e encorajamento, durante todo este período.

Agradeço aos meus pais, Maria Helena e Luis Carlos, e meu irmão, Luis Fernando, por respeitarem as minhas escolhas, por compreenderem a minha ausência e pelo constante apoio.

Agradeço ao Centro de Pesquisa Pré-Clínica do Instituto do Cérebro (InsCer) e ao Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) pela colaboração.

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

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

## RESUMO

O ferro é essencial no cérebro neonatal para o desenvolvimento neurológico normal e para o estabelecimento da concentração de ferro no cérebro adulto, já que a absorção de ferro é máxima durante o período neonatal. Acredita-se que a sobrecarga de ferro contribui para o desenvolvimento da neurodegeneração, na exacerbação das taxas normais de apoptose, em grande parte devido à sua participação na reação de Fenton e à produção de espécies reativas de oxigênio. Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que o tratamento com ferro no período neonatal induz alterações significativas de memória, bem como aumento em parâmetros de estresse oxidativo e em níveis de proteínas apoptóticas. Recentemente, também demonstramos que esse tratamento reduz os níveis de sinaptofisina (um marcador sináptico) no hipocampo. O BDNF é a neurotrophina mais abundante no SNC dos mamíferos, tendo sua ação mediada pelo receptor tirosina cinase de alta afinidade (TrkB). Atualmente, estudos tem demonstrado que o BDNF apresenta um papel crítico na formação da memória de longa duração. Assim, o presente estudo teve dois objetivos principais. O primeiro objetivo foi verificar o envolvimento do BDNF nos déficits de memória induzidos pelo acúmulo de ferro, além de verificar se o tratamento com ferro alteraria os níveis de BDNF e a expressão de seus receptores, TrkB e p75. Os ratos Wistar machos receberam veículo ou ferro carbonila (30 mg/kg) do 12º ao 14º dia pós-natal. Na idade adulta, os animais foram tratados por 21 dias com o quelante de ferro, deferiprona (125 mg/kg/dia), e submetidos à tarefa de reconhecimento do objeto. A análise da memória foi realizada através do índice de reconhecimento, expresso pela razão entre a quantidade de tempo gasto na exploração do objeto novo sobre o tempo total gasto explorando ambos os objetos. Os níveis protéicos de BDNF e a expressão gênica de seus receptores no hipocampo foram quantificados através de ELISA e PCR real time, respectivamente. O segundo objetivo foi avaliar o metabolismo glicolítico cerebral realizado através do escaneamento no Triumph™ microPET e a captação de 18F-FDG utilizando o software PMOD v3.5 e Fusion Toolbox. Para este experimento, foram incluídos 4 grupos experimentais: os grupos que receberam veículo ou ferro no período neonatal que foram divididos em subgrupos que receberam veículo ou deferiprona durante 21 dias consecutivos na idade adulta. Os ratos tratados com ferro no período neonatal apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de BDNF no hipocampo, sem alteração da expressão gênica dos receptores TrkB e p75. A deferiprona foi capaz de reverter os déficits de memória de reconhecimento, bem como aumentar os níveis protéicos de BDNF no hipocampo, melhorando os efeitos induzidos pelo tratamento com ferro no período neonatal. Não foram observadas alterações no metabolismo da glicose cerebral nos animais tratados com ferro e/ou deferiprona. Os presentes achados fornecem embasamento para uso da deferiprona em ensaios clínicos, incluindo pacientes com doença de Alzheimer.

*Palavras-chaves:* deferiprona, ferro, doenças neurodegenerativas, BDNF, memória de reconhecimento, metabolismo glicolítico cerebral, microPET.

## ABSTRACT

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is the most abundant neurotrophin in the mammalian Central Nervous System, and plays a key role in development and physiology, as well as in pathological states. *Post-mortem* studies demonstrated that BDNF levels are reduced in the brains of patients affected by neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). Iron accumulation has consistently been associated to the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In rats, neonatal iron overload induces memory deficits, and increases oxidative stress and apoptotic markers, and decreases the expression of the synaptic marker, synaptophysin. Deferiprone (DFP) is an oral iron chelator used for the treatment of systemic iron overload disorders, and has recently been tested in Parkinson's disease patients. Here, we aimed to determine the effects of iron overload on BDNF levels and glucose metabolism, measured by  $^{18}\text{F}$ FDG uptake using positron emission tomography. Moreover, we intended to characterize the effects of DFP on iron-induced memory deficits and BDNF levels, as well as on glucose metabolism. Rats received iron or vehicle at postnatal days 12-14 and when adults, received chronic DFP or water. Recognition memory was tested 19 days after the beginning of chelation therapy.  $^{18}\text{F}$ FDG uptake was performed 24 h after the last day of treatment. Another subset of animals was sacrificed 24 h after the last day of treatment for BDNF measurements, and TrkB and p75 expression analysis. DFP was able to restore memory impairment and increase hippocampal BDNF levels, ameliorating iron-induced effects. The present findings support the use of DFP in clinical trials including AD patients.

**Keywords:** deferiprone, iron, recognition memory, BDNF, neurodegenerative disorders, PET scanning.



## LISTA DE ABREVIATURAS

- APP** – proteína precursora de amiloide, sigla do termo em inglês, *amyloid precursor protein*
- A $\beta$**  - beta amiloide, sigla do termo em inglês *amyloid beta*
- AChE** - acetilcolinesterase
- BDNF** – Fator neurotrófico derivado do cérebro, sigla derivada dos termos em inglês, *brain derived neurotrophic factor*
- BBB** – barreira hemato-encefálica, sigla do termo em inglês, *blood-brain barrier*
- Cp** - ceruloplamina
- <sup>11</sup>C-PiB** - O [N-Metil-**<sup>11</sup>C]2-(4'-metilaminofenil)-6-hidroxibenzotiazole ("Pittsburg compound B", **<sup>11</sup>C-PiB**), é uma molécula marcada com um isótopo radioativo do carbono (**<sup>11</sup>C)****
- DA** - Doença de Alzheimer
- DFP** – deferiprona (DFP, Ferriprox, Apotex Inc. Ontário, Canadá)
- DH** - Doença de Huntington
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico, sigla do inglês *deoxyribonucleic acid*
- DP** - Doença de Parkinson
- FDA** - sigla do termo em inglês *Food and Drug Administration*
- Fpn** - ferroportina
- Fe<sup>2+</sup>** - ferro reduzido para a sua forma ferrosa
- Fe<sup>3+</sup>** - ferro oxidado para a sua forma férrica
- FDG** - fluoro-2-deoxi-D-glicose
- <sup>18</sup>F-FDG** – molécula de fluoro-2-deoxi-D-glicose marcada com o isótopo radioativo do flúor (**<sup>18</sup>F**).
- IRP** - proteínas reguladoras do ferro, sigla dos termos em inglês *iron regulatory proteins*
- IRE** - elementos reguladores do ferro, sigla dos termos em inglês *iron regulatory elements*
- LTM** – memória de longa duração, sigla do inglês *long-term memory*
- LTP** – potenciação de longa duração, sigla do inglês *long-term potentiation*
- L-LTP** - fase tardia da LTP (sigla do inglês *late-long-term potentiation*)
- microPET** – sigla do termo em inglês *positron emission tomography (PET)*, tecnologia designada para aquisição de imagem molecular em roedores ou pequenos animais de laboratório.
- mBDNF** - BDNF maduro

**MPTP** - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrapiridina

**mRNA** - Ácido ribonucléico mensageiro, sigla do inglês *Messenger ribonucleic acid*

**NGF** - sigla derivada dos termos em inglês, *nerve growth factor*

**PET e PET/CT** – tomografia por emissão de pósitrons e tomografia computadorizada, siglas derivadas dos termos em inglês, *positron emission tomography (PET) scan and an x-ray computed tomography (CT) scan*

**p75<sup>NTR</sup>** – receptor de neurotrofinas p75, sigla do termo em inglês, *p75 neurotrophin receptor*

**pró-BDNF** - Proteína precursora de mBDNF

**RNA** - Ácido ribonucléico, sigla do inglês *ribonucleic acid*

**ROS** – espécies reativas de oxigênio, sigla do termo em inglês, *reactive oxygen species*

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**TrKB** – sigla derivado do termo em inglês, *tropomyosin receptor kinase B*

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Acúmulo de ferro no cérebro associado à neurodegeneração.....	11
1.1.2 Modelo de disfunção cognitiva induzida pelo tratamento com ferro.....	13
1.1.3 BDNF (Fator Neurotrófico derivado do cérebro).....	16
1.1.3.1 BDNF e doenças neurodegenerativas.....	18
1.1.4 Análise do metabolismo glicolítico cerebral com microPET.....	19
<b>1.2 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Objetivo Geral .....	22
1.2.2 Objetivos Específicos .....	22
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1 CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO</b>	
<b>1 – Comprovante de aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA .....</b>	<b>72</b>

## 1. CAPÍTULO 1

## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 O acúmulo de ferro no cérebro associado à Neurodegeneração

O ferro é o metal de transição mais abundante do corpo humano. As maiores quantidades de ferro no organismo são encontradas no fígado, seguido pelo cérebro. As funções biológicas do ferro baseiam-se no seu potencial REDOX, que permite sua interconversão entre o cátion divalente, ou ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e o cátion trivalente, ou férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Schröder et al, 2013). Atua em processos metabólicos como a fosforilação oxidativa; síntese de DNA, RNA e proteínas; atua como cofator para várias enzimas (por exemplo, a monoamina oxidase e outras enzimas degradativas), e na síntese de mielina, no metabolismo de óxido nítrico e no transporte de oxigênio (Janetzky et al., 1997; Youdim et al., 1991; Crichton et al., 2008).

O cérebro é protegido por uma barreira vascular relativamente pouco permeável, o que limita o acesso aos nutrientes do plasma, tais como o ferro. A barreira hemato-encefálica (BBB, sigla do termo em inglês, *blood-brain barrier*) controla a captação do ferro para dentro do cérebro pela regulação da expressão de receptores de proteínas de transporte, tais como Transferrina, Receptor de transferrina e ferritina. Dessa forma, o transporte de ferro no cérebro, a partir do plasma, envolve principalmente o ciclo celular da transferrina, utilizando a endocitose mediada por receptores de transferrina pelas células epiteliais que revestem a BBB, embora o mecanismo exato de transferência de ferro ainda seja incerto (Abbott et al., 2009; Andrews e Schmidt, 2006). Em seguida, as células endoteliais do capilar cerebral absorvem o ferro ligado à transferrina. Isto é seguido pela liberação de ferro do endossomo no fluido intersticial cerebral pela ferroportina exportadora de ferro (fpn) que medeia a liberação do ferro em conjunto com ceruloplasmina (Cp) e que deve oxidar o  $\text{Fe}^{2+}$  transportado pela fpn para  $\text{Fe}^{3+}$  antes da liberação para o meio extracelular (Wu et al., 2004; Harris et al., 1999). Uma vez no interstício do cérebro, o ferro pode se ligar a moléculas grandes, tais como, a transferrina ou a lactoferrina.

Está amplamente aceito que o ferro é essencial no cérebro neonatal para o desenvolvimento neurológico normal e para o estabelecimento da concentração de ferro no cérebro adulto, já que a absorção do ferro no cérebro é máxima durante o período neonatal (Moos, 2002; Connor et al., 2005). Sabe-se que, durante o desenvolvimento cerebral, o ferro

está presente também na substância branca, onde é encontrado em altos níveis no oligodendrocítos para a formação de mielina. Uma vez que o ferro é absorvido pelo cérebro durante o período de desenvolvimento, é retido no cérebro sem retornar para o plasma (Dwork et al., 1990).

O acúmulo de ferro em regiões seletivas do cérebro (córtex, hipocampo e substância nigra) pode estar implicado na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (Dexter et al., 1991; Sengstock et al., 1993; Kienzl et al., 1995) e evidências crescentes sugerem que a neurotoxicidade induzida pelo ferro está relacionada com o dano oxidativo.

Radicais livres são moléculas que possuem um número ímpar de elétrons na última camada de valência, incluindo os metais de transição, como o ferro. O estresse oxidativo geralmente descreve a condição na qual as defesas antioxidantes são inadequadas para desintoxicar completamente os radicais livres gerados, em geral secundário à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla dos termos em inglês, *reactive oxygen species*) e a principal consequência é o dano macromolecular nas células (Dugan and Kim-Han, 2006).

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

Verificou-se que em doenças neurológicas, tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, demência com corpos de Lewy, e doença de Huntington, o acúmulo de ferro ocorre em regiões mais suscetíveis à degeneração neuronal. Concentrações aumentadas de ferro no envelhecimento podem ser causadas por vários fatores, incluindo a permeabilidade da barreira hematoencefálica, inflamação, redistribuição do ferro no SNC e alterações na homeostasia do

ferro. A razão do ferro se acumular no cérebro é ainda uma questão de controvérsia. Alguns autores levantaram a hipótese de que tanto fatores genéticos, como não genéticos, podem estar envolvidos (Dexter et al, 1987; Dexter et 1991; Hirsch, 1991 e Schroder et al, 2013).

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

### 1.1.2 Modelo de disfunção cognitiva induzida pelo tratamento com ferro

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

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

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

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

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

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

A memória de reconhecimento de objetos pode depender, pelo menos em parte, da integridade do circuito do estriado, o que é consistente com o resultado do estudo anterior em que a deficiência da memória de reconhecimento induzida pelo ferro foi associada com a atividade alterada de acetilcolinesterase (AChE) no corpo estriado. Apesar de anos de



investigação, ainda não se sabe por que os níveis de ferro são anormalmente elevados em algumas regiões do cérebro em doenças neurodegenerativas. Além disso, não está claro se o acúmulo de ferro no cérebro desempenha um papel causal na neurodegeneração ou se é uma consequência do processo da doença. Foi sugerido que o acúmulo de ferro no cérebro prejudica a transmissão colinérgica o que pode ter implicações para a perda de memória observada em ratos que receberam sobrecarga de ferro neonatal. Com base nisso, modelos animais podem ser considerados ferramentas importantes para a investigação de mecanismos multifatoriais que interagem para produzir o declínio da memória observada em pacientes com doenças neurodegenerativas (Perez et al., 2010).

De Lima et al. (2007) mostraram que a terapia com quelante de ferro na idade adulta foi capaz de reverter o comprometimento cognitivo induzido pela sobrecarga de ferro no período neonatal em ratos. Os ratos tratados com ferro neonatal foram divididos em três grupos experimentais, sendo administrado por via intraperitoneal a deferoxamina (0,0, 30,0 ou 300,0 mg/kg). Os animais que receberam a maior dose de deferoxamina mostraram memória de reconhecimento normal, indicando que a terapia de quelação com o ferro na idade adulta foi capaz de reverter o déficit cognitivo induzido pela sobrecarga de ferro neonatal em ratos. Além disso, outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa revelou que a terapia com deferoxamina reverteu o prejuízo na memória de reconhecimento e diminuiu o dano oxidativo às proteínas no córtex e no hipocampo causada pelo envelhecimento dos ratos (De Lima et al., 2008).

Selecionamos, no presente estudo, um outro quelante de ferro, deferiprona (DFP, Ferriprox, Apotex Inc. Ontário, Canadá), que além de já ser aprovado pela FDA para tratamento de distúrbios de sobrecarga sistêmica de ferro (como talassemia maior), atravessa a barreira hematoencefálica (Fredenburg et al., 1996) e já mostrou evidência na eficácia clínica da doença de Parkinson (Devos et al., 2014). Em 2014, Devos e colaboradores relataram que o DFP reduziu significativamente o ferro lábil e os danos biológicos no modelo induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrapiridina (MPTP) da doença de Parkinson, enquanto aumentou a dopamina estriatal, conferindo duas vezes mais proteção que a desferoxamina administrada por via intraperitoneal. Eles também investigaram os efeitos do DFP em um estudo piloto com pacientes com DP de estágio inicial e mostraram que após 6 meses de tratamento com DFP houve uma diminuição significativa no acúmulo de ferro na substância negra, bem como um aumento na glutatona peroxidase e na atividade da superóxido dismutase no fluido cérebro-espinhal, em pacientes tratados com DFP, e um desempenho motor significativamente melhor

em 6 ou 12 meses de tratamento com DFP. Assim, no presente trabalho nos propusemos a investigar os efeitos do tratamento crônico com DFP sobre os danos de memória induzidos por ferro neonatal. Os ratos adultos (2-3 meses) receberam uma dose oral diária (gavagem) de água destilada ou DFP (125,0 mg/ kg/ dia) diluído em água destilada durante 21 dias consecutivos. A dose utilizada foi selecionada com base em estudos previamente publicados (Wang et al., 2016, Zhao et al., 2015).

### 1.1.3 BDNF (Fator Neurotrófico derivado do cérebro)

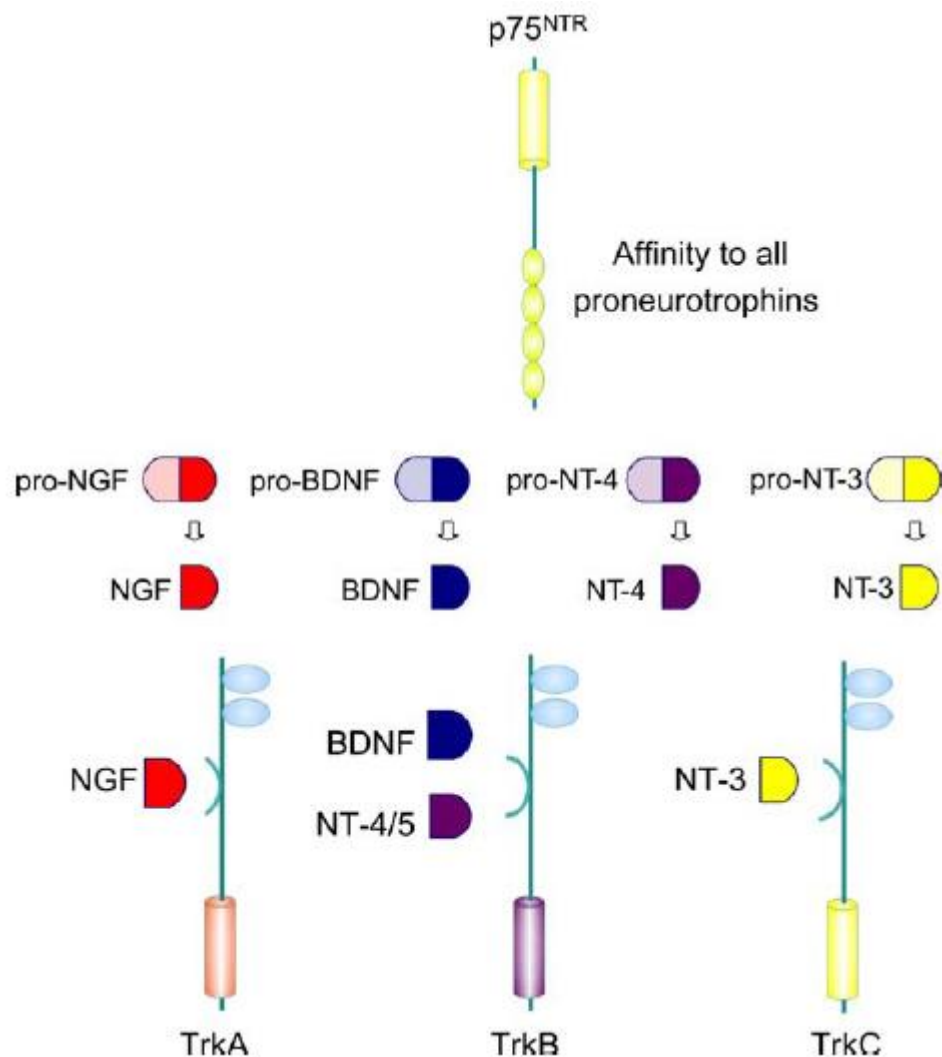
O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, sigla derivada do termo em inglês, *brain derived neurotrophic factor*) é um dos membros da família de proteínas homólogas conhecidas como neurotrofinas. Foi a segunda neurotrofina a ser identificada e caracterizada (Barde et al,1982), antecedido pelo fator de crescimento do nervo (NGF, sigla derivada dos termos em inglês, *nerve growth factor*).

O BDNF é a neurotrofina mais abundante e se encontra amplamente distribuída no SNC dos mamíferos (Balaratnasingam et al., 2012). O BDNF apresenta papel central no desenvolvimento, fisiologia e patologia do sistema nervoso, como também em processos relacionados à plasticidade cerebral, tais como a memória e o aprendizado (Balaratnasingam et al., 2012). Além disso, atualmente, a ação desta neurotrofina no SNC dos adultos está sendo extensivamente estudada, pois tem sido demonstrado que o BDNF tem um papel crítico na potenciação de longa duração (LTP, sigla do inglês *long-term potentiation*), um tipo de plasticidade sináptica que é considerado um modelo de formação de memória de longa duração (LTM, sigla do inglês *long-term memory*) (Mattson., 2008).

A ação celular do BDNF é mediada por dois receptores: um receptor tirosina cinase de alta afinidade (TrkB) e um receptor pan-neurotrófico de baixa afinidade (p75<sup>NTR</sup>) (Fig 1). Atráves dessa via tirosina cinase, o BDNF atua como promotor de crescimento e regeneração neuronal, crescimento e remodelação axonal e dentrítica, formação do citoesqueleto, formação de sinapses, bem como apresenta papel chave na prevenção da apoptose neuronal. Por exemplo, sabe-se que o BDNF e a ativação do seu receptor TrkB é essencial na fase tardia da LTP (L-LTP), que promove alterações estruturais na sinapse e induz à síntese de proteínas (Balaratnasingam et al., 2012; Longo et al., 2007; Mattson,2008).

A expressão do gene do BDNF é altamente regulada com 11 exons e 9 promotores funcionais, o que permite cerca de 34 transcrições em resposta a vários estímulos (Allen et al., 2013).

A proteína BDNF é sintetizada como uma proteína precursora, pré-pró BDNF, que depois da clivagem, resulta numa proteína de 32kDa pró-BDNF. A pró-BDNF é tanto clivada proteolicamente dentro da célula por enzimas, como a furina, sendo secretada como BDNF maduro – 14kDa mBDNF, ou a pró-BDNF é clivada por proteases extracelulares, como as metaloproteinases e a plasmina, à mBDNF. Deste modo, os principais efeitos do BDNF são mediados através da ligação do mBDNF com o TrkB (Schindowski et al., 2008; Balaratnasingam et al., 2012).



**Figura 1.** Representação das neurotrofinas e seus receptores. (Schindowski et al., 2008)

Ao passo que as outras neurotrofinas são liberadas através da via constitutiva, o BDNF pode também ser secretado através da via atividade-dependente nas células neuronais. É amplamente aceito que a secreção do BDNF ocorre em resposta à atividade neuronal. (Schindowski et al., 2008)

Sabe-se que estímulos que induzem LTP também induzem a expressão de BDNF e outros fatores neurotróficos, no hipocampo. Entretanto, a LTP é somente induzida quando sinapses glutamatérgicas são ativadas dentro de uma faixa estreita de amplitude e frequência, isto é, baixos níveis de estimulação podem resultar depressão das sinapses, enquanto a estimulação sustentada e em altos níveis pode causar a degeneração das sinapses (Mattson, 2008). O papel essencial nos fatores neurotróficos na LTP, aprendizado e memória é sugerido em inúmeros estudos em roedores (Mattson, 2008; Balaratnasingam et al., 2012; Longo et al., 2007).

Já está estabelecido que a LTP hipocampal encontra-se prejudicada nos camundongos sem BDNF nos seus neurônios. Consequentemente, acredita-se que o BDNF aumenta a LTP no hipocampo e no córtex visual. Além disso, o BDNF liberado pelos neurônios durante a LTP pode ser reciclado e usado para a manutenção de LTP, atuando como papel importante na plasticidade sináptica (Mattson, 2008). Nagahara et al., 2009 mostraram em um modelo de ratos idosos (24 meses de idade) que a infusão de BDNF no córtex medial entorrinal por 28 dias melhorou significativamente o aprendizado e a memória espacial no labirinto aquático de Morris.

#### 1.1.3.1 BDNF e doenças neurodegenerativas

Tem sido sugerido que alterações nos níveis e/ou funções do BDNF apresentam um papel importante na patofisiologia nas doenças neurodegenerativas, tal como a Doença de Alzheimer (DA). Sabemos que a DA cursa com dano progressivo da memória, julgamento e funções executivas. Embora a causa exata da doença ainda permaneça desconhecida, estudos têm revelado alterações nos níveis de BDNF nos cérebros em estudos pós-morte. A DA é caracterizada pela presença de dois marcadores de lesão: depósitos extracelulares de placas amilóides (placas AB) e os emaranhados neurofibrilares, que são acompanhados por gliose e perda neuronal, causando déficit cognitivo nestes pacientes. É conhecido que o BDNF é produzido no córtex entorrinal e no hipocampo na idade adulta, os quais são os sítios de perda neuronal na doença de Alzheimer (Balaratnasingam et al., 2012).

Vários estudos já demonstraram que os níveis de mRNA para BDNF e sua proteína encontram-se severamente reduzidos no córtex e no hipocampo em pacientes com DA (Allen et al., 2013), assim como o receptor tirosina cinase de alta afinidade (TrkB) (Allen et al., 2013) está reduzido no córtex frontal e temporal. Esses achados contribuem na hipótese de que o BDNF pode estar envolvido na patogênese da DA.

O envolvimento do BDNF em outras desordens neurodegenerativas tais como a doença de Parkinson (DP) e doença de Huntington (DH) tem recebido alguma atenção. Na DP, níveis reduzidos de proteína BDNF e seu mRNA têm sido encontrados em corpo estriado, substância nigra, e em menor extensão no cerebelo e córtex frontal (Allen et al., 2013). Entretanto, a principal característica patológica na DP é a perda de dopaminérgica de neurônios do corpo estriado, que pode ser replicada em camundongos com deleção seletiva de BDNF no mesencéfalo com fenótipo precoce da DP. Isto está de acordo com estudos anteriores que mostraram redução da expressão mRNA para BDNF em neurônios dopaminérgicos da substância nigra naqueles pacientes que sofrem de PD em até 70 % (Balaratnasingam et al., 2012). Já na DH, experimentos anteriores mostraram que o tratamento com a infusão do BDNF no estriado de ratos que expressam a proteína huntingtina resultaram em melhora nas anormalidades motoras (Balaratnasingam et al., 2012).

#### 1.1.4 Análise do metabolismo glicolítico cerebral com microPET

A técnica de imagem funcional, através da administração de moléculas marcadas com radionuclídeos emissores de pósitrons, fornece informações essencialmente funcionais ou metabólicas, porque fazem uso de moléculas que seguem atividades biológicas ou bioquímicas dentro do corpo (PET e PET/CT em oncologia; SBMN, 2011).

Está bem estabelecido que o uso da molécula de FDG (fluorodeoxiglicose) marcada com  $^{18}\text{F}$  é uma técnica de diagnóstico por imagem minimamente invasiva, amplamente aceita e utilizada para avaliar o metabolismo da glicose em diversas desordens neurodegenerativas (Ishii et al., 1998; Mosconi et al., 2008; Laforce., 2010), incluindo a DA.

Silverman et al. (2001) reportou a avaliação da  $^{18}\text{F}$ -FDG PET para o diagnóstico da DA versus outras causas de demência. Neste estudo, haviam duas populações: uma coorte prospectiva com acompanhamento clínico em longo prazo e uma coorte retrospectiva com uma referência histopatológica padrão. O estudo de coorte retrospectivo foi um estudo multicêntrico realizado a partir de um consórcio internacional de instalações clínicas que havia coletado tanto

dados histopatológicos de pacientes submetidos à avaliação para a demência quanto varreduras de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET do cérebro. Entre 97 pacientes com diagnóstico histopatológico DA, a sensibilidade de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET para o diagnóstico de DA foi de 94% ( 95 % CI, 89 % -99 % ) e a especificidade entre 41 pacientes sem DA foi de 73% (IC 95% , 60% -87 %).

Em um outro estudo de coorte, Jagust et al. (2007) reportou em uma amostra mista de 44 indivíduos com níveis variáveis de comprometimento cognitivo que se submeteram ao exame clínico inicial e à avaliação com  $^{18}\text{F}$ -FDG PET. Neste estudo, havia um período de aproximadamente quatro anos até que o diagnóstico clínico final e uma média adicional de cinco anos até a morte e autópsia. Os resultados mostraram que a sensibilidade da avaliação clínica inicial para o diagnóstico patológico da DA foi de 76%, e especificidade foi de 58%; já a varredura com  $^{18}\text{F}$ -FDG PET apresentou valores de 84% e 74%, respectivamente, e a avaliação clínica final mostrou valores de 88% e 63%, respectivamente. O diagnóstico de DA foi associado com uma probabilidade de 70% de detectar a patologia; com uma avaliação positiva no PET scan este número aumentou para 84%, e com um PET negativo este valor caiu para 31%. No geral, estes resultados indicam que a sensibilidade e especificidade do diagnóstico com as imagens  $^{18}\text{F}$ -FDG PET numa avaliação clínica inicial é semelhante ao diagnóstico clínico longitudinal em aproximadamente 4 anos. Além disso, a avaliação com  $^{18}\text{F}$ -FDG PET no diagnóstico na avaliação clínica inicial teve um substancial efeito sobre a probabilidade de encontrar a patologia de DA no exame pós-morte e foi particularmente importante quando o PETscan discordou com o diagnóstico clínico. Por exemplo, um positivo  $^{18}\text{F}$ -FDG PET scan aumentou a probabilidade da patologia da DA em 14%, se o diagnóstico clínico foi DA, mas em 35%, se o diagnóstico clínico não foi DA. Por outro lado, uma varredura PET negativa diminuiu o diagnóstico por 18 %, se o diagnóstico clínico não foi DA, mas por 39 % se o diagnóstico foi DA. Em ambas as situações, quando  $^{18}\text{F}$ -FDG PET discordou do diagnóstico clínico, o diagnóstico histopatológico correto era na verdade mais provável ser congruente com as imagens de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET do que com o diagnóstico clínico inicial (Bohnen et al., 2012; Jagust et al., 2007; Hoffman et al., 2000).

Estudos anteriores mostraram que a atividade metabólica cerebral da glicose representa um índice da função sináptica e da densidade neuronal (Sokoloff, 1977; Bohnen et al., 2012) e que alterações neuronais microestruturais extensas e irreversíveis já ocorreram no momento da manifestação clínica da DA em estruturas corticais específicas. A atividade metabólica cerebral em humanos encontra-se reduzida, predominantemente nas áreas de associação do córtex

temporoparietal, incluindo o pré-cúneos e o cíngulo posterior (Landau et al., 2010; Herholz et al, 2013).

Entretanto, estudo recente realizado em camundongos com 12 meses de vida da linhagem APPPS1-21 (Waldron et al, 2015), mostrou uma redução significativa no metabolismo glicolítico cerebral em regiões cerebrais específicas (tálamo e estriado) e, sobretudo, incongruentes às alterações corticais usualmente detectados em pacientes com DA. Este achado talvez não seja surpresa, dada a diferença inerente entre modelos animais e modelos em humanos. Além disso, outra possível explicação para a dissociação encontrada entre os marcadores de glicose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) e os traçadores amiloides específicos ( $^{11}\text{C}$ -PiB) neste estudo seria a presença de inflamação nas proximidades das placas de  $\beta$ -amiloides, já que as células da glia também utilizam a glicose como fonte de energia. Propõem-se, desse modo, que o aumento da inflamação na proximidade das placas pode mascarar a diminuição da atividade neuronal.

As alterações no metabolismo da glicose cerebral tornam-se detectáveis cerca de um a dois anos antes da instalação clínica da demência e estão intimamente relacionadas à disfunção cognitiva (Herholz et al, 2011). Assim, é possível que a disfunção cognitiva possa ser um marcador precoce não invasivo para a avaliação de fatores de risco potenciais para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, tais como DA (Schröder et al., 2013).

Assim, no presente trabalho nos propusemos a avaliar se o tratamento com ferro no período neonatal, que conforme previamente caracterizado altera funções cognitivas em ratos, também produz alterações no metabolismo glicolítico em regiões encefálicas. Ainda, foram investigados os efeitos do tratamento crônico com o quelante de ferro, deferiprona, na idade adulta, sobre o metabolismo glicolítico cerebral.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do tratamento com ferro no período neonatal e com o quelante de ferro (deferiprona) na idade adulta sobre os déficits de memória induzidas pela sobrecarga de ferro neonatal, sobre o metabolismo glicolítico cerebral através da quantificação da captação do  $^{18}\text{F}$ -FDG e sobre os níveis de BDNF e seus receptores no hipocampo.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do deferiprona sobre os déficits de memória induzidos pelo ferro.
- Avaliar os níveis do fator neurotrófico do cérebro (BDNF) no hipocampo de ratos controles e ratos tratados com ferro no período neonatal através da técnica de ELISA.
- Determinar se o tratamento com um fármaco quelante de ferro na vida adulta seria capaz de restaurar os níveis de BDNF, no caso de se verificarem alterações induzidas pelo ferro.



- Avaliar a expressão gênica do receptor tirosina quinase (TrkB) e p75 no hipocampo de ratos controles e ratos tratados com ferro no período neonatal através do *real time* PCR.
- Avaliar o metabolismo glicolítico em regiões cerebrais específicas - no hipocampo e córtex - de ratos controles e de ratos tratados com ferro no período neonatal e tratados com quelante de ferro, deferiprona, na idade adulta, através da análise quantitativa de <sup>18</sup>F-FDG com o escaneamento com o microPET.

## **CAPÍTULO 2**

**2.1 ARTIGO CIENTÍFICO**

**SUBMETIDO AO PERIÓDICO**

**Molecular Neurobiology**

Original research

**Iron chelator Deferiprone rescues memory deficits and hippocampal  
BDNF levels in an experimental model of memory impairment**

Luisa Azambuja Alcalde<sup>a</sup>, Betânia Souza de Freitas<sup>a</sup>, Gustavo Machado Dalto Barroso<sup>a</sup>,  
Pedro Castilhos de Freitas Crivelaro<sup>a</sup>, Victoria Campos Dornelles<sup>a</sup>, Henrique Gus<sup>a</sup>, Ricardo  
Tavares Monteiro<sup>a</sup>, Samuel Greggio<sup>b</sup>, Gianina Teribele Venturin<sup>b</sup>, Luiza Wilges Kist<sup>c,d</sup>,  
Jaderson Costa DaCosta<sup>b</sup>, Mauricio Reis Bogo<sup>c,d</sup>, Nadja Schröder<sup>\*a</sup>

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

b – Preclinical Research Center, Brain Institute (BraIns), Pontifical Catholic University of  
Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

c – Laboratory of Genomics and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Pontifical  
Catholic University of Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

d – Graduate Program in Medicine and Health Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

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

## **A B S T R A C T**

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is the most abundant neurotrophin in mammalian Central Nervous System, and plays a key role in development and physiology, as well as in pathological states. *Post-mortem* studies demonstrated that BDNF levels are reduced in the brains of patients affected by neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). Iron accumulation has consistently been associated to the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In rats, iron overload induces memory deficits, and increases oxidative stress and apoptotic markers, and decreases the expression of the synaptic marker, synaptophysin. Deferiprone (DFP) is an oral iron chelator used for the treatment of systemic iron overload disorders, and has recently been tested in Parkinson's disease patients. Here, we aimed to determine the effects of iron overload on BDNF levels and brain glucose metabolism, measured by FDG-positron emission microtomography (FDG-microPET). Moreover, we intended to characterize the effects of DFP on iron-induced memory deficits and BDNF levels, as well as on brain glucose metabolism. Rats received iron or vehicle at postnatal days 12-14 and when adults, received chronic DFP or water. Recognition memory was tested 19 days after the beginning of chelation therapy. FDG-microPET scanning was performed 24h after the last day

of treatment. Another subset of animals was sacrificed 24h after the last day of treatment for BDNF measurements, and *TrkB* and *p75<sup>NTR</sup>* expression analyses. DFP was able to restore memory impairment and increase hippocampal BDNF levels, ameliorating iron-induced effects. The present findings provide support to the use of DFP in clinical trials including AD patients.

**Keywords:** Deferiprone, iron, recognition memory, BDNF, neurodegenerative disorders, microPET scanning.

**Chemical compound studied in this article:** Deferiprone (PubChem CID: 2972)

## 1. Introduction

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a member of a family of homologous proteins known as neurotrophins. It was the second neurotrophin described and characterized (Barde et al., 1982). BDNF is the most abundant neurotrophin and is widely distributed in mammalian Central Nervous System (CNS) (Balaratnasingam et al., 2012) playing a central role in its development and physiology, as well as in pathological states. Currently, the role of this neurotrophin in the adult brain is being extensively explored, and evidence suggests its critical involvement in long-term potentiation (LTP), a type of synaptic plasticity proposed as the cellular basis for long-term memory formation (Mattson, 2008). BDNF signaling cascades are initiated by the activation of mainly two membrane receptors, which belong to distinct families: the p75 (NTR), a TNF receptor superfamily member, and TrkB, a member of the tyrosine kinase receptor family. Acting through TrkB, BDNF promotes neuronal growth and regeneration, dendritic and axonal growth and remodeling, cytoskeleton dynamics, synaptic formation, and prevents apoptosis (Nagahara and Tuszynski, 2011). It has been demonstrated that the activation of TrkB signaling plays an essential role in the induction of late LTP, promoting protein synthesis and structural synaptic alterations (Balaratnasingam et al., 2012; Longo et al., 2007; Mattson, 2008).

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a chronic and progressive neurodegenerative process that leads to cognitive decline, which includes progressive memory loss, loosening of judging ability and executive functions. Although the exact cause of the disease remains unknown, *post mortem* studies revealed decreases in BDNF levels. It is known that BDNF is produced in the adulthood in the entorhinal cortex and hippocampus, which are primary sites of neuronal loss in AD (Balaratnasingam et al., 2012). Allen and coworkers (2013) have demonstrated that BDNF and its mRNA, as well as TrkB are markedly reduced in the

hippocampus and cortex of AD patients. These findings corroborate the hypothesis that BDNF reductions may be involved in the pathogenesis of AD.

Neurodegenerative disorders are complex multifactorial dysfunctions that nowadays recognizably involve metal dyshomeostasis (Li and Reichmann, 2016). Iron accumulation has been extensively described in the brains of patients suffering from neurodegenerative disorders (Ward et al., 2014). Moreover, recent imaging studies show that there is an inverse correlation between iron content in brain regions and performance in cognitive tasks in healthy aged individuals (Penke et al., 2012; Rodrigue et al., 2013) as well as in patients of neurodegenerative diseases (Ding et al., 2009). Over the years, we have characterized an animal model in which iron is administered to rodents in the neonatal period, a critical period for the establishment of iron content in the CNS (Schröder et al., 2013). Iron administration in this period leads to iron accumulation in brain regions (Schröder et al., 2001), and persistent memory dysfunctions in a variety of memory tasks, including spatial (Schröder et al., 2001), aversive (Schröder et al., 2001; Silva et al., 2012), and recognition memory (de Lima et al., 2005; Fagherazzi et al., 2012). These memory deficits are accompanied by increased oxidative stress (de Lima et al., 2005), apoptotic markers (da Silva et al., 2014; Miwa et al., 2011), and reactive astrogliosis (Fernandez et al., 2011). We have previously reported that the iron chelator deferoxamine was able to dose-dependently reverse iron-induced recognition memory impairment (de Lima et al., 2007), and to ameliorate memory deficits associated to aging in rats (de Lima et al., 2008). Together, results from human studies and from our animal model suggest that iron accumulation is related to memory dysfunctions associated with aging and neurodegenerative disorders.

Deferiprone is an oral iron chelator approved by the FDA for the treatment of systemic iron overload disorders, such as thalassemia major. In 2014, Devos and collaborators reported that DFP significantly reduced labile iron and biological damage in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrapyridine (MPTP)-induced model of Parkinson's disease (PD), improving motor

functions while raising striatal dopamine, conferring twice as much protection as the intraperitoneally administered deferoxamine. They also investigated the effects of DFP in a pilot study with early-stage PD patients, and showed that after 6 months of treatment with DFP there was a significant decrease in iron accumulation in the *substantia nigra*, as well as an increase in CSF glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in DFP-treated patients, and a significantly better motor performance at either 6 or 12 months of DFP treatment.

In the present study, we aimed to determine the effects of iron overload on BDNF levels and brain glucose metabolism, measured by FDG-positron emission microtomography (FDG-microPET), as an index of neuronal integrity. Moreover, we intended to characterize the effects of DFP on iron-induced memory deficits and hippocampal BDNF levels, as well as on glucose metabolism.



## 2. Material and methods

### 2.1 Animals

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

All behavioral experiments were performed at light phase between 09:00 a.m and 4:30 p.m. All experimental procedures were performed in accordance to the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI) and approved by the Institutional Ethics Committee of the Pontifical Catholic University (SIPESQ# 7205). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

### 2.2 Treatments

#### 2.2.1 Iron neonatal treatment

The neonatal iron treatment has been described in detail elsewhere (de Lima et al., 2005; Fagherazzi et al., 2012; Silva et al., 2012). Briefly, 12-day-old rat pups received orally a single daily dose (10 ml/Kg solution volume) of vehicle (5% sorbitol in water) (control group) or 30

mg/Kg of body weight of Fe<sup>2+</sup> (iron carbonyl, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) via a metallic gastric tube, over 3 days (postnatal days 12-14).

### 2.2.2 Deferiprone

For the investigation of the effects of Deferiprone (DFP, Ferriprox®, Apotex Inc. Ontario, Canada) on iron-induced memory impairments, adult (2 month-old) rats treated neonatally with vehicle or iron (as described above) received a daily oral administration (gavage) of distilled water (wtr) or DFP (125.0 mg/kg/day) diluted in distilled water for 3 weeks. Drug solutions were freshly prepared immediately prior to administration. The dose used was selected based on previously published studies (Wang et al., 2016; Zhao et al., 2015).

## 2.3 Behavioral procedures

### 2.3.1 Object recognition task

The object recognition task was performed as previously described (Fagherazzi et al., 2012; Silva et al., 2012). Briefly, the object recognition task took place in an open field apparatus (45 x 40 x 60 cm) with sawdust covering its floor. On the first day, rats underwent a habituation session during which they were placed in the empty open field for 5 min. On the following day, rats were given one 5-min training trial in which they were exposed to two identical objects (A1 and A2). The objects were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. On the long-term memory (LTM) testing trial (24 h after the training session), rats were allowed to explore the open field for 5 min in the presence of two objects: the familiar object A and a novel object B. These were placed in the same locations as in the training session. In long-term retention test trial, the novel object was placed in 50% trials in the right side and 50% trials in the left side of the open field. All objects were made of plastic Duplo Lego Toys

and had a height of about 10 cm. Objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. Between trials the objects were washed with 10% ethanol solution. Trials were videotaped and object exploration was measured by an experimenter blind to group treatment assignments, using two stopwatches to record the time spent exploring the objects. Exploration was defined as follows: sniffing or touching the object with the nose or forepaws while sniffing. Sitting on the object was not considered as exploration. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio  $T_N/(T_F+T_N)$  [ $T_F$ = time spent exploring the familiar object (A);  $T_N$ = time spent exploring the novel object (B)].

### 2.3.2 Open-field behavior

Behavior during habituation to the open field prior to object recognition training was evaluated in the 17<sup>th</sup> day of DFP administration, as previously described (Fagherazzi et al., 2012). Drug administration was performed in the morning and open field behavior analyzed in the afternoon, giving at least a 4-h interval between drug administration and behavioral recordings. The open field was a 40 X 45 X 60 cm arena surrounded by 50 cm high walls, made of plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. Animals were placed in the rear left corner and left to explore the field freely for 5 min. Latency to start locomotion and line crossings, were registered. The number of crossings was used as a measure of locomotor activity, whereas the latency to start locomotion was used as a measure of anxiety.

### 2.4 *FDG-microPET*

A subset of animals that underwent behavioral testing was 72 h later submitted to FDG-microPET scannings. The animals were individually anesthetized with a mixture of isoflurane and medical oxygen (3 – 4 % induction and 2 – 3 % maintenance dose) and received 1 mCi of  $^{18}\text{F}$ -FDG through the tail vein. After that, animals were returned to their home cages for a 40 min period of conscious tracer uptake. After the uptake period, each rat was individually placed in a head-first prone position and scanned with the Triumph™ microPET (LabPET-4, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA) under inhalatory anesthesia. Throughout these procedures, the animals were kept on a pad heated to 36 °C. For radiotracer readings, 10-min list mode static acquisitions were acquired with the field of view (FOV; 3.75 cm) centered on the rat's head. All data were reconstructed using a 3D Maximum Likelihood Expectation Maximization (3D-MLEM) algorithm with 20 iterations and no attenuation correction. Each reconstructed microPET image was spatially normalized into an  $^{18}\text{F}$ -FDG template using brain normalization in PMOD v3.5 and the Fusion Toolbox (PMOD Technologies, Zurich, Switzerland). An MRI rat brain VOI template was used to overlay the normalized images, previously coregistered to the microPET image database, as previously described (Baptista et al., 2015). The glucose uptake in each brain region was expressed as standard uptake values (SUVs).

### *2.5 Sample preparation for molecular analysis*

A different subset of rats (not the same animals submitted to PET scanning) was euthanized by decapitation at 24h after completion of behavioral testing. The hippocampi from groups of rats treated neonatally with iron or vehicle and chronically with distilled water or DFP in the adulthood were quickly removed and left hemispheres placed in Trizol® reagent (Life Technologies, USA) for RT-qPCR assays, and right hemispheres stored for ELISA assay for determination of BDNF levels. Samples were stored at -80°C for subsequent analyses.

## 2.6 BDNF Measurements

BDNF levels in hippocampi were measured by sandwich-ELISA, using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Millipore, Darmstadt, Germany) as previously described (Pinheiro et al., 2015). Briefly, tissue samples were homogenized in phosphate-buffered solution with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM ethyleneglycoltetraacetic acid. Microtiter plates were coated for 24 hours at 4 °C with the samples (in duplicate) diluted 1:3 in sample diluent or standard curve ranging from 15.63 to 500 pg/ml of BDNF. Plates were then washed four times with wash buffer followed by the addition of biotinylated mouse anti-human BDNF monoclonal antibody (diluted 1:1000 in sample diluent), which was incubated for 3 hours at room temperature. After washing, a second incubation with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate solution (diluted 1:1000) for 1h at room temperature was carried out. After addition of substrate and stop solution, the amount of BDNF was determined (absorbance set at 450 nm). Total protein was measured by Bradford's method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

## 2.7 Gene expression analysis by quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR)

Quantitative real-time PCR was used to analyze the mRNA levels of *TrKB*, and *p75<sup>NTR</sup>*. Total RNA of hippocampus was isolated with Trizol® in accordance with the manufacturer's instructions. RNA purity (Abs 260/280nm ~2.0) and concentration were determined by L-quant (Loccus Biotecnologia) and treated with Deoxyribonuclease I (Invitrogen) to eliminate genomic DNA contamination, in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized with ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) from 1 µg total

RNA, following the manufacturer's instruction. Quantitative real-time PCR was performed using SYBR® Green I (Invitrogen) to detect double-strand cDNA synthesis on the 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems). The PCR cycling conditions were: an initial polymerase activation step for 5 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, 35 s at 60 °C for annealing and 15 s at 72 °C for elongation. At the end of cycling protocol, a melting-curve analysis was included and fluorescence measured from 60 to 99 °C to confirm the specificity of primers and absence of primer-dimers and showed in all cases one single peak. All real-time assays were carried out in quadruplicate and, in all cases, a reverse transcriptase negative control was included. *Hprt1* was used as reference gene for normalization. The sequences of reverse and forward primers are shown in Table 1. The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR 2016.1 Software (<http://LinRegPCR.nl>) and the stability of the references genes, and the optimal number of reference genes according to the pairwise variation (V) were analyzed by GeNorm 3.5 Software (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Relative mRNA expression levels were determined using the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  method (Bustin et al., 2013).

## 2. 8 Statistical analysis

Data were analyzed as previously described (de Lima et al., 2008; Silva et al., 2012). Data from recognition indexes, total time exploring both objects in the training session, and data from the experiments evaluating open field behavior, as well as FDG-microPET scannings, ELISA, and qPCR are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons among experimental groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by appropriate *Post-hoc* tests when necessary. In all comparisons, *P* values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

### 3. Results

#### 3.1 Behavioral analyses

Object recognition task was used to assess the effects of DFP on iron-induced memory deficits (Fig. 1). Analysis of variance of recognition index revealed a significant difference among the experimental groups in the long-term retention test ( $F_{(3,45)} = 41.07, P < 0.0001$ ), but not in the training session ( $F_{(3,45)} = 1.09, P = 0.361$ ). Total time exploring both objects in the training session was not significantly different among groups ( $F_{(3,45)} = 1.64, P = 0.192$ , Table 2). Tukey's *post-hoc* analysis indicated that the group that received iron in the neonatal period presented decreased recognition indexes in comparison to the control group ( $P < 0.0001$ ), confirming previously reported iron-induced memory impairment. However, the group that received iron in the neonatal period and was given the iron chelator DFP chronically in adult life showed no statistically significant differences in relation to the control group (Veh-Wtr,  $P = 0.121$ ) or to the group that received DFP alone in adulthood (Veh-DFP,  $P = 0.214$ ). In addition, the group treated neonatally with iron that received DFP showed a significantly higher recognition index in comparison to the Iron-Veh group ( $P < 0.0001$ ) indicating that iron chelation in adulthood was able to reverse iron-induced recognition memory impairment.

Open field behavior analysis was performed to evaluate general motor and exploratory behavior. No statistically significant differences were found among the groups when the latency to leave the first quadrant ( $F_{(3,45)} = 1.065, P = 0.373$ ) or number of crossings ( $F_{(3,45)} = 0.398, P = 0.755$ ) were compared, suggesting that iron and/or DFP did not alter motor activity, motivation or anxiety measured in a 5-min session (Table 3).

#### 3.2 FDG-microPET

Cerebral glucose metabolism was assessed by FDG-microPET scanning in adult rats treated neonatally with iron plus DFP in adulthood. Neither iron overload nor iron chelation in adulthood induced significant changes in glucose metabolism. Statistical comparison of  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake (SUV) in the left and right hippocampi showed no significant differences among groups (left  $F_{(3,20)} = 0.852$ ,  $P = 0.482$ , right  $F_{(3,20)} = 1.041$ ,  $P = 0.396$ ; Fig. 2A). Also, there were no significant differences in left and right cortical  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake among the groups (left  $F_{(3,20)} = 1.086$ ,  $P = 0.378$ , right  $F_{(3,20)} = 1.142$ ,  $P = 0.356$  Fig. 2B).

### 3.3 Hippocampal BDNF levels

We aimed to evaluate the effects of iron overload in the neonatal period on BDNF levels in the hippocampus of adult rats, as well as to determine whether iron chelation in adult life would be able to restore BDNF levels, in case we found iron-induced alterations.

Comparisons of hippocampal BDNF levels using ANOVA revealed a significant difference among experimental groups ( $F_{(3,20)} = 4.798$ ,  $P = 0.011$ ). Tukey's *post hoc* test indicated significant reductions in BDNF levels in the iron-treated group that received water (vehicle) in the adulthood when compared to the control group (Veh-Wtr;  $P = 0.038$ ) and to the group that received vehicle in the neonatal period and DFP in adulthood ( $P = 0.018$ ). The group that received iron in the neonatal period and DFP in adulthood presented no significant differences when compared to the control group ( $P = 0.259$ ), suggesting that iron chelation in the adulthood is able to reverse iron-induced decreases in BDNF (Fig. 3).

Gene expression of the two types of membrane receptors activated by BDNF, namely,  $p75^{\text{NTR}}$  and *TrkB* was investigated, using real-time PCR. Results indicated no significant differences among the groups when comparing hippocampal  $p75^{\text{NTR}}$  expression (ANOVA,  $F_{(3,17)} = 0.506$ ,  $P = 0.683$ ) or *TrkB* expression (ANOVA,  $F_{(3,19)} = 1.846$ ,  $P = 0.173$ ) (Fig 4).



#### 4. Discussion

Consistent evidence suggests that iron accumulation is critically implicated in the pathogenesis of neurodegenerative diseases (Belaidi and Bush, 2016). For instance, magnetic resonance imaging (MRI) mapping of iron distribution has revealed that AD patients have increased iron levels in the putamen, pulvinar thalamus, red nucleus, hippocampus, and temporal cortex (Langkammer et al., 2014), while in PD iron accumulation occurs in the substantia nigra *pars compacta* (Langley et al., 2016). In order to investigate the functional and cellular consequences of iron accumulation and its relation with neurodegenerative disorders, we have developed an animal model of iron overload (Schröder et al., 2013). We have found that iron overload increases oxidative stress (de Lima et al., 2005) and apoptotic markers (Miwa et al., 2011; da Silva et al., 2014), induces reactive gliosis (Fernandez et al., 2011), decreases the expression of the synaptic marker, synaptophysin (da Silva et al., 2014), induces alterations in the ubiquitin-proteasome system (Figueiredo et al., 2016) as well as in the expression of proteins involved in mitochondrial dynamics (da Silva et al., 2014). In the present study, we aimed to investigate whether iron overload interferes with BDNF signaling in the hippocampus. Interestingly, iron-treated rats presented a reduction in hippocampal BDNF levels, whereas no effect was observed on the expression of neurotrophin receptors, *TrKB* and *p75<sup>NTR</sup>*. BDNF reductions have been observed in post mortem brains of AD patients (for a review, see Tanila, 2017), and are known to be critically involved in hippocampal synaptic plasticity and learning and memory (Minichiello, 2009). We can raise the possibility that BDNF reduction in iron-treated rats may explain at least partially, persistent memory deficits observed in this animal model.

DFP is a ferric iron chelator that can be administered orally, possesses high lipophilicity and high tissue penetration, and has been indicated for treating systemic iron overload in thalassaemia major patients. Compared to other iron chelators such as deferoxamine that not readily cross the blood brain barrier (BBB), DFP presents higher lipophilicity, this allows it to act intracellularly beyond the BBB (Kakhlon et al., 2010). Besides that, deferoxamine is not orally active and its administration can be uncomfortable and expensive (Ma et al., 2012). Here we showed that chronic DFP in adulthood was able to restore recognition memory in animals treated neonatally with iron, without affecting general exploratory activity measured in the open field or time exploring objects in the memory acquisition phase of object recognition task. Sripetchwandee and coworkers (2014) have demonstrated that DFP administered for 4 weeks improved spatial learning, tested in the Morris water maze, and synaptic plasticity in rats fed a high iron diet. While the effects of DFP on memory are poorly established, other iron chelators have also proved to attenuate memory impairments. For instance, systemic deferoxamine improved spatial memory in an animal model of neuroinflammation induced by lipopolysaccharide (Zhang et al., 2015) as well as in rats submitted to traumatic brain injury (Zhang et al., 2013). Intranasal deferoxamine also reversed spatial memory impairments in transgenic mice expressing amyloid precursor protein (APP) and presenilin (Guo et al., 2013) and also improved spatial memory in the radial arm maze in tau transgenic mice (Fine et al., 2012). Our research group has also demonstrated that deferoxamine was able to reverse age-related recognition memory impairments (de Lima et al., 2008).

In the present study, in addition to rescuing recognition memory impairment induced by iron, DFP also increased hippocampal BDNF levels in iron-treated rats. Recent studies have shown that deferoxamine recovers BDNF levels in a mouse model of post-operative cognitive dysfunction (Li et al., 2016), and in transgenic AD mice (Guo et al., 2015). Another iron chelator, clioquinol, increased BDNF levels in an animal model of parkinsonism and dementia

associated to tau knockout (Lei et al., 2015). A novel multifunctional, brain-permeable iron-chelating drug, VAR10303, increased BDNF levels and restored cognitive dysfunction in aged rats (Bar Am et al., 2015). In an effort to comprehend the mechanisms mediating iron chelation-induced BDNF increases, one study showed that deferoxamine was able to activate the transcriptional activator hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling, which regulates the expression of adaptive proteins such as iron uptake proteins, divalent metal transporter 1 with iron responsive element (DMT1+IRE) and transferrin, as well as BDNF (Guo et al., 2015). How iron accumulation leads to decreases in BDNF levels remain unknown. However, we can suggest that iron-induced oxidative stress, mitochondrial and synaptic disruption, may altogether lead to BDNF lessening, which would, in turn, contribute to cellular collapse. Thus, neuroprotective actions of DFP may be related to the prevention of iron-induced oxidative stress. In fact, we have shown that iron chelation reduced oxidative damage in hippocampus and cortex of aged rats and also ameliorated memory impairments (de Lima et al., 2008). On the other hand, evidence suggests that BDNF may play a role in modulating iron metabolism. Zhang and coworkers (2014) have demonstrated that the dopaminergic toxin 6-hydroxydopamine increases iron influx in primary cultured ventral mesencephalic neurons via up-regulation of DMT1+IRE and this effect is consistently mitigated by BDNF. Hence, BDNF modulation of iron uptake may be at least partially related to its neuroprotective effects. In turn, increasing BDNF levels contributes to memory rescuing effects. For instance, lentiviral gene transfer of BDNF into the entorhinal cortex, increased BDNF protein levels in the hippocampus and improved hippocampal dependent memory in APP transgenic mice and aged rats (Nagahara et al., 2009), and inhibition of TrkB signalling exacerbated the spatial memory deficit, whereas overexpression of TrkB rescued spatial memory in APP/PS1 transgenic mice (Kemppainen et al., 2012).

Deficits in glucose metabolism usually relate to decreased brain function associated to neuronal death in affected areas. For instance, in AD patients, reduced uptake of FDG has been observed in temporal, parietal, posterior cingulate, and inferior parietal cortical areas (Chew and Silverman, 2013; Li et al., 2008). Consistently, changes in cerebral glucose uptake have been detected in transgenic models of AD. In the present study we aimed to determine whether iron overload would induce alterations in cerebral FDG uptake. In spite of consistent experimental evidence linking iron treatment with neural dysfunction and cognitive deficits, no significant changes in FDG uptake were detected. Neural hypometabolism observed in animal models of AD seems to follow a progressive age-dependent pattern. MacDonald and coworkers (2014) reported that glucose uptake was decreased in 13 months old 5XFAD mice (five-mutation familial AD mouse model), but not when measures were made in early stages, at 2 or 5 months. In addition, glucose uptake was also investigated in an animal model of tauopathy (tauVLW transgenic mice) and revealed an age-related decrease in FDG uptake that was significant from the age of 11 months, and became much more prominent in the oldest animals (19 months of age) (de Cristóbal et al., 2014). In our study, we have only measured FDG uptake at one time-point, when animals were 3 months old. It is possible that cellular alterations observed in these animals do not suffice to induce detectable decreases in metabolic activity at the age measured in the present study. In a previous study, we have characterized that iron-induced memory deficits are exacerbated in aged rats (Rech et al., 2010), thus it is possible that iron-induced effects may also be progressive and had we measured at later time-points, an effect could have been observed. Nevertheless, a recent longitudinal study reported behavioral alterations accompanied by histopathological changes that suggest neurodegeneration in an animal model of neuro-HIV, without significant changes in FDG uptake (Reid et al., 2016). Another possibility that could explain the lack of iron-induced effects on FDG uptake may be related to the fact that iron treatment leads to astrogliosis (Fernandez et al., 2011). Since glial

cells also use glucose as energy source, iron-induced astrogliosis could mask a possible decreased neuronal activity (Waldron et al., 2015). Furthermore, to our knowledge, no preclinical or clinical studies investigated the effects of iron chelators on cerebral glucose metabolism. In the present study, our control group treated for 21 days with DFP has not differed from the control group, corroborating its safety.

## 5. Conclusion

In summary, here we showed that DFP was able to restore memory impairment and increase hippocampal BDNF levels, without inducing any apparent side effect. Agents that increase neurotrophic signaling have been proposed as promissory in the treatment of neurodegenerative disorders. Considering that DFP proved to be successful in rescuing iron-induced memory deficits, and the significance of iron accumulation in diseases featuring severe memory impairments, such as AD, the present study provides support to the use of DFP in clinical trials including AD patients.

## Disclosures

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

## Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 308290/2015-1 to N.S.); the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM). M.R.B. is Research Career Awarded of the CNPq. V.C.D. is recipient of a PROBIC/FAPERGS fellowship. P. C. de F. C. and R.T.M. are recipients of BPA/PUCRS scholarships. L.W.K. is recipient of fellowship CAPES/PNPD Program.

**Role of the funding source**

The funding sources had no role in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the paper for publication.

## References

- Allen, S.J., Watson, J.J., Shoemark, D.K., Barua, N.U., Patel, N.K., 2013. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration *Pharmacol. Ther.* 138, 155–175.
- Balaratnasingam, S., Janca, A., 2012. Brain Derived Neurotrophic Factor: A novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol. Ther.* 134, 116–124.
- Baptista, P.P., Saur, L., Bagatini, P.B., Greggio, S., Venturin, G.T., Vaz, S.P., Ferreira, K. dos R., Junqueira, J.S., Lara, D.R., DaCosta, J.C., Jeckel, C.M., Mestriner, R.G., Xavier, L.L., 2015. Antidepressant effects of ketamine are not related to <sup>18</sup>F-FDG metabolism or tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the ventral tegmental area of Wistar rats. *Neurochem. Res.* 40, 1153-1164.
- Bar-Am, O., Amit, T., Kupersmidt, L., Aluf, Y., Mechlovich, D., Kabha, H., Danovitch, L., Zurawski, V.R., Youdim, M.B., Weinreb, O., 2015. Neuroprotective and neurorestorative activities of a novel iron chelator-brain selective monoamine oxidase-A/moanoamine oxidase-B inhibitor in animal models of Parkinson's disease and aging. *Neurobiol. Aging.* 36, 1529-1542.
- Barde, A.Y., Edgar, D., Thoenen, H., 1982. Purification of a new Neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549-553.
- Belaidi, A.A., Bush, A.I., 2016. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *J. Neurochem.* 139 Suppl 1, 179-197.
- Bonefeld, B.E., Elfving, B., Wegener, G., 2008. Reference Genes for Normalization: A Study of Rat Brain Tissue. *Synapse.* 62, 302–309.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G., Wittwer, C.T., Schjerling, P., Day, P.J., Abreu, M., Aguado, B., Beaulieu, J.F., Beckers, A., Bogaert, S., Browne, J.A., Carrasco-Ramiro, F., Ceelen, L., Ciborowski, K., Cornillie, P., Coulon, S., Cuypers, A., De Brouwer, S., De Ceuninck, L., De Craene, J., De Naeyer, H., De Spiegelaere, W., Deckers, K., Dheedene, A., Durinck, K., Ferreira-Teixeira, M., Fieuw, A., Gallup, J.M., Gonzalo-Flores, S., Goossens, K., Heindryckx, F., Herring, E., Hoenicka, H., Icardi, L., Jaggi, R., Javad, F., Karampelias, M., Kibenge, F., Kibenge, M., Kumps, C., Lambertz, I., Lammens, T., Markey, A., Messiaen, P., Mets, E., Morais, S., Mudarra-Rubio, A., Nakiwala, J., Nelis, H., Olsvik, P.A., Pérez-Novo, C., Plusquin, M., Remans, T., Rihani, A., Rodrigues-Santos, P., Rondou, P., Sanders, R., Schmidt-Bleek, K., Skovgaard, K., Smeets, K., Tabera, L., Toegel, S., Van Acker, T., Van den Broeck, W., Van der Meulen, J., Van Gele, M., Van Peer, G., Van Poucke, M., Van Roy, N., Vergult, S., Wauman, J., Tshuikina-Wiklander, M., Willems, E., Zaccara, S., Zeka, F., Vandesompele, J., 2013. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat. Methods*. 10, 1063-1067.
- Chew, J., Silverman, D.H., 2013. FDG-PET in early AD diagnosis. *Med. Clin. North Am.*, 97, 485-494.
- Choi, S., Friedman, W.J., 2014. Interleukin-1 $\beta$  enhances neuronal vulnerability to proNGF-mediated apoptosis by increasing surface expression of p75(NTR) and sortilin. *Neuroscience*. 257, 11-19.
- da Silva, V.K., de Freitas, B.S., da Silva, A.D., Nery, L.R., Falavigna, L., Ferreira, R.D., Bogo, M.R., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Schröder, N., 2014. Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNMI1L



- expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection. *Mol. Neurobiol.* 49, 222-233.
- de Cristóbal, J., García-García, L., Delgado, M., Pérez, M., Pozo, M.A., Medina, M., 2014. Longitudinal assessment of a transgenic animal model of tauopathy by FDG-PET imaging. *J. Alzheimers Dis.* 40 Suppl 1, S79-89.
- de Lima, M.N., Dias, C.P., Torres, J.P., Dornelles, A., Garcia, V.A., Scalco, F.S., Guimarães, M.R., Petry, R.C., Bromberg, E., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., Schröder, N., 2008. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol. Aging.* 29, 1052-1059.
- de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Caldana, F., Graziotin, M.M., Scalco, F.S., Guimarães, M.R., Bromberg, E., Franke, S.I., Henriques, J.A., Schröder, N., 2007. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 570, 111-114.
- de Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D.C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Schröder, N., 2005. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2521-2528.
- Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J.C., Kluza, J., Petrault, M., Laloux, C., Jonneaux, A., Ryckewaert, G., Garçon, G., Rouaix, N., Duhamel, A., Jissendi, P., Dujardin, K., Auger, F., Ravasi, L., Hopes, L., Grolez, G., Firdaus, W., Sablonnière, B., Strubi-Vuillaume, I., Zahr, N., Destée, A., Corvol, J.C., Pörtl, D., Leist, M., Rose, C., Defebvre, L., Marchetti, P., Cabantchik, Z.I., Bordet, R., 2014. Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 195–210.
- Ding, B., Chen, K.M., Ling, H.W., Sun, F., Li, X., Wan, T., Chai, W.M., Zhang, H., Zhan, Y., Guan, Y.J., 2009. Correlation of iron in the hippocampus with MMSE in patients with Alzheimer's disease. *J. Magn. Reson. Imaging.* 29, 793-798.

- Fagherazzi, E.V., Garcia, V.A., Maurmann, N., Bervanger, T., Halmenschlager, L.H., Busato, S.B., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Schröder, N., 2012. Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. *Psychopharmacology (Berl)*. 219, 1133-1140.
- Fernandez, L.L., de Lima, M.N., Scalco, F., Vedana, G., Miwa, C., Hilbig, A., Vianna, M., Schröder, N., 2011. Early post-natal iron administration induces astroglial response in the brain of adult and aged rats. *Neurotox. Res.* 20, 193-199.
- Figueiredo, L.S., de Freitas, B.S., Garcia, V.A., Dargél, V.A., Köbe, L.M., Kist, L.W., Bogo, M.R., Schröder, N., 2016. Iron loading selectively increases hippocampal levels of ubiquitinated proteins and impairs hippocampus-dependent memory. *Mol. Neurobiol.* 53, 6228-6239.
- Fine, J.M., Baillargeon, A.M., Renner, D.B., Hoerster, N.S., Tokarev, J., Colton, S., Pelleg, A., Andrews, A., Sparley, K.A., Krogh, K.M., Frey, W.H., Hanson, L.R., 2012. Intranasal deferoxamine improves performance in radial arm water maze, stabilizes HIF-1 $\alpha$ , and phosphorylates GSK3 $\beta$  in P301L tau transgenic mice. *Exp. Brain Res.* 219, 381-390.
- Gao, X.P., Liu, Q., Nair, B., Wong-Riley, M.T., 2014. Reduced levels of brain-derived neurotrophic factor contribute to synaptic imbalance during the critical period of respiratory development in rats. *Eur. J. Neurosci.* 40, 2183-2195.
- Guo, C., Zhang, Y.X., Wang, T., Zhong, M.L., Yang, Z.H., Hao, L.J., Chai, R., Zhang, S., 2015. Intranasal deferoxamine attenuates synapse loss via up-regulating the P38/HIF-1 $\alpha$  pathway on the brain of APP/PS1 transgenic mice. *Front. Aging Neurosci.* 7, 104.
- Guo, C., Wang, T., Zheng, W., Shan, Z.Y., Teng, W.P., Wang, Z.Y., 2013. Intranasal deferoxamine reverses iron-induced memory deficits and inhibits amyloidogenic APP processing in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 34, 562-575.

- Kakhlon, O., Breuer, W., Munnich, A., Cabantchik, Z.I., 2010. Iron redistribution as a therapeutic strategy for treating diseases of localized iron accumulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88, 187–196.
- Kemppainen, S., Rantamäki, T., Jerónimo-Santos, A., Lavasseur, G., Autio, H., Karpova, N., Kärkkäinen, E., Stavén, S., Vicente Miranda, H., Outeiro, T.F., Diógenes, M.J., Laroche, S., Davis, S., Sebastião, A.M., Castrén, E., Tanila, H., 2012. Impaired TrkB receptor signaling contributes to memory impairment in APP/PS1 mice. *Neurobiol. Aging.* 33, 1122.e23-39.
- Langkammer, C., Ropele, S., Pirpamer, L., Fazekas, F., Schmidt, R., 2014. MRI for iron mapping in Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.* 13, 189-191.
- Langley, J., Huddleston, D.E., Sedlacik, J., Boelmans, K., Hu, X.P., 2016. Parkinson's disease-related increase of T2\*-weighted hypointensity in substantia nigra pars compacta. *Mov. Disord.* 2016. doi: 10.1002/mds.26883. [Epub ahead of print]
- Lei, P., Ayton, S., Appukuttan, A.T., Volitakis, I., Adlard, P.A., Finkelstein, D.I., Bush, A.I., 2015. Clioquinol rescues Parkinsonism and dementia phenotypes of the tau knockout mouse. *Neurobiol Dis.* 81, 168-175.
- Li, K., Reichmann, H., 2016. Role of iron in neurodegenerative diseases. *J. Neural Transm. (Vienna).* 123, 389-399.
- Li, Y., Pan, K., Chen, L., Ning, J.L., Li, X., Yang, T., Terrando, N., Gu, J., Tao, G., 2016. Deferoxamine regulates neuroinflammation and iron homeostasis in a mouse model of postoperative cognitive dysfunction. *J. Neuroinflammation.* 13, 268.
- Li, Y., Rinne, J.O., Mosconi, L., Pirraglia, E., Rusinek, H., DeSanti, S., Kemppainen, N., Nägren, K., Kim, B.C., Tsui, W., de Leon, M.J., 2008. Regional analysis of FDG and PIB-PET images in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 35, 2169-2181.

- Longo, F.M., Yang, T., Knowles, J.K., Xie, Y., Moore, L.A., Massa, S.M., 2007. Small molecule neurotrophin receptor ligands: novel strategies for targeting Alzheimer's disease mechanisms. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 503-506.
- Ma, Y., Zhou, T., Kong, X., Hider, R.C., 2012. Chelating agents for the treatment of systemic iron overload. *Curr. Med. Chem.* 19, 2816-2827.
- Macdonald, I.R., DeBay, D.R., Reid, G.A., O'Leary, T.P., Jollymore, C.T., Mawko, G., Burrell, S., Martin, E., Bowen, C.V., Brown, R.E., Darvesh, S., 2014. Early detection of cerebral glucose uptake changes in the 5XFAD mouse. *Curr. Alzheimer Res.* 11, 450-460.
- Mattson, M.P., 2008. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1144, 97-112.
- Minichiello, L., 2009. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 850-860.
- Miwa, C.P., de Lima, M.N., Scalco, F., Vedana, G., Mattos, R., Fernandez, L.L., Hilbig, A., Schröder, N., Vianna, M.R., 2011. Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. *Neurotox. Res.* 19, 527-535.
- Nagahara, A.H., Tuszynski, M.H., 2011. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 209-219.
- Nagahara, A.H., Merrill, D.A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B.E., Shaked, G.M., Wang, L., Blesch, A., Kim, A., Conner, J.M., Rockenstein, E., Chao, M.V., Koo, E.H., Geschwind, D., Masliah, E., Chiba, A.A., Tuszynski, M.H., 2009. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 15, 331-337.
- Penke, L., Valdés Hernández, M.C., Maniega, S.M., Gow, A.J., Murray, C., Starr, J.M., Bastin, M.E., Deary, I.J., Wardlaw, J.M., 2012. Brain iron deposits are associated with general cognitive ability and cognitive aging. *Neurobiol. Aging.* 33, 510-517.

- Pinheiro, R.M., de Lima, M.N., Portal, B.C., Busato, S.B., Falavigna, L., Ferreira, R.D., Paz, A.C., de Aguiar, B.W., Kapczinski, F., Schröder, N., 2015. Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 122, 709-719.
- Rech, R.L., de Lima, M.N., Dornelles, A., Garcia, V.A., Alcalde, L.A., Vedana, G., Schröder, N., 2010. Reversal of age-associated memory impairment by rosuvastatin in rats. *Exp. Gerontol.* 45, 351-356.
- Reid, W.C., Casas, R., Papadakis, G.Z., Muthusamy, S., Lee, D.E., Ibrahim, W.G., Nair, A., Koziol, D., Maric, D., Hammoud, D.A., 2016. Neurobehavioral abnormalities in the HIV-1 transgenic rat do not correspond to neuronal hypometabolism on 18F-FDG-PET. *PLoS One*. 11, e0152265.
- Rodrigue, K.M., Daugherty, A.M., Haacke, E.M., Raz, N., 2013. The role of hippocampal iron concentration and hippocampal volume in age-related differences in memory. *Cereb. Cortex*. 23, 1533-1541.
- Schröder, N., Figueiredo, L.S., de Lima, M.N., 2013. Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies. *J. Alzheimers Dis.* 34, 797-812.
- Schröder, N., Fredriksson, A., Vianna, M.R., Roesler, R., Izquierdo, I., Archer, T., 2001. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav. Brain Res.* 124, 77-85.
- Silva, P.F., Garcia, V.A., Dornelles, A. da S., Silva, V.K., Maurmann, N., Portal, B.C., Ferreira, R.D., Piazza, F.C., Roesler, R., Schröder, N., 2012. Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. *Neuroscience*. 200, 42-49.

- Sripetchwandee, J., Pipatpiboon, N., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S., 2014. Combined therapy of iron chelator and antioxidant completely restores brain dysfunction induced by iron toxicity. *PLoS One*. 9, e85115.
- Tanila, H., 2017. The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 97(Pt B), 114-118.
- Waldron, A.M., Wintolders, C., Bottelbergs, A., Kelley, J.B., Schmidt, M.E., Stroobants, S., Langlois, X., Staelens, S., 2015. In vivo molecular neuroimaging of glucose utilization and its association with fibrillar amyloid- $\beta$  load in aged APPPS1-21 mice. *Alzheimers Res. Ther.* 7(1), 76.
- Wang, G., Hu, W., Tang, Q., Wang, L., Sun, X.G., Chen, Y., Yin, Y., Xue, F., Sun, Z., 2016. Effect comparison of both iron chelators on outcomes, iron deposit, and iron transporters after intracerebral hemorrhage in rats. *Mol. Neurobiol.* 53, 3576-3585.
- Ward, R.J., Zucca, F.A., Duyn, J.H., Crichton, R.R., Zecca, L., 2014. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 13, 1045-1060.
- Zhang, H.Y., Song, N., Jiang, H., Bi, M.X., Xie, J.X., 2014. Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor inhibit ferrous iron influx via divalent metal transporter 1 and iron regulatory protein 1 regulation in ventral mesencephalic neurons. *Biochim. Biophys. Acta.* 1843, 2967-2975.
- Zhang, L., Hu, R., Li, M., Li, F., Meng, H., Zhu, G., Lin, J., Feng, H., 2013. Deferoxamine attenuates iron-induced long-term neurotoxicity in rats with traumatic brain injury. *Neurol. Sci.* 34, 639-645.
- Zhang, X.Y., Cao, J.B., Zhang, L.M., Li, Y.F., Mi, W.D., 2015. Deferoxamine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment in mice. *J. Neuroinflammation.* 12, 20.
- Zhao, L., Hadziahmetovic, M., Wang, C., Xu, X., Song, Y., Jinnah, H.A., Wodzinska, J., Iacovelli, J., Wolkow, N., Krajacic, P., Weissberger, A.C., Connelly, J., Spino, M., Lee,

M.K., Connor, J., Giasson, B., Harris, Z.L., Dunaief, J.L., 2015. Cp/Heph mutant mice have iron-induced neurodegeneration diminished by deferiprone. *J. Neurochem.* 135, 958-974.

### **Figure captions**

#### **Figure 1 – Effect of chronic DFP on recognition memory in iron-treated rats.**

Object recognition memory in rats treated neonatally with vehicle (Veh) or iron and given water (Wtr) or deferiprone (DFP) chronically in adulthood (3 months of age). Statistical analysis was performed using one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).  $N = 10 - 18$  per group (see also Table 2 for  $N$  in each individual group). Statistically significant differences between Iron-Wtr vs. other groups in LTM retention session are indicated as \*\*  $P < 0.0001$ .

#### **Figure 2 – Effect of iron neonatal treatment and chronic adult DFP on cerebral FDG uptake analysis by microPET scan.**

Assessment of hippocampal (A) and cortical (B) metabolic activity in adult rats submitted to neonatal iron treatment and DFP in adulthood, 24h after the last DFP administration, determined by FDG uptake. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM,  $N = 4 - 8$  animals per group. No significant differences were found among the groups (one-way ANOVA).

#### **Figure 3 – Effect of neonatal iron treatment and chronic adult DFP on hippocampal BDNF levels.**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM pg of BDNF/ $\mu$ g of protein,  $N = 5 - 8$  animals per group. Rats were euthanized for BDNF measurements 24h after the completion of behavioral testing. Differences between Iron-Wtr *versus* other groups are indicated as: \* $P < 0.05$  (Tukey's *post hoc* test).

**Figure 4 – Effect of iron neonatal treatment and chronic adult DFP on hippocampal gene expression of *p75<sup>NTR</sup>* and *TrkB* neurotrophin receptors.** Relative *p75<sup>NTR</sup>* or *TrkB* gene expression in the hippocampus of adult rats treated neonatally with vehicle (Veh) or iron and treated with water (Wtr) or Deferiprone (DFP) chronically in the adulthood. Samples obtained from 5-6 animals in each group were normalized to *Hprt1* expression and run in quadruplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. No significant differences were found among the experimental groups.



**Table 1.** Primer sequences for RT-qPCR experiments included in the study

<b>Gene</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>Reference</b>
<i>Hprt1</i>	5'-GCAGACTTTGCTTTCCTTGG-3'	5'-CGAGAGGTCCTTTTCACCAG-3'	Bonefeld et al., 2008
<i>p75<sup>NTR</sup></i>	5'-CTGATGCTGAATGCGAAGAG-3'	5'-TCACCATATCCGCCACTGTA-3'	Choi and Friedman, 2014
<i>TrkB</i>	5'-CGGATGTTGCTGACCAAACC-3'	5'-ACCCATCCAGGGGGATCTTA-3'	Gao et al., 2014

**Table 2** – Total time (in seconds  $\pm$  S.E.M.) of object exploration during the training trial of object recognition of iron-treated rats submitted to chronic DFP administration.

<b>GROUP</b>	<b>N</b>	<b>Total time (s)</b>
<b>Vehicle – water</b>	11	66.7 $\pm$ 7.0
<b>Vehicle – DFP</b>	10	63.9 $\pm$ 4.0
<b>Iron – water</b>	18	58.4 $\pm$ 4.7
<b>Iron – DFP</b>	10	75.2 $\pm$ 5.9

No significant differences were found among the groups.

**Table 3** – Open-field behavior of iron-treated rats submitted to chronic adult DFP administration.

<b>GROUP</b>	<b>N</b>	<b>Latency to start locomotion (s) (Mean ± S.E.M.)</b>	<b>Number of crossings (Mean ± S.E.M.)</b>
<b>Vehicle – water</b>	11	6.1 ± 0.88	75.0 ± 8.2
<b>Vehicle – DFP</b>	10	8.0 ± 1.55	66.6 ± 7.8
<b>Iron – water</b>	18	7.5 ± 0.83	81.5 ± 3.9
<b>Iron – DFP</b>	10	7.3 ± 1.7	73.4 ± 6.1

Open-field behavior was analyzed during the habituation session for the object recognition task in iron-treated rats after chronic DFP administration. Data are expressed as mean ± SEM. No significant differences among the groups were found.

Figure 1

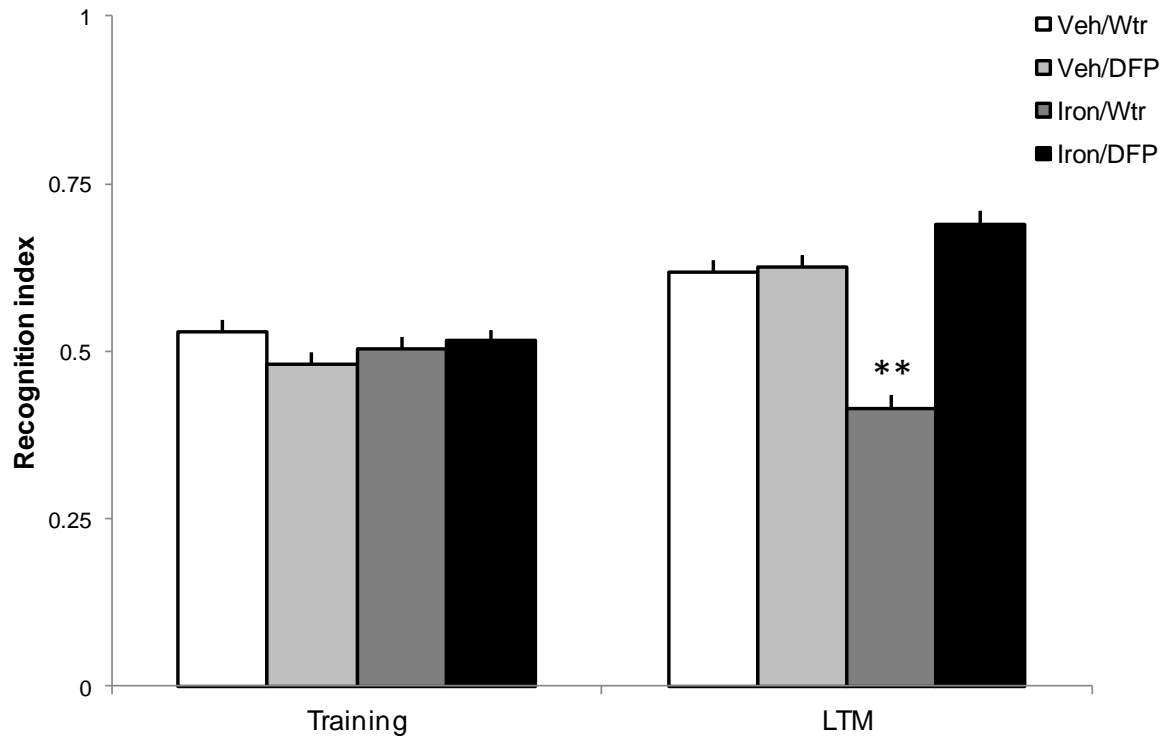


Figure 2

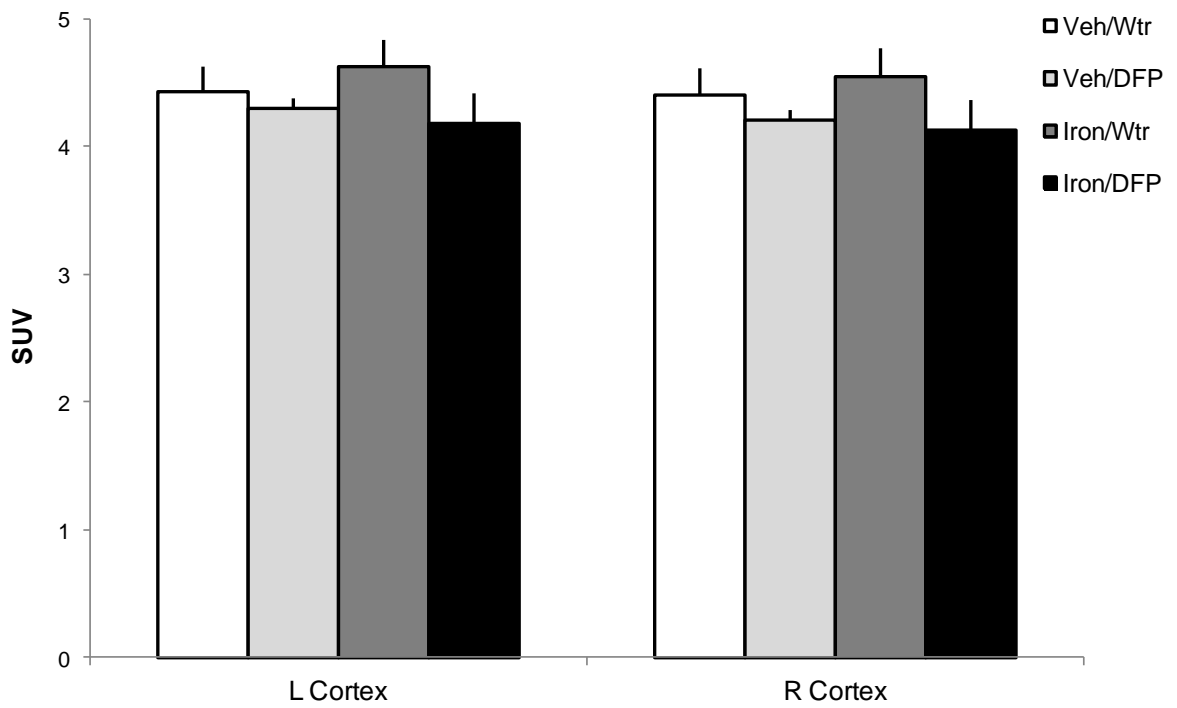
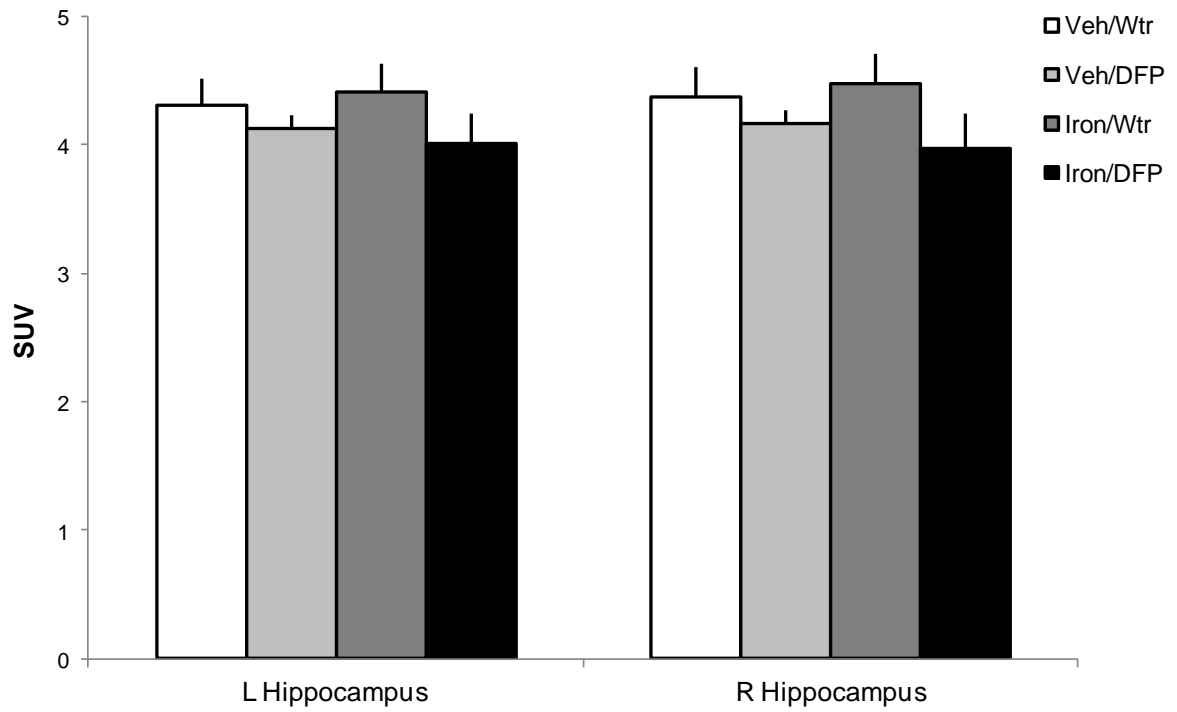


Figure 3

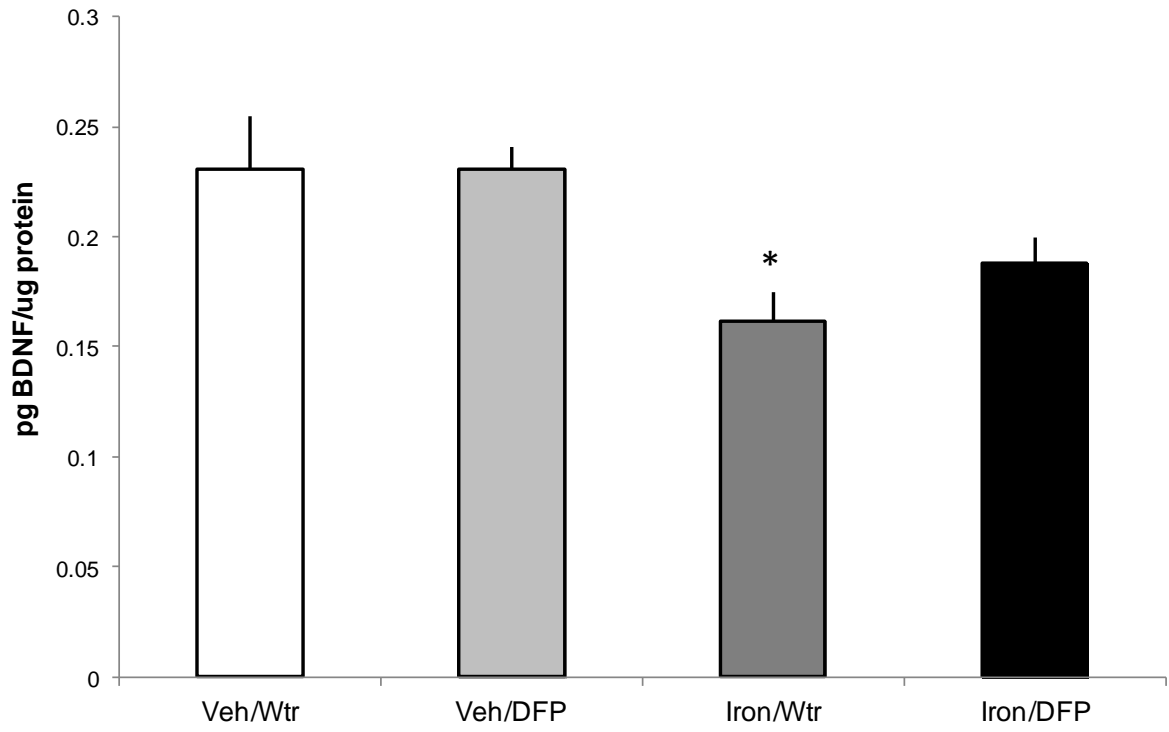
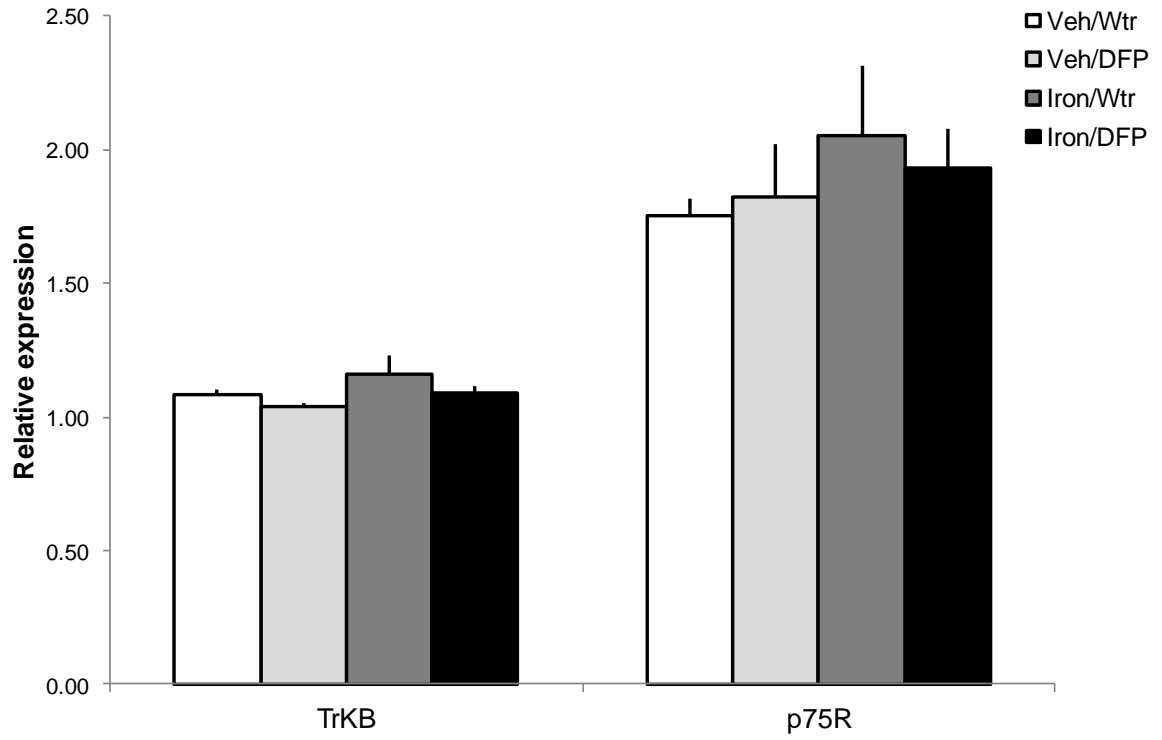


Figure 4



## **CAPÍTULO 3**



### 3.1 CONCLUSÕES

- A quelação de ferro na idade adulta, através do tratamento crônico com deferiprona, reverte os déficits de memória induzidos pelo ferro neonatal.
- O tratamento neonatal com ferro ocasiona uma redução nos níveis protéicos do fator neurotrófico do cérebro (BDNF) no hipocampo.
- O tratamento crônico com o quelante de ferro, deferiprona, na idade adulta restaura os níveis protéicos do fator neurotrófico do cérebro (BDNF) no hipocampo após redução ocasionada pela administração de ferro no período neonatal.
- O tratamento neonatal com ferro não provoca alterações estatisticamente significativas na expressão gênica do receptor tirosina quinase (TrkB) e p75<sup>NTR</sup> no hipocampo de ratos controles e ratos tratados.
- A análise do metabolismo glicolítico com <sup>18</sup>F-FDG, através do escaneamento com o microPET na idade adulta, de ratos controles e de ratos tratados com ferro no período neonatal e tratados com quelante de ferro, não provoca alterações estatisticamente significativas nem no hipocampo e nem no córtex cerebral.

### 3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Está amplamente aceito que o ferro é essencial no cérebro neonatal para o desenvolvimento neurológico normal e para o estabelecimento da concentração de ferro no cérebro adulto, já que a absorção do ferro no cérebro é máxima durante o período neonatal (Moos, 2002; Connor et al., 2005). Evidências consistentes sugerem que o acúmulo de ferro cerebral está implicado criticamente na patogênese de doenças neurodegenerativas (Belaidi e Bush, 2016). Por exemplo, o mapeamento da distribuição de ferro pela RM (Ressonância Magnética) revelou que os pacientes com DA têm os níveis de ferro aumentado no putamen, tálamo pulvinar, núcleo vermelho, hipocampo e córtex temporal (Langkammer et al., 2014). Para investigar as consequências funcionais e celulares do acúmulo de ferro e sua relação com distúrbios neurodegenerativos, desenvolvemos um modelo animal de sobrecarga de ferro (Schröder et al., 2013). Descobrimos que a sobrecarga de ferro aumenta o estresse oxidativo (de Lima et al., 2005) e marcadores apoptóticos (Miwa et al., 2011, da Silva et al., 2014), induz a gliose reativa (Fernandez et al., 2011), diminui a expressão do marcador sináptico, sinaptofisina (da Silva et al., 2014), induz alterações no sistema ubiquitina-proteassoma (Figueiredo et al., 2016), bem como na expressão de proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial (da Silva et al., 2014).

Os nossos resultados demonstraram que os ratos tratados com ferro apresentaram uma redução nos níveis de BDNF do hipocampo, enquanto que não se observou efeito na expressão de receptores de neurotrofina, TrKB e p75. As reduções de BDNF têm sido observadas em cérebros post mortem de pacientes com DA (Tanila, 2017). Sabe-se que o BDNF está envolvido criticamente na plasticidade sináptica do hipocampo e no aprendizado e na memória (Minichiello, 2009). Podemos levantar a possibilidade de que a redução do BDNF em ratos tratados com ferro possa explicar, pelo menos parcialmente, déficits de memória persistentes observados neste modelo animal.

À necessidade de compreensão da etiologia das doenças neurodegenerativas, soma-se a busca por estratégias de prevenção e tratamento dessas doenças. Nesse trabalho, objetivamos investigar o potencial terapêutico do deferiprona (DFP). O DFP é um quelante de ferro férrico que pode ser administrado por via oral, possui alta lipofilicidade e alta penetração nos tecidos e vem sendo indicado para o tratamento de sobrecarga sistêmica de ferro em pacientes com talassemia maior. O presente estudo permite demonstrar que o tratamento crônico com DFP na

idade adulta foi capaz de restaurar a memória de reconhecimento em animais tratados com ferro no período neonatal, sem afetar a atividade exploratória geral medida em campo aberto ou o tempo explorando objetos na fase de aquisição de memória da tarefa de reconhecimento de objetos.

No nosso trabalho, além de restaurar o déficit cognitivo induzido pela sobrecarga de ferro, DFP também aumentou os níveis de BDNF no hipocampo em ratos tratados com ferro. Estudos recentes demonstraram que outro quelante de ferro, a deferoxamina, recupera os níveis de BDNF em um modelo murino de disfunção cognitiva pós-operatória (Li et al., 2016) e em camundongos transgênicos para a DA (Guo et al., 2015). Outro quelante de ferro, o clioquinol, aumentou os níveis de BDNF em um modelo animal de parkinsonismo e demência associada ao *knockout* de tau (Lei et al., 2015). Os mecanismos pelos quais o acúmulo de ferro leva a diminuições nos níveis de BDNF ainda permanecem desconhecidos. No entanto, podemos sugerir que o estresse oxidativo induzido pelo ferro, os prejuízos mitocondrial e sináptico, podem levar à redução do BDNF, o que, por sua vez, contribuiria para a morte celular. Por outro lado, evidências sugerem que o BDNF pode desempenhar um papel na modulação do metabolismo do ferro. Zhang e colaboradores (2014) demonstraram que a toxina dopaminérgica 6-hidroxi-dopamina aumenta o influxo de ferro em neurônios mesencefálicos ventrais primários cultivados através de regulação positiva do transportador de metal divalente 1 com elemento responsivo ao ferro (DMT1 + IRE) e este efeito é consistentemente atenuado pelo BDNF. Assim, a modulação exercida pelo BDNF na absorção de ferro pode estar pelo menos parcialmente relacionada com os seus efeitos neuroprotetores.

Os déficits no metabolismo da glicose normalmente se relacionam com a diminuição da função cerebral associada à morte neuronal em áreas afetadas. Por exemplo, em pacientes com DA, a diminuição da captação de análogo de glicose radiomarcado  $^{18}\text{F}$ -FDG tem sido observada nas áreas corticais parietal temporal, parietal, posterior cingulada e inferior (Chew e Silverman, 2013; Li et al., 2008). No presente estudo, apesar das evidências experimentais consistentes que ligam o tratamento com ferro à disfunção neural e aos déficits cognitivos, não foram detectadas alterações significativas na captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG. A redução do metabolismo glicolítico neural observado em modelos animais de DA parece seguir um padrão progressivo dependente da idade. MacDonald e colaboradores (2014) relataram que a absorção de glicose foi diminuída em camundongos 5XFAD (modelo de camundongo de DA com cinco mutações) com 13 meses de idade, mas não quando as medidas foram feitas nos estágios iniciais, aos 2 ou 5 meses. Em nosso estudo, apenas medimos a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG em um ponto de tempo, quando os

animais tinham 3 meses de idade. É possível que as alterações celulares observadas nestes animais não sejam suficientes para induzir diminuições detectáveis na atividade metabólica na idade medida no presente estudo. Além disso, até onde sabemos, nenhum estudo pré-clínico ou clínico investigou os efeitos dos quelantes de ferro sobre o metabolismo da glicose. No presente estudo, o nosso grupo controle tratado durante 21 dias com DFP não diferiu do grupo que recebeu somente veículo, corroborando a sua segurança.

Em conclusão, esse trabalho demonstra que uma sobrecarga de ferro reduz os níveis de BDNF e que a quelação de ferro restabelece a expressão protéica de BDNF, podendo o DFP ser uma droga de proteção para o sistema nervoso. Espera-se que esse estudo possa contribuir a outras pesquisas na busca de um melhor entendimento do estresse oxidativo ocasionado pelo ferro, já que os agentes que aumentam a sinalização neurotrófica têm sido propostos como promissores no tratamento de tratamentos neurodegenerativos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott, N. J.; Patabendige, A. A.; Dolman, D. E.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiol Dis**, 37:13–25, 2009.
2. Alonso, M.; Vianna, M.R.; Depino, A.M.; Mello e Souza, T.; Pereira, P.; Szapiro, G.; Viola, H.; Pitossi, F.; Izquierdo, I.; Medina, J.H. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. **Hippocampus**, 12: 551-60, 2002.
3. Andrews, N.C. & Schmidt, P. J. Iron homeostasis. **Annu. Rev. Physiol**, 69:69–85, 2007.
4. Allen, S.J.; Watson, J.J.; Shoemark, D.K; Barua, N.U.; Patel, N.K. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration **Pharmacology & Therapeutics**, 138: 155–175, 2013.
5. Balaratnasingam, S., Janca, A. Brain Derived Neurotrophic Factor: A novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, 134:116–124, 2012.
6. Baptista, P.P.A.; Saur, L.; Baganati, P.B.; Greggio, S.;Venturin, G.T.; Vaz, S.P.; Ferreira, K.R.; Junqueira, J.S.; Lara, D.R.; Da Costa, J.C.; Jeckel,C.M.M.; Mestriner, R.G.; Xavier, L.L. Antidepressant Effects of Ketamine are not related to 18F-FDG metabolism or tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the ventral tegmental area of Wistar rats. **Neurochem. Res**, 40:1153–1164, 2015.
7. Barde, A.Y.; Edgar, D.;Thoenen,H. Purification of a new Neurotrophic factor from mammalian brain **The EMBO Journal** Vol.I No.5pp.549-553,1982
8. Bartzokis, G.; Tishler, T.A.; Lu, P.H.; Villablanca, P.; Altshuler, L.L.; Carter, M.; Huang, D.; Edwards, N.; Mintz, J. Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. **Neurobiol. Aging**, 28:414–423, 2007.
9. Belaidi, A.A., Bush, A.I. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. **J. Neurochem.** 139 Suppl 1, 179-197, 2016.
10. Bliss, T. V. & Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361:31–39, 1993.
11. Bohnen, N.I.; Djang, D.S.W.; Herholz, Karl.; Anzai, Y. & Minoshima, S. Effectiveness and Safety of 18F-FDG PET in the Evaluation of Dementia: A Review of the Recent Literature **J Nucl Med.** 53:59–71, 2012.
12. Connor, J. R.; Pavlick, G.; Karli, D.; Menzies, S. L. & Palmer, C. A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. **J Comp Neurol**, 355:111–123, 1995.

13. Chew, J., Silverman, D.H.. FDG-PET in early AD diagnosis. **Med. Clin. North Am.**, 97, 485-494, 2013.
14. Crichton, R. R.; Dexter, D. T. & Ward, R. J. Metal based neurodegenerative diseases- from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Coord Chem Rev**, 252:1189–1199, 2008.
15. Da Silva, V. K.; de Freitas, B. S.; Dornelles, A. S.; Nery, L. R.; Falavigna, L.; Ferreira, R. D. P.; Bogo, M. R.; Hallak, J. E. C.; Zuardi, A. W.; Crippa, J. A. S. & Schröder, N. Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNM1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection. **Mol Neurobiol**, 49(1): 222-233, 2014.
16. Dal-Pizzol, F.; Klamt, F.; Frota Jr, M. L. C.; Andrades, M. E.; Caregnato, F. F.; Vianna, M. M. R.; Schröder, N.; Quevedo, J.; Izquierdo, I.; Archer, T. & Moreira, J. C. F. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. **Developmental Brain Research**, 130:109–114, 2001.
17. Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science**, 302:819–822, 2003.
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**, 21:2521-2528, 2005a.
19. De Lima, M. N. M.; Dias, C. P.; Torres, J. P.; Dornelles, A.; Garcia, V. A.; Scalco, F. S.; Guimarães, M. R.; Petry, R. C.; Bromberg, E.; Constantino, L.; Budni, P.; Dal-Pizzol, F. & Schröder, N. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. **Neurobiol Aging**, 29:1052-1059, 2008.
20. De Lima, M.N.M.; Presti-Torres, J.; Caldana, F.; Grazziotin, M.M.; Scalco, F.S.; Guimarães, M.R.; Bromberg, E.; Franke, S.I.R.; Henriques, J.A.P. & Schröder, N. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. **European Journal of Pharmacology**, 570: 111–114, 2007.
21. Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J.C., Kluza, J., Petrault, M., Laloux, C., Jonneaux, A., Ryckewaert, G., Garçon, G., Rouaix, N., Duhamel, A., Jissendi, P., Dujardin, K., Auger, F., Ravasi, L., Hopes, L., Grolez, G., Firdaus, W., Sablonnière, B., Strubi-Vuillaume, I., Zahr, N., Destée, A., Corvol, J.C., Pörtl, D., Leist, M., Rose, C., Defebvre, L., Marchetti, P., Cabantchik, Z.I., Bordet, R.. Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. **Antioxid. Redox Signal**. 21, 195–210, 2014.
22. Dexter, D. T.; Carayon, A.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y.; Wells, F. R.; Daniel, S. E.; Lees, A. J.; Jenner, P. & Marsden, C. D. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. **Brain** 114, 1953–1975, 1991.

23. Dexter, D.T.; Wells F.R.; Agid F.; Lees A.J.; Jenner P& Marsden, C.D. Increased nigral iron content in postmortem Parkinsonian brain. **Lancet** 2, 1219-1220, 1987.
24. Dugan, L.L.; Kim-Han, J.S. Hypoxic Brain Injury and Oxidative Stress. In: Siegel, G.J.; Albers, R.W.; Brady, S.T.; Price, D.L. (Eds) **Basic Neurochemistry**. San Diego, CA, USA, Elsevier Academic Press, 2006. p. 559-574.
25. Dwork, A. J.; Lawler, G.; Zybert, P. A.; Durkin, M.; Osman, M.; Willson, N. & Barkai, A. I. An autoradiographic study of the uptake and distribution of iron by the brain of the young rat. **Brain Res**, 518:31–39, 1990.
26. Fagherazzi, E. V.; Garcia, V. A.; Maurmann, N.; Bervanger, T.; Halmenschlager, L. H.; Busato, S. B.; Hallak, J. E.; Zuardi, A. W.; Crippa, J. A. & Schröder, N. Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. **Psychopharmacology** (Berl), 199:284–91, 2012.
27. Fernandez, L. L.; Fornari, L. H. T.; Barbosa, M. V. & Schröder, N. Iron and neurodegeneration. **Scientia Medica**, 17:218–224, 2007.
28. Fernandez, L. L.; De Lima, M. N. M.; Scalco, F.; Vedana, G.; Miwa, C.; Hilbig, A.; Vianna, M. & Schroder, N. Early Post-Natal Iron Administration Induces Astroglial Response in the Brain of Adult and Aged Rats. **Neurotox Res**, 20:193–199, 2011.
29. Figueiredo, L.S.; Dornelles, A.S.; Petry, F.S.; Falavigna, L.; Dargél, V.A.; Köbe, L.M.; Aguzzoli, C.; Roesler, R. & Schröder, N. Two waves of proteasome-dependent protein degradation in the hippocampus are required for recognition memory consolidation. **Neurobiol Learn Mem**, 120:1-6, 2015.
30. Guo, C., Zhang, Y.X., Wang, T., Zhong, M.L., Yang, Z.H., Hao, L.J., Chai, R., Zhang, S. Intranasal deferoxamine attenuates synapse loss via up-regulating the P38/HIF-1 $\alpha$  pathway on the brain of APP/PS1 transgenic mice. **Front. Aging Neurosci.** 7, 104, 2015.
31. Guo, C., Wang, T., Zheng, W., Shan, Z.Y., Teng, W.P., Wang, Z.Y. Intranasal deferoxamine reverses iron-induced memory deficits and inhibits amyloidogenic APP processing in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging.** 34, 562-575, 2013.
32. Halliwell, B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? **Acta Neurol Scand Suppl**, 126:23–33, 1989.
33. Herholz, K.; Boecker, H.; Nemeth, I.; Dunn, G. FDG PET in dementia multicenter studies and clinical trials. **Clin Transl Imaging;** 1:261–270, 2013.
34. Herholz, K.; Westwood, S.; Haense1, C.; Dunn, G. Evaluation of a Calibrated 18F-FDG PET Score as a Biomarker for Progression in Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment. **J Nucl Med.**; 52:1218–1226, 2011.

35. Hirsch, E.C.; Brandel, J.-P.; Galle P.; Javoy-Agid F. & Agid, Y. Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: An X-ray microanalysis. **J Neurochem** 56, 446-451, 1991.
36. Hoffman JM, Welsh-Bohmer KA, Hanson M, et al. FDG PET imaging in patients with pathologically verified dementia. **J Nucl Med.**;41:1920–1928, 2000.
37. Ishii, K.; Sakamoto, S.; Sasaki, M.; et al. Cerebral glucose metabolism in patients with frontotemporal dementia. **J Nucl Med.**39:1875–1878, 1998.
38. Jagust, W.; Reed, B.; Mungas, D.; Ellis, W. & Decarli, C. What does fluorodeoxyglucose PET imaging add to a clinical diagnosis of dementia? **Neurology** 69:871–877, 2007.
39. Janetzky, B., Reichmann, H., Youdim, M. B. H. & Riederer, P. Iron and Oxidative Damage in Neurodegenerative Diseases. **Wiley-Liss**, New York, 1997.
40. Kienzl, E.; Puchinger, L.; Jellinger, K.; Linert, W.; Stachelberger, H. & Jameson, R. F. The role of transition metals in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.**, 134(Supp.):69–78, 1995.
41. Laforce, R. Jr.; Buteau, J.P.; Paquet, N.; Verret, L.; Houde, M.; Bouchard, R.W. The value of PET in mild cognitive impairment, typical and atypical/unclear dementias: a retrospective memory clinic study. **Am J Alzheimers Dis Other Demen.**25:324–332, 2010.
42. Landau, S.M.; Harvey D.; Madison, C.M.; Reiman, E.M.; Foster, N.L.; Aisen, P.S.; Petersen, R.C. et al. Comparing predictors of conversion and decline in mild cognitive impairment. **Neurology.**;75:230–238, 2010.
43. Langkammer, C., Ropele, S., Pirpamer, L., Fazekas, F., Schmidt, R. MRI for iron mapping in Alzheimer's disease. **Neurodegener. Dis.** 13, 189-191, 2014.
44. Lee, D. W.; Sohn, H. O.; Lim, H. B.; Lee, Y. G.; Kim, Y. S.; Carp, R. I. & Wisniewski, H. M. Alteration of free radical metabolism in the brain of mice infected with scrapie agent. **Free Radic Res**, 30(6):499–507, 1999.
45. Lee, D. W.; Andersen, J. K. & Kaur, D. Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. **Mol Interv**, 6:89–97, 2006.
46. Lei, P., Ayton, S., Appukuttan, A.T., Volitakis, I., Adlard, P.A., Finkelstein, D.I., Bush, A.I. Clioquinol rescues Parkinsonism and dementia phenotypes of the tau knockout mouse. **Neurobiol Dis.** 81, 168-175, 2015.
47. Li, Y., Pan, K., Chen, L., Ning, J.L., Li, X., Yang, T., Terrando, N., Gu, J., Tao, G. Deferoxamine regulates neuroinflammation and iron homeostasis in a mouse model of postoperative cognitive dysfunction. **J. Neuroinflammation.** 13, 268, 2016.
48. Li, Y., Rinne, J.O., Mosconi, L., Pirraglia, E., Rusinek, H., DeSanti, S., Kemppainen, N., Nägren, K., Kim, B.C., Tsui, W., de Leon, M.J.. Regional analysis of FDG and PIB-



- PET images in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 35, 2169-2181, 2008.
49. Longo, F.M.; Yang, T.; Knowles, J.K.; Xie, Y.; Moore, L.A.; Massa, S.M. Small Molecule Neurotrophin Receptor Ligands: Novel Strategies for Targeting Alzheimer's Disease Mechanisms **Current Alzheimer Research.**; 4: 503-506, 2007.
  50. Macdonald, I.R., DeBay, D.R., Reid, G.A., O'Leary, T.P., Jollymore, C.T., Mawko, G., Burrell, S., Martin, E., Bowen, C.V., Brown, R.E., Darvesh, S. Early detection of cerebral glucose uptake changes in the 5XFAD mouse. **Curr. Alzheimer Res.** 11, 450-460, 2014.
  51. Mattson, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 1(2):120–129, 2000.
  52. Mattson, M.P. Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease **Annals of the New York Academy of Sciences.**; 1144: 97–112, 2008.
  53. Minichiello, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nat. Rev. Neurosci.** 10, 850-860, 2009.
  54. Miwa, C. P. ; De Lima, M. N.; Scalco, F.; Vedana, G.; Mattos, R.; Fernandez, L. L.; Hilbig, A.; Schröder, N. & Vianna, M. R. Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. **Neurotox Res**, 19:527-535, 2011.
  55. Moos, T. Brain iron homeostasis. **Dan Med Bull**, 49:279-301, 2002.
  56. Mosconi, L.; Tsui, W.H.; Herholz, K., et al. Multicenter standardized 18F-FDG PET diagnosis of mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and other dementias. **J Nucl Med.**49:390–398, 2008.
  57. Perez, V. P.; De Lima, M. N. M.; Silva, R. S.; Dornelles, A. S.; Vedana, Gustavo; Bogo, Maurício R.; Bonan, Carla D. & Schröder, Nadja. Iron Leads to Memory Impairment that is Associated with a Decrease in Acetylcholinesterase Pathways. **Current Neurovascular Research**, 7, 00-00, 2010.
  58. Quintana, C. About the presence of hemosiderin in the hippocampus of Alzheimer patients. **J Alzheimers Dis**, 12:157–160, 2007.
  59. Quintana, C.; Bellefqih, S.; Laval, J. Y.; Guerquin-Kern, J. L.; Wu, T. D.; Avila, J.; Ferrer, I.; Arranz, R. & Patiño, C. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. **J Struct Biol**, 153:42–54, 2006.
  60. Ramos, C.D.; Soares, J.J. PET e PET/CT em Oncologia **SBMN - Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular.** Editora Atheneu, Capítulo 2, 2011.
  61. Riederer, P. F. View on neurodegeneration as a basis for neuroprotective strategies. **Med Sci Monit**, 10:RA287–RA290, 2004.

62. Schindowski, K.; Belarbi K.; Bue' e, L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport **Genes, Brain and Behavior.**; 7 (Suppl. 1), 43–56, 2008.
63. Schröder, N.; Fredriksson, A.; Vianna, M. R.; Roesler, R.; Izquierdo, I. & Archer, T. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. **Behav Brain Res**, 124:77-85, 2001.
64. Schröder, N.; Figueiredo, L. S. & De Lima, M. N. M. Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies. **J Alzheimers Dis**, 34:797-812, 2013.
65. Sengstock, G. J.; Olanow, C. W.; Menzies, R. A.; Dunn, A. J. & Arendash, G. W. Infusion of iron into the rat substantia nigra: Nigral pathology and dose-dependent loss of striatal dopaminergic markers. **J. Neurosci. Res.**, 35:67–82, 1993.
66. Silverman, D.H.; Small, G.W.; Chang, C.Y. et al. Positron emission tomography in evaluation of dementia: regional brain metabolism and long-term outcome. **JAMA.**;286:2120–2127, 2001.
67. Sokoloff, L. Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. **Journd of Neurochrmsiry.**; 29:13.-26, 1977.
68. Tanila, H. The role of BDNF in Alzheimer's disease. **Neurobiol. Dis.** 97(Pt B), 114-118, 2017.
69. Wang, G, Hu, W., Tang, Q., Wang, L., Sun, X.G., Chen, Y., Yin, Y., Xue, F., Sun, Z. Effect comparison of both iron chelators on outcomes, iron deposit, and iron transporters after intracerebral hemorrhage in rats. **Mol. Neurobiol.** 53, 3576-3585, 2016.
70. Waldron, A.M., Wintolders, C., Bottelbergs, A., Kelley, J.B., Schmidt, M.E., Stroobants, S., Langlois, X., & Staelens, S. In vivo molecular neuroimaging of glucose utilization and its association with fibrillar amyloid- $\beta$  load in aged APPPS1-21 mice **Alzheimer's Res Ther** 7:76, 2015.
71. Winzer, K.; Becker, W.; Van Noorden, C. J. F. & Köhler A. Short time induction of oxidative stress in hepatocytes of the European flounder (*Platichthys flesus*). **Mar Environ Res**, 50:495-501, 2000.
72. Wu, L. J.; Leenders, A. G.; Cooperman, S.; Meyron-Holtz, E.; Smith, S.; Land, W.; Tsai, R. Y.; Berger, U. V.; Sheng, Z. H. & Rouault, T. A. Expression of iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood brain barrier. **Brain Res.**, 1001, 108–117, 2004.
73. Youdim, M. B.; Ben-Shachar, D. & Riederer, P. Iron in brain function and dysfunction with emphasis on Parkinson's disease. **Eur. Neurol**, 31:34–40, 1991.
74. Yu, S. Review of 18F-FDG synthesis and quality control. **Biomed Imaging Interv J** 2(4):e57, 2006.

75. Zhang, H.Y., Song, N., Jiang, H., Bi, M.X., Xie, J.X. Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor inhibit ferrous iron influx via divalent metal transporter 1 and iron regulatory protein 1 regulation in ventral mesencephalic neurons. **Biochim. Biophys. Acta.** 1843, 2967-2975, 2014.
76. Zhao, L., Hadziahmetovic, M., Wang, C., Xu, X., Song, Y., Jinnah, H.A., Wodzinska, J., Iacovelli, J., Wolkow, N., Krajacic, P., Weissberger, A.C., Connelly, J., Spino, M., Lee, M.K., Connor, J., Giasson, B., Harris, Z.L., Dunaief, J.L. Cp/Heph mutant mice have iron-induced neurodegeneration diminished by deferiprone. **J. Neurochem.** 135, 958-974, 2015.
77. Zecca, L.; Youdim, M. B.; Riederer, P.; Connor, J. R. & Crichton, R. R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. **Nat Rev Neurosci**, 5:863–873, 2004.

## ANEXOS

## 1 - Comprovante de aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA



## SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7205

Porto Alegre, 15 de agosto de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Análise do envolvimento do Fator Neutrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e do metabolismo glicolítico cerebral através do escaneamento com microPET sobre a disfunção cognitiva induzida pelo acúmulo de ferro cerebral" coordenado por NADJA SCHRODER.

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

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

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
80	Rattus norvegicus	15/08/2016 - 15/04/2017

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)