

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO  
RIO GRANDE DO SUL**

VINÍCIUS PIETA PEREZ

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO EM  
DÉFICITS COGNITIVOS NO MODELO ANIMAL DE  
SOBRECARGA DO FERRO**

PORTO ALEGRE  
2009

**VINÍCIUS PIETA PEREZ**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO EM DÉFICITS COGNITIVOS NO  
MODELO ANIMAL DE SOBRECARGA DO FERRO**

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

Orientador: Prof.a Dr.a Nadja Schröder

Co-orientador: Prof.a Dr.a Carla Bonan

Porto Alegre, RS  
2009

*“O nosso cérebro é o melhor  
brinquedo já criado: nele encontram-se  
todos os segredos, inclusive o da  
felicidade.”*

*(Charles Chaplin)*

## **Agradecimentos**

A Deus.

A minha família, Cecília, Domingos e Giulia, por tudo sempre. O caminho é longo e sem aqueles que andam sempre ao nosso lado nada seria possível. Vocês são a estrutura que me apóia, os fundamentos do que sou e a quem nunca deixarei de amar. Não existem palavras, parágrafos ou páginas para dizer ou explicar o quão são importantes para mim.

A minha querida orientadora, Nadja. Por ter me aceitado, pela compreensão ao longo desses anos e pela enorme atenção. Existem professores, orientadores, educadores, e aqueles que seus ensinamentos vão além, para os quais olhamos e nos inspiramos. Enorme admiração pela pessoa e profissional que és.

Aos meus colegas do Instituto de Patologia, que se esforçaram para que eu pudesse seguir esse caminho.

A todos que possibilitaram que esse trabalho fosse realizado, pelo próprio trabalho dos mesmos, em especial a Rosane e a Noêmia e a todos que participaram dos longos fins de semana de experimentos.

A todos os demais que de alguma maneira estiveram ao meu lado, ou participaram da realização deste trabalho.

Obrigado!

## Resumo

Neste trabalho foram avaliados os efeitos da manipulação farmacológica do sistema colinérgico através do uso de um fármaco inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) e um agonista de receptores colinérgicos muscarínicos sob déficits na memória de reconhecimento induzidos pelo tratamento com ferro no período neonatal. Além disso, avaliou-se a atividade e expressão do RNAm da AChE em regiões cerebrais de ratos tratados com ferro no período neonatal. Desde a última década se sugere uma correlação entre o ferro e desordens neurológicas, especialmente as doenças neurodegenerativas. No período neonatal a absorção de ferro pelo cérebro é máxima, período em que os estoques e concentrações futuras deste metal se estabelecem. Ratos tratados do 12<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia de vida com 10 mg/kg (concentração de 1 mg/ml de ferro na solução) de ferro via tubo intragástrico, se desenvolvem aparentemente saudáveis até a vida adulta, porém, ao serem avaliados em tarefas cognitivas apresentam severos déficits nas mesmas. O sistema colinérgico é um dos principais sistemas envolvidos em processos cognitivos, tanto que o declínio observado no envelhecimento e em algumas doenças neurodegenerativas é em parte associado à perda de função deste sistema. Este estudo demonstra que a administração intraperitoneal (i.p.), única, imediatamente após o treino, de 1,0 mg/kg do inibidor da AChE, galantamina, a ratos adultos (3 meses) tratados com ferro é capaz de reverter totalmente o déficit cognitivo observado na tarefa de reconhecimento do objeto novo. De forma semelhante, o agonista muscarínico oxotremorine na dose de 0,5 mg/kg i.p. melhora o desempenho na mesma tarefa, mas sem total reversão do dano cognitivo. Ao se avaliar a atividade da AChE nas estruturas cerebrais de animais adultos (3 meses) tratados com ferro observou-se uma diminuição da mesma na região do estriado sem alterações nas regiões do córtex e hipocampo, porém essa diminuição da atividade ocorreu sem acompanhamento de alterações na expressão do RNAm, a qual não apresenta diferença entre o grupo controle e o tratado com ferro. Curiosamente, a atividade da AChE de ratos velhos (24 meses) não apresenta diferença entre o grupo

controle e o grupo tratado, e os valores encontrados para ambos são semelhantes àqueles dos ratos jovens (3 meses) tratados com ferro. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o dano cognitivo gerado pelo tratamento com ferro está relacionado, pelo menos em parte, a um dano na transmissão colinérgica estriatal, porém sem degeneração das fibras colinérgicas.

**Palavras chaves:** ferro. Acetilcolinesterase. Memória. Estriado. Galantamina. Oxotremorine.

## **Abstract**

The present study evaluated the effects of the pharmacological stimulation of cholinergic system by using an acetylcholinesterase (AChE) inhibitor and a cholinergic muscarinic agonist on recognition memory impairment induced by iron neonatal treatment. In addition we evaluated the AChE activity and mRNA expression in brain regions of rats treated neonatally with iron. Evidence indicates that iron accumulation in the brain might be involved in neurological disorders, particularly in neurodegenerative disorders. It is well documented that the neonatal period is critical for the establishment of iron content in the adult brain, and iron uptake by the brain is maximal during the neonatal period. Treatment with iron, 10,0 mg/kg (iron concentration 1 mg/ml), during postnatal days 12 -14 in rats, promotes midbrain iron accumulation and impairs long-term recognition memory in the adulthood. The cholinergic pathways are intimately involved in cognitive functions, such as learning and memory, and disruption of this system is involved in cognitive decline observed in aging and in neurodegenerative disorders. Our results showed that a single administration of a AChE inhibitor, galantamine at the dose of 1.0 mg/kg, immediately after training, completely reverses the recognition memory impairment induced by neonatal iron loading in adult rats (3 months of age). Using the same protocol, it was shown that the muscarinic agonist, oxotremorine, ameliorated the recognition memory deficits. Adult rats (3 months of age) treated neonatally with iron showed a decrease in AChE activity in striatum but not in cortex neither in hippocampus, and this decrease of AChE activity was not accompanied by alterations its mRNA. Curiously, AChE activity in aged rats (24 months of age) does not differ between groups, and the activities are similar of the adult iron group (3 months of age). The present results suggest that, at least in part, iron-induced cognitive deficits are related to a dysfunction of cholinergic neural transmission in striatum with no cholinergic degeneration.

**Key words:** iron. Acetylcholinesterase. Galantamine. Oxotremorine. Memory. Striatum.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>8</b>
1.1	INTRODUÇÃO .....	9
1.1.1	<b>Ferro e Neurodegeneração</b> .....	9
1.1.2	<b>Modelo Animal de Sobrecarga do Ferro</b> .....	12
1.1.3	<b>Sistema Colinérgico e Cognição</b> .....	14
1.2	OBJETIVOS.....	20
1.2.1	<b>Objetivos Gerais</b> .....	20
1.2.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	20
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>23</b>
	<b>Involvement of cholinergic system in cognitive dysfunction induced by iron loading</b> .....	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>55</b>
3.1	RESULTADOS NÃO PUBLICADOS .....	56
3.1.1	<b>Determinação da atividade acetilcolinesterásica em regiões cerebrais de ratos velhos</b> .....	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>
	<b>ANEXO – Comprovante de submissão a <i>Neuroscience</i></b> .....	<b>76</b>



## **1 CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## 1.1 INTRODUÇÃO

A cada ano a expectativa de vida mundial vem aumentando significativamente (Oeppen e Vaupel, 2002). Juntamente com esta modificação na distribuição populacional, diversas patologias têm sua importância acentuada como as doenças neurodegenerativas, que são desordens progressivas que afetam populações neuronais (Ricklefs e Finch, 1995).

Durante o envelhecimento fisiológico é observada uma perda característica da plasticidade sináptica, o que predispõe a uma perda da função cognitiva (Rossini *et al.*, 2007), e segundo a “hipótese colinérgica”, a degeneração de conexões específicas do sistema colinérgico são responsáveis, ao menos em parte, pela perda cognitiva e neurodegeneração resultante do envelhecimento e demência (Contestabile *et al.*, 2008). A melhor compreensão do desenvolvimento e da progressão dessas desordens é uma etapa crucial na melhora da qualidade de vida desses indivíduos.

### 1.1.1 Ferro e Neurodegeneração

O ferro é um dos metais mais abundantes no corpo humano, sendo necessário para diversos processos enzimáticos devido a sua capacidade de mobilizar elétrons facilmente (Andrews, 1999). Algumas regiões cerebrais possuem uma concentração substancialmente maior deste metal do que outros órgãos (Madsen e Gitlin, 2007). Entre as funções do ferro destacam-se a participação na constituição estrutural de proteínas transportadoras de oxigênio, o envolvimento no processo de fosforilação oxidativa em nível mitocondrial e a regulação gênica (Zecca *et al.*, 2004). No tecido nervoso o ferro catalisa reações envolvidas no metabolismo energético, e processos relacionados à síntese, degradação e mecanismos de ação de vários

neurotransmissores e neuromoduladores, entre os quais estão: o ácido gama-aminobutírico (GABA), o glutamato, a dopamina, a norepinefrina e as endorfinas (Connor *et al.* 2001; Madsen e Gitlin 2007). Uma vez que o ferro participa de tantos eventos importantes no encéfalo, é necessário que ele esteja numa forma facilmente disponível. Entretanto, o encéfalo também necessita de mecanismos que o protejam do dano oxidativo induzido pelo ferro, o que é realizado por uma homeostasia finamente regulada (Qian e Shen, 2001; Dringen *et al.*, 2007).

Apesar da elevada necessidade diária de ferro a absorção, pela dieta, é relativamente muito pequena, pois não há rotas fisiológicas de excreção deste metal e a disponibilidade diária provém principalmente da reciclagem pelo sistema retículo endotelial (Rouault, 2001; Andrews, 1999). O sistema nervoso central (SNC) possui características particulares quanto ao metabolismo do ferro quando comparado a outros órgãos. Primeiramente, há uma barreira vascular limitando as trocas com o plasma, a barreira hemato-encefálica (BHE). A expressão de proteínas regulatórias do metabolismo do ferro (IRPs – do inglês *iron regulatory proteins*) é grande (Zecca *et al.*, 2004) e o aporte, a partir do líquido cerebrospinal, é realizado por meio de um mecanismo semelhante às demais células do organismo (Qian e Shen, 2001; Rouault, 2001). As concentrações de ferro no SNC variam muito de uma região à outra, sendo que aquelas relacionadas a funções motoras tendem a possuir concentrações mais elevadas (Connor *et al.*, 2001). Nos gânglios da base, por exemplo, essa concentração é equivalente a do fígado. Assim como ocorre na absorção intestinal, as necessidades no SNC são muito maiores do que a absorção pela BHE, o que sugere uma reciclagem local constante. Essa reciclagem protege de uma possível sobrecarga tóxica ou deficiência, tanto que, dificilmente alterações sistêmicas no metabolismo do ferro alteram as concentrações no SNC após a BHE estar completamente formada (Madsen e Gitlin, 2007). A glia possui um papel de destaque na distribuição e armazenamento deste metal no SNC, os astrócitos parecem atuar como transportadores entre diferentes regiões (Dringen *et al.*, 2007) e os oligodentrócitos como fontes de estoque neste órgão (Zecca *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, diversas evidências clínicas e experimentais indicaram a participação do ferro nos mecanismos que levam à morte celular nas patologias

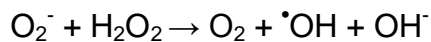
neurodegenerativas em que é observado o acúmulo desse metal. De fato, altos níveis de ferro em regiões específicas do encéfalo foram observados em diversas patologias neurodegenerativas, tais como as doenças de Parkinson (DP) (Kosta *et al.*, 2006; Gerlach *et al.*, 2006; Jellinger *et al.*, 1993; Faucheux *et al.*, 1993; Dexter *et al.*, 1991), de Alzheimer (DA) (Schenck *et al.*, 2006; Lynch *et al.*, 2000), de Huntington (DH) (Bartzokis e Tishler, 2000), Ataxia de Friedreich (Calabrese *et al.*, 2005), e Esclerose Amiotrófica Lateral (Carri *et al.*, 2003). Devido à capacidade do ferro de gerar radicais hidroxil, o seu acúmulo sugere que o estresse oxidativo esteja envolvido no processo degenerativo característico desses quadros (Berg e Youdim, 2006; Polla *et al.*, 2003), visto que o SNC possui um metabolismo altamente oxidativo, com conteúdo de fácil peroxidação, elevadas concentrações de ferro e apenas moderada atividade de enzimas antioxidantes (Zecca *et al.*, 2004; Mattson, 1998).

O ferro é um importante elemento nas reações de oxidação, íons  $\text{Fe}^{+2}$  livres reagem prontamente com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  através da reação de Fenton, gerando  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{OH}^-$ , e  $\text{Fe}^{+3}$  (Zecca *et al.*, 2004; Mattson, 1998), e através da reação de Haber-Weiss, promovendo a formação desses radicais pela interação do  $\text{O}_2^-$  com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Polla *et al.*, 2003).

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss (catalisada pelo ferro)



O ferro parece possuir um papel chave na mediação dos níveis de estresse oxidativo celular, porém ainda não se sabe se a sua neurotoxicidade atua como agente primário do dano, ou é uma consequência secundária das progressões patológicas (Whitnall e Richardson, 2006).

Assim como em processos patológicos, com o envelhecimento ocorre um acúmulo natural de ferro no encéfalo (Zecca *et al.*, 2004), principalmente em regiões relacionadas a doenças neurodegenerativas (Jellinger, 1999). Tem sido proposto que esse acúmulo de ferro poderia gerar um desequilíbrio entre os estoques de ferritina e o

ferro livre. Esse fato associado à diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes (que naturalmente ocorre durante o processo de envelhecimento) provocaria um meio propício para a elevação nos níveis de estresse oxidativo (Thompson *et al.*, 2003).

A DA é uma das doenças neurodegenerativas mais prevalentes entre a população de idosos, sendo caracterizada principalmente pela perda progressiva de neurônios do córtex cerebral e do hipocampo, regiões chave para a manutenção da capacidade cognitiva. Os marcadores neuropatológicos da DA, são a presença de placas senis extracelulares (que são agregados de resíduos da proteína  $\beta$ -amilóide) e de emaranhados neurofibrilares intracelulares (resultado da expressão de uma forma anormal da proteína *tau*) (Cotran *et al.*, 1996). O mecanismo pelo qual a patologia desenvolve-se ainda não é plenamente compreendido, entretanto a presença de depósitos de ferro ao redor das placas senis tem sugerido que esse metal possa estar contribuindo para a formação das mesmas (Whitnall e Richardson, 2006; Huang *et al.*, 2004; Connor e Menzies, 1995). Na molécula do RNAm do precursor da proteína amilóide (PPA) há um sítio de ligação para as IRPs (Whitnall e Richardson, 2006; Liu *et al.*, 2006). Adicionalmente, acredita-se que o estresse oxidativo induzido pelo ferro também desempenhe um papel importante durante a patogênese da DA (Whitnall e Richardson, 2006).

### **1.1.2 Modelo Animal de Sobrecarga do Ferro**

Os modelos animais de transtornos psiquiátricos são instrumentos muito importantes para o estudo dos mecanismos neurais que envolvem essas patologias, bem como para a elaboração de possíveis intervenções terapêuticas. O desenvolvimento de modelos eficientes é muito complicado, uma vez que a patogênese dos transtornos ainda não é clara, a maioria dos diagnósticos depende da comunicação verbal e a maior parte dos sintomas são expressos através de experiências subjetivas dos indivíduos. Como muitas desordens humanas não se manifestam

espontaneamente em animais, é necessário mimetizar as mudanças funcionais características dessas patologias através da manipulação comportamental, farmacológica ou genética (Halbach *et al.*, 2004).

O período neonatal é crítico para o estabelecimento do conteúdo de ferro no cérebro adulto. Investigações a respeito da captação de ferro pelo encéfalo indicam que o transporte de ferro ao encéfalo atinge seus níveis máximos durante o período pós-natal de rápido crescimento cerebral (Taylor e Morgan, 1990; Taylor *et al.*, 1991). Porém, a distribuição encefálica de ferro altera-se durante os processos de desenvolvimento e envelhecimento (Benkovic e Connor, 1993), e disfunções nas vias de manutenção desta homeostasia podem promover os depósitos, e desse modo, contribuir para os eventos que levam à neurodegeneração (Rouault e Cooperman, 2006; Zecca *et al.*, 2004; Thomas e Jankovic, 2004; Kaur e Andersen, 2004; Sengstock *et al.*, 1993).

Um modelo animal de sobrecarga do ferro baseado na administração de ferro no período suscetível ao acúmulo desse metal no SNC foi gerado recentemente. Camundongos (Fredriksson *et al.*, 1999; 2000) e ratos (Schröder *et al.*, 2001) tratados com ferro durante o período neonatal apresentam, quando adultos, alterações no conteúdo encefálico deste metal, no comportamento motor e déficits de memória. Estes resultados tornam-se relevantes se considerarmos que no ser humano esta fase de rápido crescimento cerebral inicia-se no último trimestre de gravidez e estende-se ao longo do primeiro ano de vida (Dwork *et al.*, 1990), justamente quando os indivíduos são expostos à aplicação indiscriminada de fórmulas lácteas suplementadas com ferro, as quais podem apresentar conteúdo 10 (Europa) a 100 (EUA) vezes maior deste metal do que o leite materno (Lönnerdal, 1997). Portanto, enquanto no passado a ênfase havia sido dada ao combate à deficiência de ferro (anemia), a aplicação indiscriminada de suplementação de ferro a crianças durante seu primeiro ano de vida tornou importante estudar os mecanismos através dos quais o organismo pode se proteger contra o excesso desse metal (Bothwell, 1995).

No modelo animal de sobrecarga de ferro, ratos são tratados com ferro do 12º ao 14º dia de vida pós-natal e aos 2 meses de vida apresentam déficits nas memórias de reconhecimento (de Lima *et al.*, 2005a), espacial e emocional (Schröder *et al.*, 2001).

Estes animais também apresentam um aumento significativo na peroxidação lipídica na substância negra, no córtex e no hipocampo, bem como um aumento de danos oxidativos a proteínas nestas mesmas regiões cerebrais. Adicionalmente, há uma diminuição na atividade da superóxido-dismutase (SOD) nas mesmas regiões. Esses resultados sugerem que o ferro possa estar exercendo seus efeitos deletérios sobre a cognição através do aumento dos níveis de estresse oxidativo cerebral (de Lima *et al.*, 2005a).

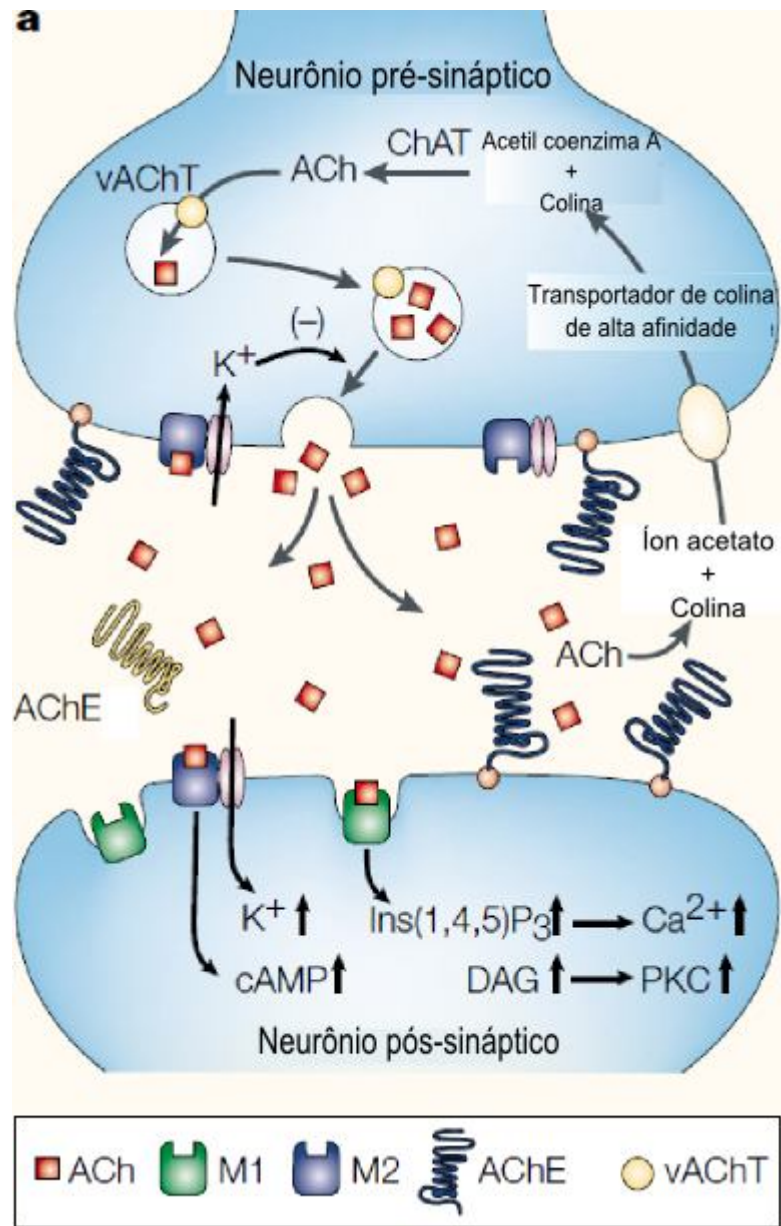
### **1.1.3 Sistema Colinérgico e Cognição**

O sistema colinérgico é constituído de neurônios que produzem e liberam o neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Purves *et al.*, 2001). No SNC o sistema colinérgico é um dos mais importantes neuromoduladores, em especial nos componentes da consciência (Perry *et al.*, 1999), aprendizado e memória (De-Mello *et al.*, 2005; Shinoe *et al.*, 2005). No encéfalo esse sistema se distribui em duas principais vias de inervações com diferentes projeções, mas que convergem em regiões do córtex e tálamo. As projeções colinérgicas da porção basal anterior do encéfalo para o córtex e tálamo são consideradas essenciais nos processos cognitivos (McKinney e Jacksonville, 2005; Perry *et al.*, 1999). De fato, o hipocampo participa diretamente nos processos de aprendizado e memória e é extensamente innervado por vias colinérgicas principalmente originárias do núcleo septal (Shinoe *et al.*, 2005). Além disto, a ACh é muito importante durante o desenvolvimento cortical, atuando diretamente no estabelecimento de contatos sinápticos na rede neuronal que irão servir as complexas funções cognitivas na vida adulta, e na remodelação estrutural dos circuitos corticais (Schliebs e Arendt, 2006). No estriado se encontra uma das regiões mais ricas em ACh. As fibras colinérgicas da região estriatal são em sua maioria constituídas por interneurônios, com importante papel na regulação das funções estriatais (Kayadjanian *et al.*, 1999) como relevantes processos motivacionais, plasticidade sináptica e

aprendizado (Bernácer *et al.*, 2007). Logo, há consideráveis evidências de que a perda de integridade dessas vias esteja envolvida no processo de declínio cognitivo (Roloff *et al.*, 2007; Prediger *et al.* 2006; McKinney e Jacksonville, 2005; Bernácer *et al.*, 2007).

Na fig.1.1 é representada uma sinapse colinérgica, onde a ACh é sintetizada no neurônio pré-sináptico a partir de colina e acetil-coenzima A pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), posteriormente é armazenada em vesículas via um transportador vesicular de ACh (vAChT). Uma vez que ocorra o estímulo e as vesículas liberem ACh na fenda sináptica, esta é rapidamente degradada num íon acetato e colina pela enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual se encontra em tetrâmeros ancorados a membrana plasmática ou como monômeros solubilizados na fenda (Soreq e Seiman, 2001). Liberada na fenda a ACh pode ativar dois tipos de receptores: nicotínicos ou muscarínicos (Purves *et al.*, 2001). Os receptores nicotínicos são receptores ionotrópicos localizados, no SNC, principalmente nos neurônios pré-sinápticos onde modulam a liberação do neurotransmissor (Gotti *et al.*, 2006), e estudos recentes demonstram que agonistas destes podem promover melhora nas memórias de reconhecimento e de trabalho (Boess *et al.*, 2007). Já os receptores muscarínicos são divididos em cinco tipos (M1-M5), e são os principais receptores mediadores dos estímulos colinérgicos, modulando vários canais iônicos e a excitabilidade neuronal. Dos cinco tipos de receptores o M1 parece possuir papel chave no processo de aprendizado e memória, promovendo a potenciação de longa duração e a plasticidade sináptica no hipocampo (Shinoe *et al.*, 2005). O bloqueio destes receptores com fármacos como a escopolamina, antagonista muscarínico, acaba por alterar a consolidação de novas memórias (Hasselmo, 2006), e durante o envelhecimento e em processos neurodegenerativos como a DA é observada uma perda destes receptores (Shinoe *et al.*, 2005).





**Fig. 1.1:** Representação esquemática de uma sinapse colinérgica (adaptado de Soreq e Seiman, 2001).

O aprendizado e a memória aparentemente declinam com a idade nos ratos e humanos, e os déficits na aquisição de tarefas espaciais são freqüentemente relacionados ao declínio da memória e do aprendizado. As alterações na memória e no aprendizado observadas no envelhecimento são extremamente relacionadas com aquelas induzidas pelo comprometimento do sistema colinérgico (De-Mello *et al.*, 2005).

Assim como o bloqueio de receptores muscarínicos pode prejudicar a memória e o aprendizado, outras classes de fármacos que afetam a transmissão colinérgica como quelantes da colina e bloqueadores nicotínicos, também geram efeitos negativos (Blokland, 1996). Estudos com fármacos estimuladores do sistema colinérgico vêm demonstrando resultados positivos. A pilocarpina, um agonista muscarínico não seletivo vastamente utilizado em modelos de epilepsia, ao ser administrada em ratos em doses não indutoras de crises epiléticas foi capaz de proteger dos déficits gerados pelo envelhecimento (De-Mello *et al.*, 2005; Prediger *et al.*, 2006). O oxotremorine, agonista muscarínico não seletivo, também demonstrou resultados favoráveis na reversão de déficits cognitivos. Em 2006, Srikumar e colaboradores conseguiram melhorar o desempenho cognitivo de ratos submetidos a estresse crônico com o uso do oxotremorine. O potencial do oxotremorine em melhorar o aprendizado e a memória vem sendo documentado em diversos modelos (Srikumar *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2001; Markowska *et al.*, 1995; Hagan *et al.*, 1989).

Assim como na DP ocorre uma diminuição nos níveis de dopamina devido à morte dos neurônios dopaminérgicos, na DA esse processo ocorre em relação aos neurônios do sistema colinérgico. A perda de neurônios da região basal anterior do cérebro é um dos achados característicos da DA, e essa degeneração é responsável pelo menos em parte pelos déficits cognitivos observados (Schliebs e Arendt, 2006; Prediger *et al.*, 2006). O maior constituinte das placas senis é a proteína  $\beta$ -amilóide, que provém da degradação da proteína precursora amilóide pela  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase (Schliebs e Arendt, 2006). A ativação dos receptores muscarínicos M1 e M3, mas não dos M2 e M4, estimulam a secreção da proteína precursora amilóide não-amiloidogênica e redução da formação do  $\beta$ -amilóide pela  $\alpha$ -secretase (Schliebs e Arendt, 2006; Prediger *et al.*, 2006). A atividade da AChE está proporcionalmente relacionada à agregação do  $\beta$ -amilóide e os inibidores da AChE aparentemente também aumentam a secreção da proteína precursora amilóide não-amiloidogênica (Schliebs e Arendt, 2006). Outro achado característico da DA são as inclusões celulares de emaranhados neurofibrilares da proteína *tau* hiperfosforilada. A ativação de receptores nicotínicos resulta em aumento da fosforilação da *tau*, enquanto a ativação dos receptores muscarínicos previne essa fosforilação (Schliebs e Arendt, 2006; Prediger *et al.*, 2006).

A degeneração dos neurônios colinérgicos na DA pode ser evidenciada pela redução na atividade das enzimas ChAT e AChE, sendo esta uma das principais alterações bioquímicas na DA (Rinne *et al.*, 2003), significativamente relacionada com os eventos patológicos e com a severidade da demência (Iyo *et al.*, 1997). Com a utilização da técnica PET (*Positron Emission Tomography*) foi possível avaliar a atividade da AChE em pacientes com DA, que apresentaram uma menor atividade cerebral, sendo a redução média de: 38% no córtex parietal, 31% região temporal, 24% córtex occipital, 20% córtex sensorimotor e 19% córtex frontal (Iyo *et al.*, 1997). Em pacientes com DA inicial ou dano cognitivo brando também se observou uma pequena redução, sendo 27% no hipocampo de pacientes com DA inicial (Rinne *et al.*, 2003).

Portanto, assim como na DP, utilizam-se inibidores da monoamino oxidase B, enzima responsável pela degradação da dopamina, a fim de aumentar a disponibilidade da dopamina (Antonini, 2007), na DA utilizam-se inibidores da AChE. Muitos inibidores da AChE já são disponibilizados comercialmente [por exemplo: o donepezil (Pfizer/Esai), a galantamina (Janssen-Cilag); a rivastigmina (Novartis) e a tacrina (Pfizer - atualmente em desuso)] (Perry *et al.*, 1999). A Galantamina é um alcalóide terciário, inibidor competitivo e reversível da AChE e permeável a BHE, com menor atividade e duração quando comparado a outros inibidores (Harvey, 1995). Porém, a galantamina possui um potencial de ligação alostérica em receptores nicotínicos, o que resulta em uma amplificação da ação da ACh, além de regular positivamente proteínas anti-apoptóticas (como a Bcl-2). A galantamina também pode se ligar aos receptores muscarínicos, mas somente em concentrações muito elevadas e sem ativação destes (Hernandez *et al.*, 2006). O estímulo crônico, em baixos níveis, da galantamina sobre os receptores nicotínicos parece também auxiliar na proteção contra a toxicidade do  $\beta$ -amilóide (Dimitrova e Getova-Spassova, 2006). Diversas evidências demonstram o potencial da galantamina na melhora de aspectos cognitivos. Doses de 1,0 mg/kg em camundongos são capazes de reverter déficits comportamentais induzidos pela escopolamina (Harvey, 1995). Enquanto doses de 3,0 mg/kg e 4,0 mg/kg melhoram o desempenho nas tarefas de esQUIVA inibitória e no labirinto aquático de Morris, respectivamente, em camundongos com lesão na região do núcleo basal, a qual reduz a atividade colinérgica cortical (Sweeney *et al.*, 1990). Aparentemente doses de 1,0

mg/kg são capazes de melhorar significativamente o aprendizado (Harvey, 1995). Em 2005, Gould e Feiro demonstraram que doses de 2,0 mg/kg de galantamina conseguem reverter déficits de retenção de memória em tarefas emocionais em camundongos. Num estudo recente, já foi observado que a galantamina também possui o potencial de melhorar a performance na tarefa de reconhecimento do objeto novo (Bruin e Pouzet, 2006).

Tarefas cognitivas que não necessitem de reforços condicionados, como privação de alimento ou emoção, são mais apropriadas no estudo de mecanismos envolvidos na performance cognitiva (Murai *et al.*, 2007). A tarefa de reconhecimento do objeto novo foi desenvolvida como uma tarefa de memória, não espacial e não condicionada, é baseada na tendência espontânea de explorar estímulos novos (Murai *et al.*, 2007; Bruin e Pouzet, 2006; de Lima *et al.*, 2005a). Nela, os animais são apresentados a dois objetos idênticos na fase de treino, e após algum tempo são novamente apresentados a dois objetos sendo um novo (de Lima *et al.*, 2005a). A tarefa de localização do objeto é uma tarefa semelhante não condicionada, porém para avaliação de memória espacial. Ao se avaliar esta tarefa com camundongos que receberam escopolamina, um antagonista muscarínico, foi demonstrado déficits nesta tarefa, e ao se administrar donepezil, um inibidor da AChE, antes do treino foi observada melhora no desempenho na mesma tarefa (Murai *et al.*, 2007).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivos Gerais

Avaliar parâmetros bioquímicos do sistema colinérgico no modelo de sobrecarga de ferro cerebral e os efeitos da manipulação do sistema colinérgico sobre os déficits cognitivos induzidos pelo acúmulo de ferro.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento agudo com o agonista muscarínico não seletivo, Oxotremorine-M (Sigma-Aldrich), sobre os déficits de memória na tarefa de reconhecimento do objeto novo induzidos pela administração de ferro no período neonatal.
- Avaliar os efeitos do tratamento agudo com o fármaco inibidor da enzima AChE, Galantamina (Remynil ®, Janssen-Cilag), em ratos na fase adulta sobre os déficits de memória na tarefa de reconhecimento do objeto novo induzidos pela administração de ferro no período neonatal.
- Avaliar a atividade da enzima AChE em regiões cerebrais (córtex, hipocampo e estriado) na idade adulta de animais submetidos a sobrecarga de ferro no período neonatal.
- Avaliar a expressão da enzima AChE em estruturas cerebrais na idade adulta de animais submetidos a sobrecarga de ferro no período neonatal.

- Avaliar a atividade enzimática da AChE no córtex, hipocampo e estriado de ratos velhos, com 2 anos de idade submetidos ao tratamento com ferro neonatal.

Os resultados dos experimentos estão apresentados em dois capítulos. O capítulo 2 é constituído pelo artigo *Involvement of cholinergic system in cognitive dysfunction by iron loading*, submetido ao periódico *Neuroscience*, onde são descritos e comentados os resultados referentes aos efeitos das drogas colinérgicas na vida adulta (3 meses de idade) nos ratos tratados com ferro no período neonatal, e os resultados da atividade enzimática e da expressão do RNAm da enzima AChE nas regiões cerebrais dos mesmos. No capítulo 3 estão apresentados os resultados da avaliação da atividade da AChE nas regiões cerebrais de ratos velhos (2 anos de idade) tratados com ferro no período neonatal.

## 2 CAPÍTULO 2



**Research paper**

Section Editor: Clinical Neuroscience

**INVOLVEMENT OF CHOLINERGIC SYSTEM IN COGNITIVE DYSFUNCTION  
INDUCED BY IRON LOADING**

**Vinícius P. Perez,<sup>1</sup> Maria N. M. de Lima,<sup>1</sup> Rosane S. da Silva,<sup>2</sup> Arethusa S. Dornelles,<sup>1</sup> Gustavo Vedana,<sup>1</sup> Maurício R. Bogo,<sup>3</sup> Carla D. Bonan,<sup>2</sup> Nadja Schröder<sup>1,\*</sup>**

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

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

*<sup>3</sup>Genomics and Molecular Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil*

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

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

**List of abbreviations**

AChE – acetylcholinesterase

ASCh - acetylthiocholine

AD - Alzheimer's disease

DTNB - 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid

HD - Huntington's disease

NIH – National Institutes of Health

NMDA - *N*-methyl-D-aspartate

PD - Parkinson's disease

RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction

## ABSTRACT

Increasing evidence indicates that excessive iron in selective regions of the brain may be involved in the etiology of neurodegenerative disorders. Accordingly, increased levels of iron have been described in brain regions of patients in Parkinson's and Alzheimer's diseases. We have characterized neonatal iron loading in rodents as a novel experimental model that mimics the brain iron accumulation observed in patients with neurodegenerative diseases and produces severe cognitive impairment in the adulthood. In the present study we have investigated the involvement of the cholinergic system on iron-induced memory impairment. The effects of a single administration of the acetylcholinesterase (AChE) inhibitor galantamine or the muscarinic receptor agonist oxotremorine on iron-induced memory deficits in rats were examined. Male Wistar rats received vehicle or iron (10.0 mg/kg) orally at postnatal days 12 to 14. At the age of 2-3 months, animals were trained in a novel object recognition task. Iron-treated rats showed long-term impairments in recognition memory. The impairing effect was reversed by systemic administration of galantamine (1 mg/kg) immediately after training. In addition, iron-treated rats that received oxotremorine (0.5 mg/kg) showed enhanced memory retention. Rats given iron showed a decreased AChE activity in the striatum when compared to controls. The results suggest that, at least in part, iron-induced cognitive deficits are related to a dysfunction of cholinergic neural transmission in the brain. These findings might have implications for the development of novel therapeutic strategies aimed at ameliorating cognitive decline associated with neurodegenerative disorders.

**Key words:** neurodegeneration; object recognition memory; acetylcholinesterase; muscarinic cholinergic receptors; striatum; rat

Iron is a transition metal playing a central role in neural development as an essential component of oxidative metabolism and a co-factor for numerous enzymes (Andrews, 1999; Zecca et al., 2004). Increasing evidence indicates that iron accumulation in brain areas might be involved in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, like Alzheimer's (AD) (Lynch et al., 2000; Schenck et al., 2006), Parkinson's (Dexter et al., 1991; Faucheux et al., 1993; Jellinger et al., 1993; Kosta et al., 2006; Gerlach et al., 2006), Huntington's (HD) (Bartzokis and Tishler, 2000) and Hallervorden-Spatz diseases (Hayflick et al., 2006). In the human brain, iron content is higher in globus pallidus, substantia nigra and striatum. Patients with neurodegenerative disorders show high brain iron concentrations and increased associated oxidative stress providing evidence for a pivotal role of iron in neurodegeneration (Salazar et al., 2008).

It is well documented that the neonatal period is critical for the establishment of iron content in the adult brain, and iron uptake by the brain is maximal during the neonatal period (Moos, 2002). We developed an animal model in which iron administration in the neonatal period, in rodents, promotes midbrain iron accumulation (Schröder et al., 2001) and enhanced vulnerability to toxic injury (Fredriksson et al., 2001) in adult life. In fact, neonatal iron administration induces impairments in cognitive function in several memory tasks. In previous reports we have demonstrated that this treatment induces selective iron accumulation in brain regions, specifically in the basal ganglia, which was associated with spatial memory deficits in adult mice (Fredriksson et al., 1999; 2000) and memory disruption in an emotionally motivated learning model in rats (Schröder et al., 2001). In addition, this treatment impairs long-term recognition memory (de Lima et al., 2005a), a form of non-spatial and non-conditioned memory that

might be altered in non-demented aged individuals as well as in patients with AD (Flicker et al., 1987; Purdy et al., 2002; Schiavetto et al., 2002; de Lima et al., 2005b).

The cholinergic pathways are intimately involved in cognitive functions, such as learning and memory, and disruption of this system produces impairments in many learning and memory models (De-Mello et al., 2005). The loss of cholinergic pathways is a hallmark of aging and AD, demonstrated by decreased acetylcholinesterase (AChE) activity, which is related to impaired cognitive function (Iyo et al., 1997; Rinne et al., 2003; Bohnen et al., 2005). In normal aging or AD, modulation of cholinergic stimulus, with AChE inhibitors or cholinergic agonists, have been used aiming to improve the process of learning and memory (Markowska et al., 1995; Erkinjuntti 2002; Gould and Feiro 2005; Shinoe et al., 2005; Prediger et al., 2006).

Although we have extensively reported that iron neonatal treatment is deleterious to cognitive functioning in adult animals, the precise mechanisms involved in iron-induced memory disruption still remain to be investigated. In the present study, aiming to determine the involvement of the cholinergic system on iron-induced memory impairment, we have studied the effects of pharmacological manipulation of cholinergic system on iron-induced recognition memory impairment. Additionally, we evaluated the activity and expression of AChE in brain regions of rats treated neonatally with iron.

## ***Experimental procedures***

### *Animals*

Pregnant Wistar rats were obtained from Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde, Porto Alegre, Brazil. After birth, each litter was adjusted within 48 hours to contain eight rat pups. Each pup was maintained together with its respective mother in a plastic cage with sawdust bedding in a room at a temperature of 22 +/- 1° C and a 12 hours light/dark cycle. At the age of 4 weeks the pups were weaned and the males were selected and raised in groups of four rats. At postnatal treatment, the animals were supplied with standardized pellet food and tap water *ad libitum*. All efforts were made in order to minimize the number of animals used and their suffering. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996, and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior recommendations for animal care. The protocol for this research was approved by the Institutional Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (013/08 - CEUA).

### *Neonatal iron treatment*

The neonatal iron treatment has been described in detail elsewhere (Schröder et al., 2001; de Lima et al., 2005a; 2005c; 2007; 2008a). Briefly, 12-day-old rats pups received a single oral daily dose (10.0 ml/kg solution volume) of vehicle (5% sorbitol in water) (control group) or 10.0 mg/kg of body weight of Fe<sup>2+</sup> (Ferromyn®, AB Hässle, Göterborg, Sweden; iron concentration in the solution was 1.0 mg/ml) via a metallic gastric tube, for 3 days (postnatal days 12-14).

### *Cholinergic drugs administration*

At the age of 2-3 months, rats were trained in a novel object recognition task (see below). Immediately after the training trial, both groups were divided into three experimental groups receiving a single intraperitoneal injection of saline (vehicle), or Galantamine (Reminyl®, Janssen-Cilag), a selective AChE inhibitor, at dose of 1.0 mg/kg or Oxotremorine (Sigma-Aldrich, SP, Brazil), a muscarinic receptor agonist, at dose of 0.5 mg/kg. The doses were chosen on the basis of previous studies (Gralewicz et al., 2003; Gould and Feiro, 2005; Dimitrova and Getova-Spasova, 2006; Srikumar et al., 2006) and pilot experiments in our laboratory. Drug solutions were prepared freshly before each experiment.

### *Novel object recognition*

A rectangular open field (45 x 40 x 60 cm) with sawdust covering its floor was used in the novel object recognition task. On the first day, adult rats were submitted to a habituation session during which they were placed in an empty open field for 5 min. On the following day, rats were given a training trial in which they were left to explore two identical objects (objects A1 and A2) until they had accumulated 30 s of total object exploration time or for a maximum of 20 min as described in previous studies (de Lima et al., 2008a; 2008b; Dias et al., 2007).

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. The



objects were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. Between trials, the objects were washed with a 10% ethanol solution. In the testing trial (24 hours after the training session), rats were allowed to explore the open field for 5 min in the presence of the two objects: the familiar object A and a novel object B. These were placed in the same locations as in the training session. In retention test trials, the novel object was placed in 50% trials in the right side and 50% in the left side of the open field.

Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on the object was not considered as exploration. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio  $T_B / (T_A + T_B)$  ( $T_A$  = time spent exploring the familiar object A;  $T_B$  = time spent exploring the novel object B) (De Lima et al., 2005c; 2007; 2008a; Dias et al., 2007).

#### *AChE activity*

AChE activity was determined using the method of Ellman et al., (1961). Rats at the age of 2-3 months-old were euthanized by decapitation. Cortex, hippocampus and striatum were dissected and the tissue was homogenized in 5 volumes of buffered solution containing 320 mM Sucrose, 5.0 mM Hepes and 0.1 mM EDTA, pH 7.5, in a motor driven Teflon glass homogenizer. The protein concentrations used for enzymatic analysis were 0.4, 0.5-0.8, and 0.6-0.8 mg/ml, from striatum, hippocampus and cortex, respectively. Homogenates were incubated in a solution composed by DTNB and potassium phosphate buffer (DTNB final concentration 1 mM, pH 7.5) at the proportion of 1:4. The preincubation time was 2 min at 25° C and the enzyme reaction was initiated

by addition of 8.0 mM acetylthiocholine (ASCh). Substrate hydrolysis was monitored by the formation of thiolate dianion of DTNB at 412 nm for 2 min (30s intervals). AChE activity was expressed as micromole of thiocholine released per hour per milligram of protein. Controls to determine non enzymatic hydrolysis of ASCh were performed by incubation of ASCh, DTNB and potassium phosphate at the same proportion and concentration described, without addition of homogenates (da Silva et al., 2008).

Protein concentration was measured by the Commassie blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

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

Analysis of AChE expression in the striatum was carried out by a semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Striatum was isolated from rats for total RNA extraction with TRIzol reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer instructions. The cDNA species were synthesized with SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) for RT-PCR from 2 µg of total RNA and oligo (dT) primer in accordance with the suppliers. RT reactions were performed for 50 min at 50°C. cDNA (1µl) was used as a template for PCR with the specific primer for AChE. β-actin-PCR was performed as a control for cDNA synthesis. PCR reactions were performed (total volume of 25 µl) using a concentration of 0.2 µM of each primer indicated below and 200 µM and 1 U Taq Platinum DNA Polymerase in the supplied reaction buffer. Conditions for AChE PCR were as follows: initial 2 min denaturation step at 94°C, 1 min at 94°C, 1 min annealing step at 55°C, 1 min extension

step at 72°C for 32 cycles and a final 10 min extension at 72°C. Conditions for  $\beta$ -actin PCR were as follows: initial 1 min denaturation step at 94°C, 1 min at 94°C, 1 min annealing step at 58,5°C, 1 min extension step at 72°C for 34 cycles and a final 7 min extension at 72°C. The amplification products were: AChE 785 bp;  $\beta$ -actin 210 bp. Fragment length of PCR reactions was confirmed with Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), USA) and  $\beta$ -actin was carried out as an internal standard. PCR products were submitted to electrophoresis using a 1% agarose gel and the relative abundance of mRNA versus  $\beta$ -actin was determined by densitometry using freeware ImageJ 1.37 for Windows (Cognato et al., 2008). The following set of primers were used: for AChE: forward 5'- GAC TGC CTT TAT CTT AAT GTG -3'; and reverse 5'- CGG CTG ATG AGA GAT TCA TTG -3'; for  $\beta$ -actin: forward 5'- TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG -3'; and reverse 5'- TAC TCC TGC TTC CTG ATC CAC AT -3` (da Silva et al., 2008).

### *Statistical analysis*

Data for object recognition are expressed as median (interquartile ranges). Comparisons among groups were performed with a Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney *U* tests when necessary. Data for biochemical analysis are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) and were analyzed using Student's test. *p* values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

## **Results**

### *Effects of galantamine and oxotremorine on iron-induced object recognition memory deficits*

In order to exclude the possibility that the effects of iron or cholinergic drugs would alter general behavioral parameters that could interfere with the memory acquisition process, we used a training protocol in which rats had to accumulate 30 seconds of total exploration of both objects. Statistical comparison of latency to reach the criterion of 30 seconds exploring both objects during the object recognition training session was used as an index of motor and exploratory activity. Kruskal-Wallis analysis of variance revealed no significant differences in the latency to reach criterion among groups ( $H = 5.39$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.370$ ), as shown in Table 1.

---

**INSERT TABLE 1 HERE**

---

The effects of the AChE inhibitor, galantamine, and the muscarinic agonist, oxotremorine, on object recognition memory in rats treated neonatally with iron are shown in Figure 1. Statistical comparison of recognition indexes in long-term retention test using Kruskal-Wallis analyses of variance indicated significant difference among groups ( $H = 25.96$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.001$ ).

Rats treated neonatally with iron that received saline in the adulthood showed significantly lower recognition indexes in long-term retention test than the control group Veh-Sal ( $p < 0.001$ ), indicating that iron given in the neonatal period induces severe recognition memory impairment (Fig.1).

Iron-treated rats that received galantamine at the dose of 1.0 mg/kg showed normal recognition memory, as their recognition index did not differ significantly from the control group ( $p = 0.705$ ), and were significantly higher than the Fe-Sal group's index ( $p < 0.001$ ), indicating that inhibition of AChE in the adulthood was able to completely reverse neonatal iron-induced recognition memory deficits (Fig. 1).

Animals treated with oxotremorine at the dose of 0.5 mg/kg showed a significantly higher performance on object recognition task than animals that were given Fe-Sal ( $p = 0.013$ ). However, oxotremorine at this dose was not able to completely reverse iron-induced memory impairment, since the performance of iron-treated rats that received oxotremorine was statistically different from the control group Veh-Sal ( $p = 0.016$ ). The results indicate that the selective muscarinic agonist ameliorated recognition memory deficits induced by iron.

The recognition indexes of groups treated with galantamine or oxotremorine treated neonatally with vehicle did not differ significantly from the control group Veh-Sal (Fig.1). Indeed, the treatment with cholinergic drugs was not able to improve or ameliorate recognition memory in normal rats.

---

**INSERT FIGURE 1 HERE**

---

*AChE activity and expression in brain regions of rats treated with iron in the neonatal period*

AChE activities in brain regions are shown in Figure 2. Statistical analysis indicated that iron neonatal treatment has not affected AChE activity neither in cortex nor in hippocampus of rats. However, AChE activity was decreased in the striatum of rats treated neonatally with iron in comparison to the control group ( $p = 0.007$ ).

Semi-quantitative RT-PCR experiments were conducted in order to verify if the inhibitory effect induced by iron treatment on striatal AChE activity could be a consequence of transcriptional control. No differences on AChE mRNA levels were found between controls and the iron treatment group (means of AChE/ $\beta$ -actin mRNA ratios from four independent experiments were  $0.70 \pm 0.02$  and  $0.72 \pm 0.05$ , for rats receiving vehicle or iron in the neonatal period, respectively).

---

**INSERT FIGURE 2 HERE**

---

## ***Discussion***

In the present study we have demonstrated that rats treated neonatally with iron present severe long-term recognition memory deficits, in accordance with previous studies performed in our laboratory (de Lima et al., 2005a; 2005c; 2007, 2008a). Although we have consistently reported that iron induces memory impairments in different learning paradigms in mice and rats (Fredriksson et al., 1999; Schröder et al., 2001; de Lima et al., 2005a) the precise mechanisms underlying iron-induced memory deficits still remain to be clarified. Here we show that drugs that modulate cholinergic neural transmission improved recognition memory deficits associated with iron loading, as both galantamine and oxotremorine administered immediately after training increased recognition indexes in iron-treated rats, without affecting recognition memory in control rats. The training protocol used in the present study, in which animals are trained to reach a criterion of time exploring the objects, excludes the possibility that the effects of iron neonatal treatment as well as those of galantamine or oxotremorine could be attributed to differential memory acquisition induced by the treatments. Moreover, we can rule out the possibility that the deleterious effect induced by iron neonatal treatment on recognition memory task could be explained by motor, exploratory or motivational impairments.

It is now widely accepted that a disruption of cholinergic systems may contribute to cognitive deficits observed in Alzheimer's disease, schizophrenia, age-associated mild cognitive impairment, among other CNS disorders (Ferreri et al., 2006; Schliebs and Arendt, 2006; Mufson et al., 2007). Galantamine is an inhibitor of AChE, approved for use in AD (Razay and Wilcock, 2008). The main rationale for using AChE inhibitors

such as galantamine would be increasing acetylcholine availability at the synaptic cleft, thus positively modulating cholinergic neural transmission. More recently, it has been proposed that galantamine could also act as an allosteric modulator of nicotinic acetylcholine receptors (Villarroya et al., 2007; Wang et al., 2007) and as an agonist at *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors (Moriguchi et al., 2004). A number of recent studies have investigated the effects of galantamine in preclinical tests using animal models of cognitive dysfunction. For instance, galantamine has been proved to be protective against memory loss induced by ischemia (Lorrio et al., 2007) scopolamine (de Bruin and Pouzet, 2006), beta-amyloid peptide (Wang et al., 2007) MK-801 (Csernansky et al., 2005) and aging (Gould and Feiro, 2005). In our study, galantamine was able to completely reverse iron-induced memory impairment. Besides inhibition of AChE, cholinergic replacement therapeutic strategies include the use of nicotinic and muscarinic acetylcholine receptor agonists. In the present study, we used oxotremorine, a muscarinic agonist that has been effective in reversing memory impairment induced by the chronic administration of the anticonvulsant drug, gabapentin (Blake et al., 2007). Other studies have also shown that oxotremorine is effective in facilitating memory (Srikumar et al., 2006; Schroeder and Packard, 2004).

From the results obtained in our behavioral study, indicating that enhanced cholinergic transmission was able to improve object recognition retention deficits associated with iron loading, we became interested in determining AChE activity in brain regions of iron-treated rats, aiming to examine cholinergic functioning. Previous studies have indicated that iron accumulation following neonatal treatment occurs selectively in the basal ganglia, and not in cerebral cortex of rodents (Fredriksson et al., 1999; 2000; Schröder et al., 2001). Accordingly, here we found that AChE activity, but not its mRNA



expression, was significantly reduced in the striatum, but not in cerebral cortex and hippocampus of rats treated neonatally with iron. The precise mechanisms involved on the reduction of striatal AChE activity in adult rats induced by iron neonatal treatment are unknown. Because of the time interval between the treatment in postnatal life and the alteration found in adulthood, direct enzymatic inhibition is unlikely to be involved. We hypothesize that iron accumulation triggers a cascade of events that might result in impaired cholinergic transmission or even to terminal degeneration that was revealed in our study as a decreased AChE activity. That is partially supported by the fact that stimulation of cholinergic transmission by galantamine and oxotremorine was able to reverse the cognitive deficit produced by iron. This alteration might not be caused by a direct neurotoxic effect producing neuronal death, since mRNA expression was not altered and previous findings have suggested that neonatal iron loading was not associated with overt neurotoxicity and oxidative stress in striatal neurons (de Lima et al., 2005a; Dal-Pizzol et al., 2001). Although the mechanisms and implications of the altered AChE activity observed remain unclear, previous evidence has indicated that a selective reduction of AChE without neuronal loss in the striatum might be associated with the pathogenesis of neurodegenerative disorders. Thus, a selective reduction of striatal AChE activity without cell death has been reported in both patients with HD and in the R6/1 transgenic mouse model of HD, in which reduced striatal cholinergic transmission was accompanied by spatial memory deficits (Smith et al., 2006). The authors suggest that a defect in cholinergic transmission without cell loss in the striatum might play a role in cognitive dysfunction associated with HD. The reduced striatal AChE activity produced by brain iron accumulation is thus consistent with alterations observed in HD and adds to previous evidence that neonatal iron loading in rodents leads to

several behavioral and neural features that parallel those associated with neurodegenerative disorders. Studies investigating possible changes in other biochemical parameters related to cholinergic transmission, such as choline acetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter, are warranted in our model.

Despite years of investigation, it is still not known why iron levels are abnormally high in some regions of the brain in neurodegenerative disorders. Also, it is not clear whether iron accumulation in the brain plays a causative role in neurodegeneration or is a consequence of the disease process. Taken together, the present findings suggest that iron accumulation in the brain disrupts cholinergic transmission which might have implications for the memory impairment observed in rats given neonatal iron overload. Based on the current knowledge that iron is accumulated in brain regions of patients with neurodegenerative disorders featuring cognitive dysfunction, our animal model may provide a tool for the investigation of multifactorial mechanisms that interact to produce memory decline observed in those patients.

### ***Acknowledgements***

This research was supported by CNPq-MCT grants 474739/2007-4 and 301368/2006-6 to N.S. G.V. is supported by a PIBIC/CNPq fellowship. V.P.P is supported by a CAPES/ MEC fellowship.

## References

1. Andrews NC, 1999. Disorders of Iron Metabolism. *N Engl J Med*, 341(26): 1989-1995.
2. Bartzokis G, Tishler TA, 2000. MRI evaluation of basal ganglia ferritin iron and neurotoxicity in Alzheimer's and Huntington's disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 46(4): 821-833.
3. Blake MG, Boccia MM, Acosta GB, Höcht C, Baratti CM, 2007. Opposite effects of a single versus repeated doses of gabapentin on retention performance of an inhibitory avoidance response in mice. *Neurobiol Learn Mem*, 87(2): 192-200.
4. Bohnen NI, Kaufer DI, Hendrickson R, Ivanco LS, Lopresti B, Davis JG, Constantine G, Mathis CA, Moore RY, DeKosky ST, 2005. Cognitive correlates of alterations in acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 380(1-2): 127-132.
5. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
6. Cognato GP, Czepielewski RS, Bogo MR, Bonan CD, 2008. Expression mapping of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1-3 (E-NPP1–3) in different brain structures during rat development. *Int. J. Devl Neuroscience*, 26: 593–598.
7. Csernansky JG, Martin M, Shah, R, Bertchume A, Colvin J, Dong H, 2005. Cholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits induced by MK-801 in mice. *Neuropsychopharmacology*, 30(12): 2135-2143.

8. Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota ML Jr, Andrades ME, Caregnato FF, Vianna MM, Schröder N, Quevedo J, Izquierdo I, Archer T, Moreira JC, 2001. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. *Brain Res Dev Brain Res*, 130(1): 109-114.
9. da Silva RS, Richetti SK, Da Silveira VG, Battastini AM, Bogo MR, Lara DR, Bonan CD, 2008. Maternal caffeine affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *Int J Dev Neurosci*, 26(3-4): 339-343.
10. de Bruin N, Pouzet B, 2006. Beneficial effects of galantamine on performance in the object recognition task in Swiss mice: deficits induced by scopolamine and by prolonging the retention interval. *Pharmacol Biochem Behav*, 85(1): 253-260.
11. de Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimarães MR, Scalco FS, Roesler R, Schröder N, 2008a. Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology*, 55(5): 788-792.
12. de Lima MN, Dias CP, Torres JP, Dornelles A, Garcia VA, Scalco FS, Guimarães MR, Petry RC, Bromberg E, Constantino L, Budni P, Dal-Pizzol F, Schröder N, 2008b. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol Aging*, 29(7): 1052-1059.
13. de Lima MN, Presti-Torres J, Caldana F, Graziotin MM, Scalco FS, Guimarães MR, Bromberg E, Franke SI, Henriques JA, Schröder N, 2007. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur Pharmacol*, 570(1-3): 111-114.

14. de Lima MN, Polydoro M, Laranja DC, Bonatto F, Bromberg E, Moreira JC, Dal-Pizzol F, Schröder N, 2005a. Recognition memory impairment and brain oxidative stress by postnatal iron administration. *Eur J Neurosci*, 21(9): 2521-2528.
15. de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schröder N, 2005b. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol*, 40(6): 506-511.
16. de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Graziotin MM, Garcia VA, Dal-Pizzol F, Bromberg E, Schröder N, 2005c. Selegiline protects against recognition memory impairments induced by neonatal iron treatment. *Exp Neurol*, 196(1): 177-183.
17. De-Mello N, Souza-Junior IQ, Carobrez AP, 2005. Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. *Behav Brain Res*, 158(2): 263-268.
18. Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Mariden CD, 1991. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain*, 114: 1953-1975.
19. Dias CP, De Lima MN, Torres J, Dornelles AS, Garcia VA, Scalco F, Guimarães M, Constantino L, Budni P, Dal-Pizzol F, Schröder N., 2007. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience*, 146: 1719-1725.
20. Dimitrova SD, Getova-Spassova DP, 2006. Effects of galantamine and donepezil on active and passive avoidance tests in rats with induced hypoxia. *J Pharmacol*, 101: 199-204.

21. Ellman GL, Courtney KD, Andres V jr, Feather-Stone RM, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7: 88-95.
22. Erkinjuntti T, 2002. Treatment options: the latest evidence with galantamine (Reminyl). *J Neurol Sci*, 203-204: 125-130.
23. Faucheux BA, Hirsch EC, Villares J, Selimi F, Mouatt-Prigent A, Javoy-Agid F, Hauw JJ, Agid Y, 1993. Distribution of <sup>125</sup>I-ferrotransferrin binding sites in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's disease. *J Neurochem*, 60(6): 2338-2341.
24. Ferreri F, Agbokou C, Gauthier S, 2006. Cognitive dysfunctions in schizophrenia: potential benefits of cholinesterase inhibitor adjunctive therapy. *J Psychiatry Neurosci*, 31(6): 369-376.
25. Flicker C, Ferris SH, Crook T, Bartus RT, 1987. A visual recognition memory test for the assessment of cognitive function in aging and dementia. *Exp Aging Res*, 13: 127-132.
26. Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T, 2001. Neonatal iron potentiates adult MPTP-induced neurodegenerative and functional deficits. *Parkinsonism Relat Disord*, 7(2): 97-105.
27. Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T, 2000. Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period. *Dev Brain Res*, 119: 65-74.

28. Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T, 1999. Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 159: 25-30.
29. Gerlach M, Double KL, Youdim MB, Riederer P, 2006. Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients. *J Neural Transm Suppl*, 70: 133-142.
30. Gould TJ, Feiro OR, 2005. Age-related deficits in the retention of memories for cued fear conditioning are reversed by galantamine treatment. *Behav Brain Res*, 165(2): 160-171.
31. Gralewicz S, Lutz P, Wiaderna D, Tomas T, 2003. Alteration in behavioral sensitivity to amphetamine after treatments with oxotremorine effect of dose and test environment. *Behav Brain Res*, 147: 163-173.
32. Hayflick SJ, Hartman M, Coryell J, Gitschier J, Rowley H, 2006. Brain MRI in neurodegeneration with brain iron accumulation with and without PANK2 mutations. *AJNR Am J Neuroradiol*, 27(6): 1230-1233.
33. Iyo M, Namba H, Fukushi K, Shinotoh H, Nagatsuka S, Suhara T, Sudo Y, Suzuki K, Irie T, 1997. Measurement of acetylcholinesterase by positron emission tomography in the brains of healthy controls and patients with Alzheimer's disease. *Lancet*, 349(9068): 1805-1809.
34. Jellinger KA, Kienzl E, Rumpelmaier G, Paulus W, Riederer P, Stachelberger H, Youdim MB, Ben-Shachar D, 1993. Iron and ferritin in substantia nigra in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 60: 267-272.

35. Kosta P, Argyropoulou MI, Markoula S, Konitsiotis S, 2006. MRI evaluation of the basal ganglia size and iron content in patients with Parkinson's disease. *J Neurol*, 253(1): 26-32.
36. Lorrio S, Sobrado M, Arias E, Roda JM, García AG, López MG, 2007. Galantamine postischemia provides neuroprotection and memory recovery against transient global cerebral ischemia in gerbils. *J Pharmacol Exp Ther*, 322(2): 591-599.
37. Lynch T, Cherny R, Bush AI, 2000. Oxidative processes in Alzheimer's disease: the role of Abeta-metal interactions. *Exp Gerontol*, 35: 445-451.
38. Markowska AL, Olton DS, Givens B, 1995. Cholinergic manipulations in the medial septal area: age-related effects on working memory and hippocampal electrophysiology. *J Neurosci*, 15: 2063-2073.
39. Moriguchi S, Marszalec W, Zhao X, Yeh JZ, Narahashi T, 2004. Mechanism of action of galantamine on N-methyl-D-aspartate receptors in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 310(3): 933-942.
40. Moos T, 2002. Brain iron homeostasis. *Dan Med Bull*, 49(4): 279-301.
41. Mufson EJ, Counts SE, Fahnstock M, Ginsberg SD, 2007. Cholinergic molecular substrates of mild cognitive impairment in the elderly. *Curr Alzheimer Res*, 4(4): 340-350.
42. Prediger RD, De-Mello N, Takahashi RN, 2006. Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats. *Eur J Pharmacol*, 531(1-3): 176-182.



43. Purdy KS, McMullen PA, Freedman M, 2002. Changes to the object recognition system in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn*, 49: 213-216.
44. Razay G, Wilcock GK, 2008. Galantamine in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*, 8(1): 9-17.
45. Rinne JO, Kaasinen V, Järvenpää T, Nagren K, Roivainen A, Yu M, Oikonen V, Kurki T, 2003. Brain acetylcholinesterase activity in mild cognitive impairments and early Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74(1): 113-115.
46. Salazar J, Mena N, Hunot S, Prigent A, Alvarez-Fischer D, Arredondo M, Duyckaerts C, Sazdovitch V, Zhao L, Garrick LM, Nunez MT, Garrick MD, Raisman-Vozari R, Hirsch EC, 2008. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(47): 18578-18583.
47. Schenck JF, Zimmerman EA, Li Z, Adak S, Saha A, Tandon R, Fish KM, Belden C, Gillen RW, Barba A, Henderson DL, Neil W, O'Keefe T, 2006. High-field magnetic resonance imaging of brain iron in Alzheimer disease. *Top Magn Reson Imaging*, 17(1): 41-50.
48. Schiavetto A, Kohler S, Grady CL, Winocur G, Moscovitch M, 2002. Neural correlates of memory for object identity and object location: effects of aging. *Neuropsychologia*, 40(8): 1428-1442.
49. Schliebs R, Arendt T, 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 113(11): 1625-1644.

50. Schröder N, Fredriksson A, Vianna MR, Roesler R, Izquierdo I, Archer T, 2001. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav Brain Res*, 24(1): 77-85.
51. Schroeder JP, Packard MG, 2004. Facilitation of memory for extinction of drug-induced conditioned reward: role of amygdala and acetylcholine. *Learn Mem*, 11(5): 641-647.
52. Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T, 2005. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci*, 25(48): 11194-11200.
53. Smith R, Chung H, Rundquist S, Maat-Schieman ML, Colgan L, Englund E, Liu YJ, Roos RA, Faull RL, Brundin P, Li JY, 2006. Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 15(21): 3119-3131.
54. Srikumar BN, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS, 2006. The involvement of cholinergic and noradrenergic systems in behavioral recovery following oxotremorine treatment to chronically stressed rats. *Neuroscience*, 143(3): 679-688.
55. Villarroya M, García AG, Marco-Contelles J, López MG, 2007. An update on the pharmacology of galantamine. *Expert Opin Investig Drugs*, 16(12): 1987-1998.
56. Wang D, Noda Y, Zhou Y, Mouri A, Mizoguchi H, Nitta A, Chen W, Nabeshima T, 2007. The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid 25-35 i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology*, 32(6): 1261-1271.

57. Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR, 2004. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 5(11): 863-873.

**Table 1** – Latency to reach criterion of time exploring both objects in the object recognition training (in seconds, data expressed as median [interquartile range]).

Group	<i>N</i>	Latency to reach criterion
Veh-Sal	10	172.5 [133.2/217.5]
Veh-Gal	10	191.0 [167.0/221.5]
Veh-Oxo	9	195.0 [144.0/226.5]
Fe-Sal	10	158.0 [146.7/185.5]
Fe-Gal	10	193.0 [183.0/214.0]
Fe-Oxo	10	191.0 [168.2/242.0]

### **Figure Legends**

**Figure 1.** Effects of galanthamine and oxotremorine on iron-induced recognition memory deficits. The drugs were administered immediately after the training session. Long-term memory (LTM) retention test was performed 24 h after training. Behavioral testing was carried out when animals were 2-3 months old. The proportion of the total exploration time that the animal spent investigating the novel object was the "Recognition Index" expressed by the ratio  $TN/(TF+TN)$ , TF = time spent exploring the familiar object and TN = time spent exploring the novel object. Data expressed as median [interquartile ranges]. Differences between vehicle-saline vs other groups are indicated as: \*\*P<0.01 and \*P<0.05; differences between iron-saline vs other groups are indicated as: # P<0.05.

**Figure 2.** Effect of neonatal iron treatment on AChE activity in brain regions of adult rats. Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (N = 5 per group). Differences between groups are indicated as # P < 0.01.

Figure 1

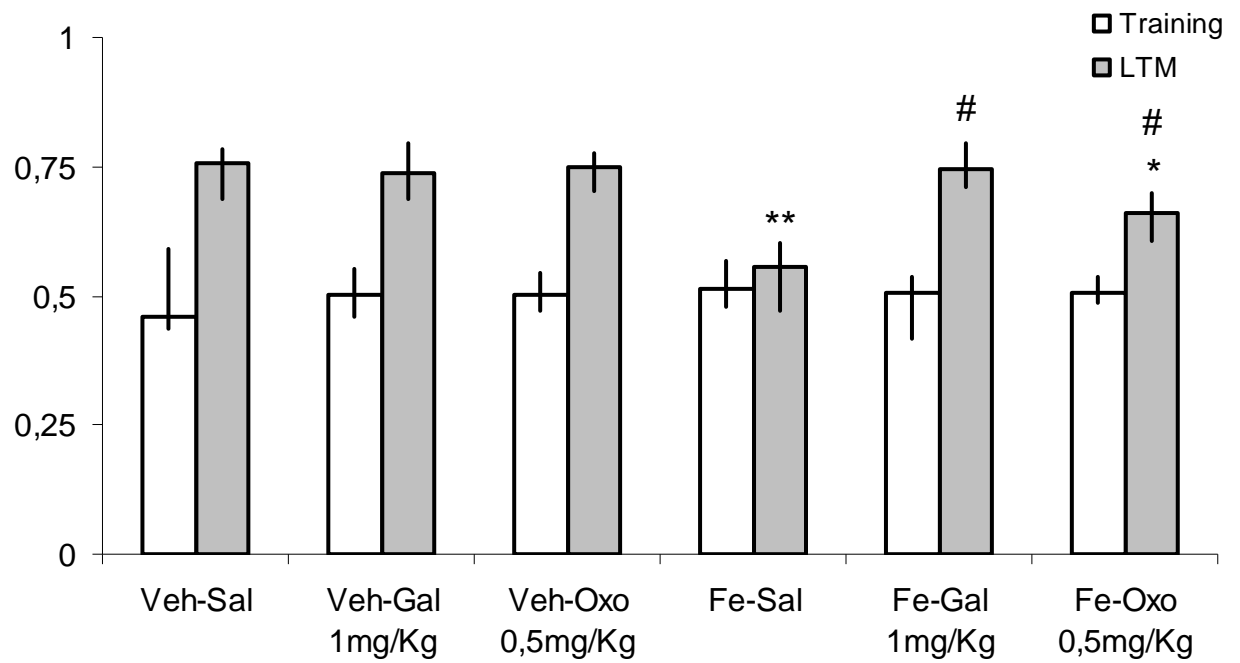
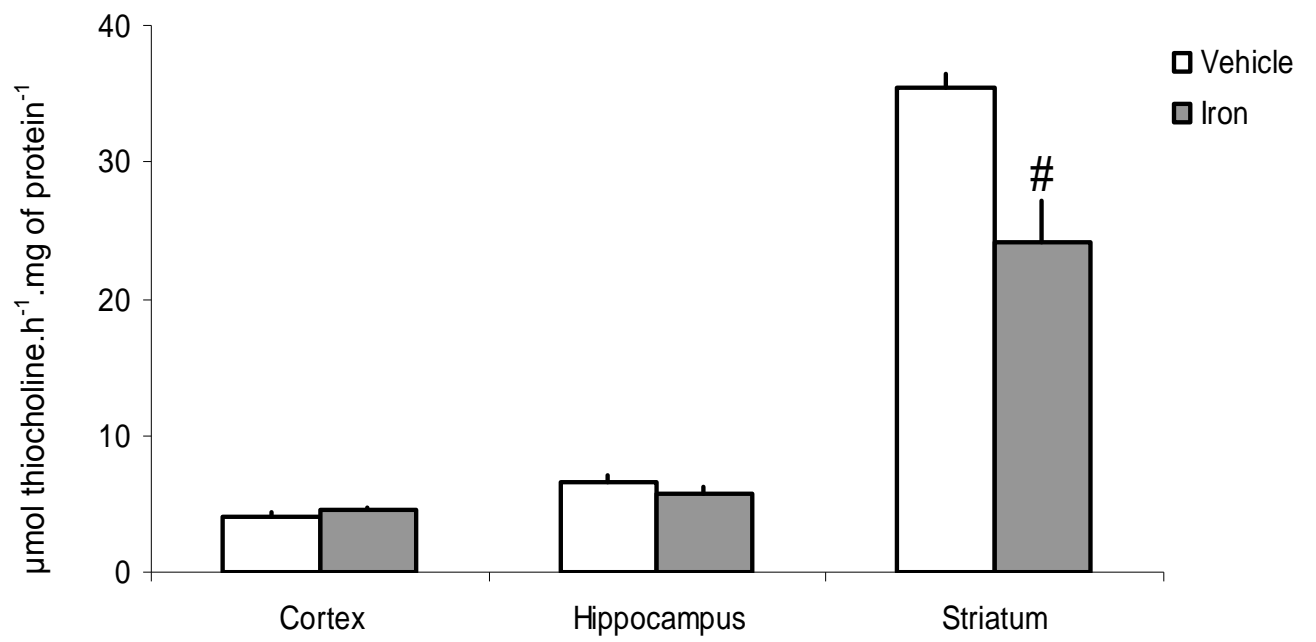


Figure 2



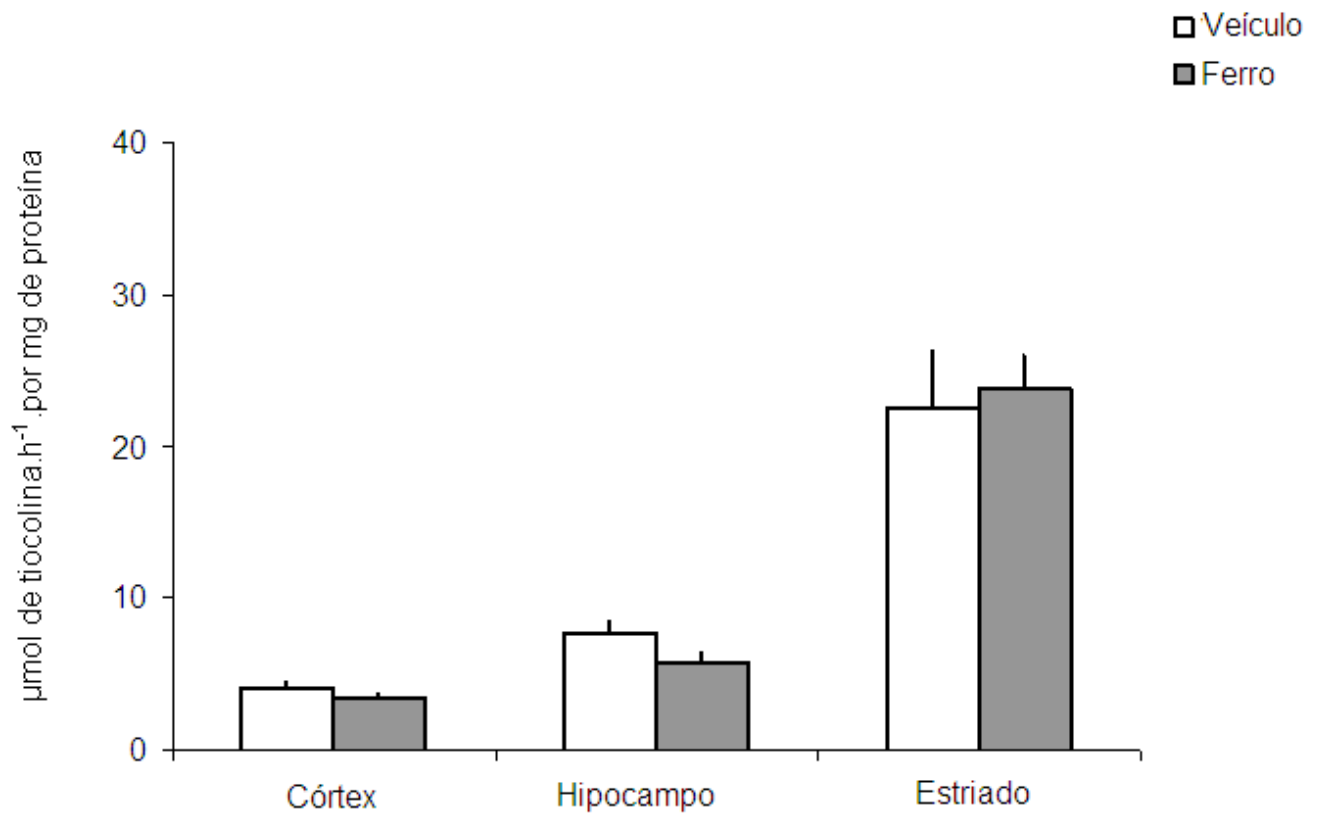
### 3 CAPÍTULO 3



### 3.1 RESULTADOS NÃO PUBLICADOS

#### **3.1.1 Determinação da atividade acetilcolinesterásica em regiões cerebrais de ratos velhos**

Ao se avaliar a atividade enzimática da AChE no córtex, hipocampo e estriado de ratos velhos, com 2 anos de idade submetidos ao tratamento com ferro neonatal e grupo controle, não foram observadas diferenças entre o grupo controle e o grupo tratado (Fig. 3.1). É interessante notar que os níveis de atividade da AChE em ratos velhos controles é semelhante aos níveis encontrados em ratos adultos tratados com ferro.



**Fig. 3.1:** Resultados das dosagens da atividade da enzima AChE em regiões cerebrais de ratos velhos (24 meses).

## **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Na última década se começou a relacionar o acúmulo de ferro e o desenvolvimento de desordens neurológicas como as doenças neurodegenerativas (Kosta *et al.*, 2006; Dexter *et al.*, 1991; Schenck *et al.*, 2006; Lynch *et al.*, 2000; Bartzokis e Tishler, 2000; Berg e Youdim, 2006; Polla *et al.*, 2003). Porém, questões chaves nessa relação ainda não estão elucidadas. Seria esse acúmulo de ferro uma consequência de processos neurodegenerativos ou uma causa direta ou indireta na desregulação do equilíbrio e morte celular? O modelo animal de tratamento com ferro no período neonatal vem sendo útil na compreensão dessa relação, demonstrando diversas alterações cognitivas e bioquímicas compatíveis com achados em distúrbios neurológicos (Fredriksson *et al.*, 1999; 2000; Schröder *et al.*, 2001; 2003; de Lima *et al.*, 2005a).

Estudos publicados previamente evidenciaram que roedores ao receberem tratamento com ferro no período neonatal apresentam alterações no perfil oxidativo cerebral na vida adulta (Dal-Pizzol *et al.*, 2001; de Lima *et al.*, 2005a). Em tarefas comportamentais estes animais apresentam déficits na retenção da memória de reconhecimento de longa duração (de Lima *et al.*, 2005a), assim como alterações em outras tarefas cognitivas (Fredriksson *et al.*, 1999; 2000; Schröder *et al.*, 2001; 2003). Esse modelo experimental comprova a relação entre o acúmulo de ferro e o declínio cognitivo. No entanto, os mecanismos e os sistemas envolvidos nesse processo ainda não são compreendidos.

Os processos de aprendizado e memória são intimamente relacionados ao sistema colinérgico. Há mais de duas décadas foi proposta a “hipótese colinérgica”, onde se sugere que a diminuição das vias ou dos estímulos colinérgicos estejam diretamente envolvidos com o declínio cognitivo (Terry e Buccafusco, 2003). Neste trabalho, nós avaliamos a participação do sistema colinérgico no estabelecimento dos déficits comportamentais induzidos pelo acúmulo de ferro. Muitos protocolos e estudos anteriores demonstraram o potencial de drogas colinérgicas em reverter e melhorar déficits cognitivos (Barnes *et al.*, 2000; Srikumar *et al.*, 2006). De forma semelhante, ao administrarmos duas drogas colinérgicas, galantamina ou oxotremorine, imediatamente após uma sessão de treino na tarefa de reconhecimento do objeto novo, observamos

que, ambas foram capazes de melhorar a retenção da memória nos ratos tratados com ferro.

A galantamina é um fármaco inibidor da enzima AChE, aprovada para uso em distúrbios neurológicos como a DA (Razay e Wilcock, 2008), sendo a sua principal ação esperada o aumento da disponibilidade da ACh na fenda sináptica, e conseqüente, aumento do estímulo colinérgico. Além desta ação a galantamina possui um potencial de ligação em receptores colinérgicos nicotínicos (Villarroya *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007) e receptores glutamatérgicos NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) (Moriguchi *et al.*, 2004), os quais podem ser também responsáveis pela melhora cognitiva observada. Em nosso experimento, uma dose única de 1,0 mg/kg de galantamina foi eficaz em reverter totalmente o déficit na memória de longa duração na tarefa de reconhecimento do objeto novo gerado pelo tratamento com ferro. Inibidores da AChE são amplamente conhecidos por resultados benéficos em tarefas cognitivas em modelos animais (Gould e Feiro, 2005; Dimitrova e Getova-Spassova, 2006; Murai *et al.*, 2007).

Avaliamos também outra classe de fármacos colinérgicos conhecidos por beneficiar o aprendizado e memória em modelos animais. A oxotremorine, uma droga agonista não seletiva de receptores muscarínicos, capaz de se ligar a estes receptores e ampliar o estímulo colinérgico (Schroeder e Packard, 2004). A administração de uma única dose de 0,5 mg/kg de oxotremorine após o treino, também se mostrou eficaz em melhorar o índice de reconhecimento na tarefa. Porém sem uma total reversão do déficit como presenciado com a galantamina. Em concordância com os nossos achados até o momento, estudos vem demonstrando o potencial do oxotremorine em reverter déficits de memória induzidos por tratamentos farmacológicos (Blake *et al.*, 2007) e na melhora do aprendizado (Schroeder e Packard, 2004; Srikumar *et al.*, 2006).

A partir das evidências obtidas no teste comportamental indicando que a estimulação da transmissão colinérgica foi capaz de reverter os déficits na memória de reconhecimento induzidos pelo ferro, avaliamos marcadores bioquímicos colinérgicos como a atividade da AChE e a expressão de seu RNAm em regiões cerebrais destes animais. Como descrito, o modelo animal de sobrecarga de ferro apresenta acúmulo desse metal em regiões específicas dos gânglios da base, e não em regiões como o córtex e hipocampo (Fredriksson *et al.*, 1999; 2000; Schröder *et al.*, 2001). Observamos

que a atividade enzimática da AChE está normal na região do córtex e hipocampo, mas há redução significativa na atividade da AChE não acompanhada de redução na expressão do seu RNAm na região do estriado. Estes dados nos sugerem um déficit na neurotransmissão colinérgica estriatal. Embora o acúmulo de ferro possa estar relacionado a um aumento no estresse oxidativo cerebral e dano celular, nossos achados refutam a possibilidade desse dano colinérgico ocorrer devido a neurodegeneração colinérgica, uma vez que a expressão do RNAm da AChE permanece normal e estudos anteriores demonstrarem que o acúmulo de ferro não está associado a um efeito neurotóxico, ou aumento do estresse oxidativo nos neurônios estriatais (Dal-Pizzol *et al.*, 2001; de Lima *et al.*, 2005a).

O mecanismo pelo qual a atividade da AChE se mostra alterada ainda é desconhecido. Porém, estudos prévios indicam reduções seletivas na AChE sem morte neuronal durante a patogênese de doenças neurodegenerativas. Por exemplo, na DH e no modelo experimental para esta doença utilizando camundongos transgênicos R6/1, se observa uma redução da transmissão colinérgica estriatal com redução da atividade da AChE e déficits de memória, porém, sem evidências de morte neuronal (Smith *et al.*, 2006). A região do estriado atua nos processos cognitivos, motores e motivacionais (Bernácer *et al.*, 2007), sendo uma das áreas com maior concentração de ACh. Esse sistema colinérgico estriatal atua principalmente por vias intrínsecas, com importante papel regulatório nas funções estriatais (Kayadjanian *et al.*, 1999), o que nos leva a crer que a perda da função cognitiva na DH pode estar ocorrendo por um déficit colinérgico estriatal sem degeneração celular. O comprometimento de processos celulares fundamentais é uma possível resposta para os achados. Na DA foram demonstradas alterações no processo de transporte axonal em populações neuronais, incluindo as colinérgicas (Daí *et al.*, 2002). O dano no transporte axonal pode ser, em parte, responsável por alterações na transmissão colinérgica, assim como outras importantes mudanças na captação de colina, liberação de ACh e déficits na expressão de receptores nicotínicos e muscarínicos (Terry e Buccafusco, 2003). Os achados colinérgicos no modelo animal de sobrecarga de ferro são similares àqueles observados no modelo da DH, e concordam com dados prévios (Fredriksson *et al.*, 1999; 2000; Schröder *et al.*, 2001; de Lima *et al.*, 2005a; 2005b) de que o tratamento

com ferro em roedores desencadeia déficits comportamentais e cognitivos que se assemelham àqueles observados em doenças neurodegenerativas.

A “hipótese colinérgica” também se aplica aos achados relativos ao envelhecimento. Segundo essa hipótese, a diminuição dos estímulos colinérgicos seria responsável, ao menos em parte, pela susceptibilidade ao declínio cognitivo observado no envelhecimento (Terry e Buccafusco, 2003). Curiosamente, alguns dos achados no modelo animal de tratamento com ferro são replicados em ratos velhos. Tratamentos que são eficazes em reverter os déficits cognitivos gerados pelo tratamento com ferro no período neonatal, também são aptos em reverter o déficit gerado pelo envelhecimento, como o quelante de metais desferroxamina (de Lima *et al.*, 2007; 2008) e o inibidor da MAO-B selegilina (de Lima *et al.*, 2005b; 2005c). Foi observado, também, que a administração de oxotremorine intraseptal melhora a performance da memória de trabalho (Markowska *et al.*, 1995) e o tratamento crônico com inibidores da AChE, galantamina e donepezil, melhora a performance da memória espacial (Hernandez *et al.*, 2006) em ratos velhos. Nesse trabalho, em dados não publicados, dosamos a atividade da AChE no córtex, hipocampo e estriado de animais velhos (2 anos). Ao contrário dos achados nos animais jovens (3 meses), não houve diferença estatística significativa na atividade da AChE entre o grupo controle e o grupo tratado com ferro em nenhuma das três estruturas. É importante ressaltar que os níveis de atividade da AChE no estriado de ratos velhos controles, encontram-se reduzidos com relação aos níveis encontrados em ratos jovens controles. Desta forma, podemos sugerir que o tratamento neonatal com ferro, é capaz de reduzir a atividade da AChE em ratos adultos à níveis comparáveis àqueles que são observados como consequência do envelhecimento. Esses dados se alinham com a “hipótese colinérgica” e reforça a idéia de que danos na transmissão colinérgica podem ser um dos mecanismos pelos quais se predispõe o desenvolvimento de déficits cognitivos induzidos pelo ferro.

É amplamente aceito que o desequilíbrio na transmissão colinérgica possa estar contribuindo para o processo de declínio cognitivo em doenças neurodegenerativas e no envelhecimento (Terry e Buccafusco, 2003). Além disso, também é compreendido que existe uma relação entre patologias neurodegenerativas e acúmulo de ferro.

Acúmulo esse que também é evidenciado durante o envelhecimento. Muitos dos achados relacionados ao declínio cognitivo podem estar relacionados a esses dois eventos, dano colinérgico e acúmulo de ferro, e é possível sugerir que o acúmulo de ferro leva a um desequilíbrio na neurotransmissão colinérgica estriatal e esse dano seja um dos processos responsáveis pelos déficits cognitivos observados em patologias neurológicas. Estudos complementares se fazem necessários para confirmar essa hipótese.

Como já dito, o modelo animal de tratamento com ferro no período neonatal é uma estimada ferramenta para a compreensão dos processos neuropatológicos e desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Nesse trabalho foi possível sugerir uma estratégia de reversão dos déficits cognitivos observados, juntamente com uma hipótese acerca do mecanismo responsável por esse dano.



## 5 CONCLUSÕES

- O tratamento agudo com o inibidor da AChE, galantamina, na dose de 1,0 mg/kg reverte totalmente o déficit de memória na tarefa de reconhecimento do objeto novo induzido pelo tratamento neonatal com ferro.
- O tratamento agudo com o agonista muscarínico, oxotremorine, na dose de 0,5 mg/kg atenua o déficit de memória na tarefa de reconhecimento do objeto novo induzido pelo tratamento com ferro neonatal.
- A atividade da enzima AChE, porém não o seu RNAm, em ratos adultos (3 meses), está significativamente diminuída na região cerebral do estriado de animais tratados com ferro quando comparados a animais controles.
- O desequilíbrio da transmissão colinérgica estriatal, porém não a perda desses neurônios, é um dos prováveis mecanismos responsáveis pelo dano cognitivo causado pelo acúmulo de ferro.

## REFERÊNCIAS

Andrews NC. **Disorders of Iron Metabolism.** N Engl J Med. 1999; 341(26):1989-95.

Antonini A. **New strategies in motor parkinsonism.** Parkinsonism Relat Disord. 2007;13 suppl 3:S446-9.

Barnes CA, Meltzer J, Houston F, Orr G, Mcgann K, Wenk GL. **Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors.** Neuroscience. 2000; 99(1):17-23.

Bartzokis G, Tishler TA. **MRI evaluation of basal ganglia ferritin iron and neurotoxicity in Alzheimer's and Huntington's disease.** Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2000;46(4):821-33.

Berg D, Youdim MB. **Role of iron in neurodegenerative disorders.** Top Magn Reson Imaging. 2006;17(1):5-17.

Benkovic SA, Connor JR. **Ferritin, Transferrin, and Iron in Selected Regions of the Adult and Aged Rat Brain.** J Comp Neurol. 1993;338:97-113.

Bernácer J, Prensa L, Giménez-Amaya JM. **Cholinergic interneurons are differentially distributed in the human striatum.** PLoS ONE. 2007;2(11):e1174.

Blake MG, Boccia MM, Acosta GB, Höcht C, Baratti CM. **Opposite effects of a single versus repeated doses of gabapentin on retention performance of inhibitory avoidance response in mice.** Neurobiol Learn Mem. 2007;87(2):192-200.

Blokland A. **Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory?** 1996;21(3):285-300.

Boess FG, De Vry J, Erb C, Flessner T, Hendrix M, Luithle J, et al. **The novel alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-**

**3-yl]-7-[2-(methoxy)phenyl]-1-benzofuran-2carboxamide improves working and recognition memory in rodents.** J Pharmacol Exp Ther. 2007;321(2):716-25.

Bothwell TH. **Overview and mechanisms of iron regulation.** Nutr Rev. 1995;53:237-45.

Bruin N, Pouzet B. **Beneficial effects of galantamine on performance in the object recognition task in swiss mice: deficits induced by scopolamine and by prolonging the retention interval.** Pharmacol Biochem Behav. 2006;85(1):253-60.

Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, et al. **Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia.** J Neurol Sci. 2005;233(1-2):145-62.

Carri MT, Ferri A, Cozzolino M, Calabrese L, Rotilio G. **Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals.** Brain Res Bull. 2003;61(4):365-74.

Connor JR, Menzies SL. **Cellular Management of Iron in the Brain.** J Neurol Sci. 1995;134:33-44.

Connor JR, Menzies SL, Burdo JR, Boyer PJ. **Iron and iron management proteins in neurobiology.** Pediatr Neurol. 2001;25(2):118-29.

Contestabile A, Ciani E, Contestabile A. **The place of choline acetyltransferase activity measurement in the "cholinergic hypothesis" of neurodegenerative diseases.** Neurochem Res. 2008; 33(2): 318-27.

Cotran RS, Kumar V, Robbins S, Schoen FJ. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.

Dai J, Buijs RM, Kamphorst W, Swaab DF. **Impaired axonal transport of cortical neurons in Alzheimer's disease is associated with neuropathological changes.** Brain Res. 2002;948(1-2):138-44.

Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota ML Jr, Andrades ME, Caregnato FF, Vianna MM, et al. **Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat.** Brain Res Dev Brain Res. 2001;130(1):109-14.

De Lima MN, Dias CP, Torres JP, Dornelles A, Garcias VA, Scalco FS, et al. **Reversion of age-related recognition impairment by iron chelation in rats.** Neurobiol Aging. 2008;29(7):1052-9.

de Lima MN, Presti-Torres J, Caldana F, Grazziotin MM, Scalco FS, Guimarães MR, et al. **Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats.** Eur J Pharmacol. 2007; 570(1-3): 111-114.

de Lima MN, Polydoro M, Laranja DC, Bonatto F, Bromberg E, Moreira JC, et al. **Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration.** Eur J Neurosci. 2005a;21(9):2521-8.

de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Grazziotin MM, Garcia VA, Dal-Pizzol F, et al. **Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment.** Exp Neurol. 2005b;196(1):177-83.

de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schröder N. **Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl.** Exp Gerontol. 2005c;40(6):506-11.

De-Mello N, Souza-Junior IQ, Carobrez AP. **Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats.** Behav Brain Res. 2005;158(2):263-8.

Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE, et al. **Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia.** Brain. 1991;114:1953-75.

Dimitrova DS, Getova-Spassova DP. **Effects of galantamine and donepezil on active and passive avoidance tests in rats with induced hypoxia.** J Pharmacol Sci. 2006;101(3):199-204.

Dringen R, Bishop G, Koeppe M, Dang T, Robinson S. **The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain.** Neurochem Res. 2007;32:1884-1890.

Dwork AJ, Lawler G, Zybert PA, Durkin M, Osman M, Wilson N, et al. **An autoradiographic study of the uptake and distribution of iron by the brain of the young rat.** Brain Res. 1990;518:31-9.

Faucheux BA, Hirsch EC, Villares J, Selimi F, Mouatt-Prigent A, Javoy-Agid F, et al. **Distribution of <sup>125</sup>I-ferrotransferrin binding sites in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's disease.** J Neurochem. 1993;60:2338-41.

Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T. **Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice.** Toxicol Appl Pharmacol. 1999;159:25-30.

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

Gerlach M, Double KL, Youdim MB, Riederer P. **Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients.** J Neural Transm Suppl. 2006;(70):133-42.

Gotti C, Zoli M, Clementi F. **Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance.** Trends Pharmacol Sci. 2006;27(9):482-91.

Gould TJ, Feiro OR. **Age-related deficits in the retention of memories for cued fear conditioning are reversed by galantamine treatment.** Behav Brain Res. 2005;165(2):160-71.

Hagan JJ, Cansen JH, Broekkamp CL. **Hemicholinium-3 impairs spatial learning and he deficits is reversed by cholinomimetics.** Psychopharmacology. 1989;98(3):347-56.

Halbach OB, Schober A, Krieglstein K. **Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease.** Prog Neurobiol. 2004;73:151-77.

Harvey AL. **The pharmacology of galanthamine and its analogues.** Pharmacol Ther. 1995;68(1):113-28.

Hasselmo ME. **The role of acetylcholine in learning and memory.** 2006;16(6):710-5.

Hernandez CM, Gearhart DA, Parikh V, Hohnadel EJ, Davis LW, et al. **Comparison of galantamine and donepezil for effects on nerve growth factor, cholinergic markers, and memory performance in aged rats.** J Pharmacol Exp Ther. 2006;316(2):679-94.

Huang X, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI, Rogers JT. **Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's pathology.** Ann N Y Acad Sci. 2004;1012:153-63.

Iyo M, Namba H, Fukushi K, Shinotoh H, Nagatsuka S, Sahara T, et al. **Measurement of acetylcholinesterase by positron emission tomography in the brains of healthy controls and patients with Alzheimer's disease.** Lancet. 1997;349(9068):1805-9.

Jellinger KA. **The Role of Iron Neurodegeneration the prospects for pharmacotherapy of Parkinson's Disease.** Drugs Aging. 1999;14(2):115-40.

Jellinger KA, Kienzl E, Rumpelmaier G, Paulus W, Riederer P, Stachelberger H, et al. **Iron and ferritin in substantia nigra in Parkinson's disease.** Adv Neurol. 1993;60:267-72.

Kayadjanian N, Schofield WN, Andren J, Sirinathsinghji DJ, Besson MJ. **Cortical and nigral deafferentation and striatal cholinergic markers in the rat dorsal striatum: different effects on the expression of the mRNAs encoding choline acetyltransferase and muscarinic m1 and m4 receptors.** Eur J Neurosci. 1999;11(10):3659-68.

Kaur D, Andersen J. **Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease?** Ageing Res Rev. 2004;3(3):327-43.

Kosta P, Argyropoulou MI, Markoula S, Konitsiotis S. **MRI evaluation of the basal ganglia size and iron content in patients with Parkinson's disease.** J Neurol. 2006;253(1):26-32.

Li Z, Wu CF, Pei G, Xu NJ. **Reversal of morphine-induced memory impairment in mice by withdrawal in Morris water maze: possible involvement of cholinergic system.** *Pharmacol Biochem Behav.* 2001;68(3):507-13.

Liu G, Huang W, Moir RD, Vanderburg CR, Lai B, Peng Z, et al. **Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis.** *J Struct Biol.* 2006;155(1):45-51.

Lönnerdal B. **Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy.** *Physiol Rev.* 1997;77:643-9.

Lynch T, Cherny R, Bush AI. **Oxidative processes in Alzheimer's disease: the role of Abeta-metal interactions.** *Exp Gerontol.* 2000;35:445-51.

Madsen E, Gitlin JD. **Copper and Iron disorders of the brain.** *Annu Rev Neurosci.* 2007; 30: 317-37.

Markowska AL, Olton DS, Givens B. **Cholinergic manipulations in the medial septal area: age-related effects on working memory and hippocampal electrophysiology.** *J Neurosci.* 1995;15:2063-73.

Mattson MP. **Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity.** *Trends Neurosci.* 1998;21(2):53-7.

McKinney M, Jacksonville MC. **Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease.** 2005;70(8):1115-24.

Moriguchi S, Marszalec W, Zhao X, Yeh JZ, Narahashi T. **Mechanism of action of galantamine on N-methyl-D-aspartate receptors in rat cortical neurons.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310(3):933-42.

Murai T, Okuda S, Tanaka T, Ohta H. **Characteristics of object location memory in mice: behavioral and pharmacological studies.** *Physiol Behav.* 2007;90(1):116-24.

Oeppen J, Vaupel JW. **Demography. Broken limits to life expectancy.** *Science.* 2002;296(5570):1029-31.



Perry E, Walker M, Grace J, Perry R. **Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?** Trends Neurosci. 1999;22(6):273-80.

Polla AS, Polla LL, Polla BS. **Iron as the malignant spirit in successful ageing.** Ageing Res Rev. 2003;2(1):25-37.

Prediger RD, De-Mello N, Takahashi RN. **Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats.** Eur J Pharmacol. 2006;531(1-3):176-82.

Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia A, McNamara J, et al. **Neuroscience.** 2<sup>a</sup> ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Inc; 2001.

Qian ZM, Shen X. **Brain iron transport and neurodegeneration.** Trends Mol Med. 2001;7(3):103-8.

Razay G, Wilcock GK. **Galantamine in Alzheimer's disease.** Expert Rev Neurother. 2008;8(1),9-17.

Ricklefs RE, Finch CE. **Ageing: A Natural History.** New York: Scientific American Library; 1995.

Rinne JO, Kaasinen V, Jarvenpaa T, Nagren K, Roivainen A, Yu M, et al.,. **Brain acetylcholinesterase activity in mild cognitive impairment and early alzheimer's disease.** 2003. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003;74(1):113-5.

Roloff EVL, Harbaran D, Micheau J, Platt B, Riedel G. **Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats.** 2007;146(3):875-89.

Rossini P, Rossi S, Babiloni C, Polich J. **Clinical neurophysiology of aging brain: from normal aging to neurodegeneration.** Prog Neurobiol. 2007;83(6):375-400.

Rouault TA. **Systemic Iron Metabolism: A Review and Implications for brain iron metabolism.** Pediatr Neurol. 2001;25(2):130-7.

Rouault TA, Cooperman S. **Brain iron metabolism.** Semin Pediatr Neurol. 2006;13(3):142-8.

Schenck JF, Zimmerman EA, Li Z, Adak S, Saha A, Tandon R, et al. **High-field magnetic resonance imaging of brain iron in Alzheimer disease.** Top Magn Reson Imaging. 2006;17(1):41-50.

Schliebs R, Arendt T. **The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease.** J Neural Transm. 2006; 113(11):1625-44.

Schröder N, Fredriksson A, Vianna MR, Roesler R, Izquierdo I, Archer T. **Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration.** Behav Brain Res. 2001;124(1):77-85.

Schröder N, O'Dell SJ, Marshall JF. **Neurotoxic Methamphetamine Regimen Severely Impairs Recognition Memory in Rats.** Synapse. 2003;49(2):89-96.

Schroeder JP, Packard MG. **Facilitation of memory for extinction of drug-induced conditioned reward: role of amygdala and acetylcholine.** Learn Mem. 2004;11(5):641-7

Sengstock GJ, Olanow CW, Menzies RA, Dunn AJ, Arendash GW. **Infusion of iron into the rat substantia nigra: nigral pathology and dose-dependent loss of striatal dopaminergic markers.** J Neurosci Res. 1993;35(1):67-82.

Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T. **Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus.** J Neurosci. 2005;25(48):11194-200.

Smith R, Chung H, Rundquist S, Maat-Schieman ML, Colgan L, Englund E, et al. **Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease.** Hum Mol Genet. 2006;15(21):3119-31.

Soreq H, Seidman S. **Acetylcholinesterase – new roles for an old actor.** Net Rev Neurosci. 2001 2(4): 294-302. Erratum in: Nat Rev Neurosci 2001 2(9): 670.

Srikumar BN, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS. **The involvement of cholinergic and noradrenergic systems in behavioral recovery following oxotremorine treatment to chronically stressed rats.** Neuroscience. 2006;143(3):679-88.

Sweeney JE, Bachman ES, Coyle JT. **Effects of different doses of galanthamine, a long-acting acetylcholinesterase inhibitor, on memory in mice.** Psychopharmacology (Berl). 1990;102(2):191-200.

Taylor EM, Crowe A, Morgan EH. **Transferrin and iron uptake by the brain: effects of altered iron status.** J Neurochem. 1991;57:1584-92.

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

Terry AV Jr, Buccafusco JJ. **The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development.** J Pharmacol Exp Ther. 2003 306(3); 821-7.

Thomas M, Jankovic J. **Neurodegenerative disease and iron storage in the brain.** Curr Opin Neurol. 2004;17(4):437-42

Thompson K, Menzies S, Muckenthaler M, Torti FM, Wood T, Torti SV, et al. **Mouse brains deficient in H-ferritin have normal iron concentration but a protein profile of iron deficiency and increased evidence of oxidative stress.** J Neurosci Res. 2003;71(1):46-63.

Wang D, Noda Y, Zhou Y, Mouri A, Mizoguchi H, Nitta A, et al. **The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid25-35 i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems.** Neuropsychopharmacology. 2007;32(6):1261-71.

Whitnall M, Richardson DR. **Iron: New Target for Pharmacological Intervention in Neurodegenerative Diseases.** Semin Pediatr Neurol. 2006;13(3):186-97.

Villarroya M, García AG, Marco-Contelles J, López MG. **An update on the pharmacology of galantamine.** Expert Opin Investig Drugs. 2007;16(12):1987-98.

Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. **Iron, Brain Ageing and Neurodegenerative disorders.** Nat Rev Neurosci. 2004;5(11):863-73.

**ANEXO - Comprovante de submissão a *Neuroscience***

**De:** "Neuroscience, Editorial" neuroscience@journal-office.com  
**Para:** nadjja\_s@terra.com.br  
**Cópia:**  
**Data:** 30 Jan 2009 20:30:09 +0000  
**Assunto:** Submission Confirmation

INVOLVEMENT OF CHOLINERGIC SYSTEM IN COGNITIVE DYSFUNCTION INDUCED BY IRON LOADING

Corresponding Author: Dr. Nadja Schroder

Dear Dr. Schroder,

Your submission entitled "INVOLVEMENT OF CHOLINERGIC SYSTEM IN COGNITIVE DYSFUNCTION INDUCED BY IRON LOADING" has been received for consideration in Neuroscience.

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

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

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

Kind regards,

Ole Petter Ottersen, Chief Editor  
Stephen G. Lisberger, Associate Editor  
Neuroscience

Neuroscience, Editorial Office  
Elsevier  
525 B Street, Suite 1900  
San Diego, CA 92101-4495  
USA  
FAX: 619-699-6855  
E-mail: neuroscience@journal-office.com