

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

VANISE HALLAS UBERTI

**EFEITO DA INDUÇÃO AUTOFÁGICA EM UM MODELO ANIMAL DE
DISFUNÇÃO COGNITIVA INDUZIDA PELA SOBRECARGA DE FERRO NO
PERÍODO NEONATAL**

Porto Alegre

2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

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

VANISE HALLAS UBERTI

**Efeito Da indução Autofágica Em Um Modelo Animal De
Disfunção Cognitiva Induzida Pela Sobrecarga De Ferro No
Período Neonatal**

Prof^a. Dr^a. Elke Bromberg
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Nadja Schröder
Co-orientadora

Porto Alegre
2019

VANISE HALLAS UBERTI

Efeito da indução autofágica em um Modelo Animal de Disfunção Cognitiva induzida pela sobrecarga de ferro no período neonatal

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau 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.

Prof^a. Dr^a. Elke Bromberg
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Nadja Schröder
Co-orientadora

Porto Alegre
2019

Ficha Catalográfica

U14e Uberti, Vanise Hallas

Efeito da indução autofágica em um modelo animal de disfunção cognitiva induzida pela sobrecarga de ferro no período neonatal / Vanise Hallas Uberti . – 2019.

100 p.

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

Orientadora: Profa. Dra. Elke Bromberg.

Co-orientadora: Profa. Dra. Nadja Schröder.

1. Neurodegeneração. 2. Sobrecarga de ferro. 3. Autofagia. 4. Rapamicina. 5. Déficit cognitivos. I. Bromberg, Elke. II. Schröder, Nadja. III. Título.

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

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos pela minha família, que sempre me incentivou e esteve ao meu lado em minhas escolhas. Obrigada aos meus pais, Jorge e Lisiane, pelo amor incondicional e pelo esforço para que esse momento fosse possível.

Um agradecimento especial à minha irmã, Nelise, a quem não há palavras suficientes para agradecer tamanha generosidade e compreensão. Obrigada pelo apoio e companheirismo nessa trajetória.

A minha orientadora, não somente por ter me dado a oportunidade de desenvolver meu trabalho, mas também pelo ser humano ímpar que me concedeu todo auxílio, paciência e interesse durante esse período.

Aos colegas de laboratório por toda ajuda e aprendizado nos experimentos, sem os quais tudo teria sido muito mais difícil.

Aos meus amigos, que procuraram estar ao meu lado e lembrar-me de manter a leveza e o bom humor.

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

Ninguém chega a lugar algum sozinho, vocês todos foram fundamentais. Muito obrigada.

RESUMO

No trabalho desenvolvido na presente dissertação buscou-se determinar se a rapamicina, uma indutora autofágica que age através da inibição da via mTOR, exerce atividade neuroprotetora no modelo de disfunção cognitiva induzida pela sobrecarga neonatal de ferro, sendo capaz de melhorar a memória. Há estudos demonstrando que a rapamicina é capaz de amenizar o acúmulo de agregados proteicos tóxicos observados nas doenças neurodegenerativas, diminuir a morte celular e os sintomas cognitivos relacionados a essas desordens. A autofagia é um evento de autodigestão celular e remoção de componentes em condições fisiológicas e também patológicas. No contexto da neurodegeneração, é importante para a célula um alto e refinado controle da regulação autofágica, para que a remoção de depósitos protéicos possa ser efetuada corretamente. Ainda, já está bem elucidado que a sobrecarga de ferro neonatal está relacionada a diversos déficits cognitivos, e que o depósito desse metal ocorre seletiva e progressivamente com a idade, podendo representar um importante fator de risco para o desenvolvimento da neurodegeneração em seres humanos. Ratos machos receberam veículo ou ferro carbonila (30mg/kg) do 12º ao 14º dia pós-natal. Na idade adulta, foram tratados com veículo ou Rapamicina na dose de 0,25 mg/kg durante 14 dias e testados na tarefa de memória de esQUIVA inibitória. Os resultados indicaram que a rapamicina conseguiu reverter os déficits cognitivos de ratos *Wistar* tratados com sobrecarga de ferro no período neonatal. Após a realização da tarefa comportamental os animais foram eutanasiados e os níveis de proteínas criticamente envolvidas na via da autofagia foram quantificados através de Western blotting no hipocampo. A quantificação das proteínas foi realizada através da medida das densidades das bandas individuais, normalizadas pela densidade de β -actina. Os resultados da análise protéica indicaram que o tratamento com ferro no período neonatal induziu redução dos níveis de Beclina 1 e LC3 no hipocampo. O tratamento crônico com rapamicina restaurou a expressão proteica de LC3 no hipocampo. Os resultados sugerem que a sobrecarga de ferro prejudica o processo autofágico. A reversão dos efeitos cognitivos e moleculares pela rapamicina indica o seu potencial efeito neuroprotetor.

Palavras-chave: Neurodegeneração; Sobrecarga de ferro; Autofagia; Rapamicina; Déficits cognitivos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine whether rapamycin, an autophagic inducer acting through the inhibition of the mTOR pathway, exerts neuroprotective activity in the cognitive dysfunction model induced by neonatal iron overload, and is able to improve memory. There are studies demonstrating that rapamycin is able to ameliorate the accumulation of toxic protein aggregates observed in neurodegenerative diseases, decrease cell death and cognitive symptoms related to these disorders. Autophagy is an event of cellular autodigestion and removal of components under physiological and pathological conditions. In the context of neurodegeneration, it is important for cell a high and refined control of autophagic regulation, so that the removal of protein deposits can be performed correctly. Moreover, it is already well understood that neonatal iron overload is related to several cognitive deficits, and the deposition of this metal occurs selectively and progressively with age, and may represent an important risk factor for the development of neurodegeneration in humans. Male Wistar rats received a single daily oral dose of vehicle or iron carbonyl (30 mg/kg) at postnatal days 12–14. At the age of 4 months, they received daily intraperitoneal injections of vehicle or rapamycin (0.25 mg/kg) for 14 days. The results showed that iron given in the neonatal period impaired inhibitory avoidance memory and induced a decrease in proteins critically involved in the autophagy pathway, Beclin 1 and LC3, in the hippocampus. Rapamycin in the adulthood reversed iron-induced memory deficits and recovered LC3 levels in iron treated rats. Our results suggest that iron accumulation, as observed in neurodegenerative disorders hinders autophagy, which might play a role in iron-induced neurotoxicity. Rapamycin, by inducing authophagy, was able to ameliorate iron-induced cognitive impairments. These findings support the use of rapamycin as a potential neuroprotective treatment of cognitive decline associated to neurodegenerative disorders.

Key words: Iron; autophagy; rapamycin; cognitive deficits; neurodegenerative disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
LC3 – Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
DNA – Ácido desoxirribonucléico
OMS – Organização Mundial da Saúde
DA – Doença de Alzheimer
APP - Proteína precursora amiloide
Fe – Ferro
SNC - Sistema Nervoso Central
NBIA - Neurodegeneração com acúmulo de ferro cerebral
Tf – Transferrina
TfR - Receptor de transferrina
HFE - Proteína da hemocromatose
IRP - Proteínas reguladoras do Ferro
SN - Substância negra
CSF - Líquido cefalorraquidiano
BHE – Barreira Hematoencefálica
DFO - Deferroxamina
ATG - Genes relacionados à autofagia
ER - Retículo endoplasmático
ULK - do inglês, *Ubiquitin like Kinase*
BCN1 – Beclina 1
AMP - Adenosina monofosfato
AMBRA1 - do inglês, *Autophagy And Beclin 1 Regulator*
mLST8 - do inglês, *Mammalian lethal with SEC13 protein 8*
PRAS40 – do inglês, *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*
DEPTOR - do inglês, *DEP-domain containing mTOR-interacting protein*
FDA - do inglês, *Food and Drug Administration*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização geral do processo autofágico e subtipos de autofagia em mamíferos.....	23
Figura 2 – Maquinaria molecular central da autofagia.....	27

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.1.1 Neurodegeneração.....	11
1.1.2 O ferro e as doenças neurodegenerativas	13
1.1. 2.1 Ferro no período neonatal e déficits cognitivos	17
1.1.3 Autofagia	19
1.1.3.1 Maquinaria e mecanismo autofágico	21
1.1.3.2 Progressão morfológica e maquinaria molecular da macroautofagia.....	23
1.1.3.3 mTOR e a via de sinalização da autofagia	27
1.1.4 Autofagia e neurodegeneração	29
1.1.5 O ferro e a autofagia.....	33
1.1.6 Rapamicina	35
1.2 OBJETIVOS	37
1.2.1 <i>Objetivo Geral</i>	37
1.2.2 Objetivos Específicos	37
CAPÍTULO 2	39
2.1 ARTIGO CIENTÍFICO	40
CAPÍTULO 3	Erro! Indicador não definido.
3.1 CONCLUSÕES	80
3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA.....	96
ANEXO 2 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	98

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Neurodegeneração

O envelhecimento é um processo complexo e multifatorial, que conta com uma série de modificações biológicas, as quais reduzem a capacidade fisiológica e funcional (Ahmed et al., 2001; Tosato et al., 2007). Esse evento é demarcado pela interação de diversas alterações metabólicas, como o acúmulo de danos no DNA que causam instabilidade genômica (Garinis et al., 2008), processos de senescência celular (Sedelnikova et al., 2004) e encurtamento telomérico (Ahmed et al., 2001). Há também uma menor capacidade do organismo de manter a homeostase em condições de estresse (Kristein et al., 2015), alterações na sinalização celular, diminuição na capacidade de remoção de proteínas danificadas, disfunção mitocondrial (Hagen et al., 1997, Alexeyev et al., 2004) e progressivo aumento do estresse oxidativo, além de modificações epigenéticas (Fraga e Esteller, 2007).

Sabe-se que a complexidade dessas alterações é influenciada por determinações genéticas, nutrição, estilo de vida e ambiente (Busse, 1987). A desregulação desses eventos contribui para que a idade seja considerada um importante fator de risco para diversas doenças, como disfunções cardiovasculares, doenças neoplásicas e desordens neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer e Doença de Huntington (Nussbaum, 2003; Bates, 2003; Ross, 2004).

Segundo dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS), a população global de idosos com mais de 60 anos, que em 2014 era de 841 milhões vai passar para 2 bilhões até 2050. Concomitante com o aumento dessa população há também, a maior incidência de desordens neurodegenerativas. Portanto, torna-se evidente a iminente necessidade de atenção que as doenças neurodegenerativas ensejam, no contexto da manutenção da qualidade de vida destes indivíduos.

As doenças neurodegenerativas são marcadas pela sintomatologia clínica progressiva e início insidioso, aliado a isso há o prognóstico tardio e a perda neuronal gradual (Mrak et al.,1997). A Doença de Alzheimer é a forma mais comum de doença neurodegenerativa com demência relacionada à idade (Selkoe, 2002), e foi descrita pela primeira vez em 1907, pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer, durante uma reunião da Sociedade dos Psiquiatras do Sudoeste Alemão em Tübingen. Alois Alzheimer examinou o cérebro de uma mulher que apresentava sintomas como delírios paranoides, afetação da memória e subsequente afasia progressiva e verificou as características histopatológicas que atualmente já estão bem associadas à Doença de Alzheimer: perda massiva de neurônios e presença de placas de amilóide e emaranhados neurofibrilares (Cipriani et al., 2011).

A Doença de Alzheimer tem como principais sintomas clínicos o declínio cognitivo e a perda de memória (Sun et al., 2012). Outros sintomas comuns incluem uma perda representativa de memória, diminuição expressiva na capacidade de resolver problemas, dificuldade em completar tarefas diárias e mudanças no humor, comportamento e personalidade, além de problemas na expressão e desorientação (Sun et al., 2012; *Alzheimer's Association* 2010).

A Doença de Alzheimer é caracterizada por uma série de alterações neuropatológicas. A neurotoxicidade observada nessa enfermidade é associada principalmente à formação de placas senis com depósitos do peptídeo beta amilóide (Forstl et al., 1995; Taylor et al., 2002; Ross et al., 2004;) aos emaranhados neurofibrilares de formas altamente fosforiladas da proteína Tau (Anderton et al., 2001), perda neuronal e acúmulo de formas oligoméricas solúveis da proteína precursora amiloide (APP) (Selkoe, 2002) em regiões do cérebro cruciais para a memória, neuroinflamação (McGreer, 2007) e disfunção mitocondrial (Bachurin et al., 2003). A expressão de proteínas danificadas ou agregados irregulares representa um grande fator de risco nas doenças ligadas à idade (Hartl et al. 2011). Todas essas características patológicas perfazem uma

rede interativa e colaboram para a morte neuronal e o estresse oxidativo, sendo que este último já está extensivamente datado como característica primordial das disfunções do envelhecimento (Harmann, 1956-1972; Moreira et al., 2007).

A gravidade da desordem também se refere ao tratamento, visto que não há tratamentos efetivos, pois estes são sintomáticos e não impedem a progressão da doença e o declínio cognitivo (Kumar et al., 2015). Apesar de expressivos estudos terem sido feitos durante as últimas décadas, e diversos progressos efetuados, os tratamentos clínicos ainda perfazem apenas relativo alívio dos sintomas cognitivos (Chu, 2012).

Os crescentes avanços em técnicas de neuroimagem através de marcadores biológicos despertam grande interesse para o diagnóstico precoce antes da manifestação sintomatológica da doença. Também tem se efetuado uma série de estudos a respeito das cascatas de eventos neuroquímicos progressivos da desordem, bem como o conhecimento sobre a biologia molecular das placas e dos emaranhados neurofibrilares tem possibilitado importantes contribuições para intervenções terapêuticas (Sperling, 2007; Chu, 2012).

1.1.2 O ferro e as doenças neurodegenerativas

O ferro é o metal mais abundante do corpo humano e é requerido na maioria dos sistemas biológicos (Valko et al., 2005; Jomova et al., 2010), sendo essencial a diversos processos no crescimento e sobrevivência da maioria dos organismos. Como alguns exemplos dessas funções há o seu envolvimento nos mecanismos de replicação de DNA, fosforilação oxidativa, síntese de mielina, cofator de enzimas como citocromo c, e proteínas de transporte de oxigênio, como hemoglobina e mioglobina (Schröder, 2013; Krishan, 2015, Uttara, 2009). A relação do ferro com funções biológicas decorre de seu potencial REDOX, ao alterar suas formas de cátion divalente, ou ferroso (Fe^{2+}) para o cátion trivalente,

ou férrico (Fe^{3+}), tendo assim, a capacidade de aceitar ou doar elétrons (Phippen et al., 2008). Essa capacidade de interconversão faz com que, em excesso, o ferro possa causar estresse oxidativo ao catalisar a formação de radicais hidroxila, através da reação de Fenton, que são extremamente tóxicos para lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (Gaasch et al., 2007; Schröder et al., 2013). Portanto, apesar de extremamente requisitado para as reações de oxidação-redução, em um ambiente rico em oxigênio, o ferro pode ser essencialmente prejudicial.

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo diversos estudos com esse metal, visto que o cérebro é o segundo local onde o armazenamento de ferro tem sua maior distribuição, sendo o fígado o principal órgão de armazenamento e de homeostase do ferro (Connor et al., 1995; Schröder et al., 2013; Milic et al., 2015), e também devido à sua essencialidade a diversos processos no sistema nervoso central (Zheng e Monnot, 2012). Além disso, os neurônios dependem diretamente do ferro, sendo cofator para muitas enzimas envolvidas com o metabolismo energético cerebral e a síntese de neurotransmissores, como a tirosina hidroxilase, requerida para síntese de dopamina (Moos, 2004; Zecca et al., 2004).

O Sistema Nervoso Central é altamente vulnerável ao dano causado pelos radicais livres, os quais tem a capacidade de acelerar a morte celular ao danificar proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Isso se deve a alta demanda de oxigênio e ferro para o correto funcionamento cerebral, e às poucas defesas antioxidantes endógenas. Sobretudo, com o avanço da idade, as defesas antioxidantes se encontram diminuídas (Chen et al., 2012), sendo um grande desafio para o cérebro utilizar a quantidade adequada de ferro e em contrapartida impedir a toxicidade associada ao metal.

O metabolismo desregulado do ferro e a geração de espécies reativas de oxigênio já estão bem estabelecidos como fatores chave nas doenças neurodegenerativas, conhecidas como neurodegeneração com acúmulo de ferro

cerebral, ou NBIA (Batista-Nascimento, 2012). Portanto, é imprescindível que os níveis de ferro na célula sejam altamente balanceados (Stohs e Bagchi, 1995).

A homeostase do ferro é regulada rigorosamente em diversos níveis, por meio da absorção, armazenamento e reciclagem (Milic, 2016). Na absorção do trato gastrointestinal, envolve uma extensa série de interações entre proteínas que incluem a Transferrina (Tf), a principal proteína de transporte de ferro, o qual é mediado pelo receptor de transferrina (TfR), o produto do gene da hemocromatose (HFE), e proteínas regulatórias do ferro (IRPs), responsáveis pelo controle pós transcricional de Tf e TfR, ao modificar suas quantidades de acordo com a necessidade da célula (Batista-Nascimento, 2012). Esse conjunto de mecanismos determina a quantidade de ferro que estará disponível para atravessar o enterócito e entrar na corrente sanguínea (Zecca, 2004; Sharp e Srai, 2007).

A nível cerebral, sob condições fisiológicas normais, o cérebro regula sensivelmente o balanço de ferro através de três sistemas orquestrados: 1) o influxo de ferro para o cérebro via transporte mediado por TfR; 2) o armazenamento e sequestro de ferro, que é altamente dependente da ferritina disponível, e 3) o efluxo de ferro cujas taxas são controladas pelo fluxo do líquido cefalorraquidiano (CSF) para a circulação sanguínea (Zheng 2012; Zecca et al., 2004).

Diversos estudos também têm demonstrado que o ferro se acumula progressiva e seletivamente no cérebro com a idade. O depósito de ferro foi observado em cérebros de pacientes sofrendo de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e Huntington, de forma drasticamente maior que em indivíduos controle saudáveis, tanto em estudos *post mortem* quanto *in vivo* utilizando técnicas de ressonância magnética (Sofic et al., 1988; Dexter et al., 1989; Bartzokis et al., 1997; 1999).

Os mecanismos pelos quais se origina esse acúmulo nas patologias permanecem pouco elucidados. Também não está esclarecido se o acúmulo de ferro é um evento primário, ou seja, se é o processo inicial que desencadeia a morte neuronal nestas doenças ou se ele é uma consequência do progresso da doença. Há na literatura 3 principais explicações para o aumento dos depósitos de ferro cerebral. Sendo 1) hemorragia, 2) influxo de macrófagos contendo ferro na corrente sanguínea ou 3) desregulação do transporte de ferro através da Barreira Hemato-encefálica (BHE) (Dusek et al., 2015; Zecca, 2004). Koeppe et al., (2008) demonstraram que a hemorragia cerebral pode fornecer grande quantidade de ferro através do grupo prostético heme degradado. Células fagocíticas contendo ferro estão frequentemente presentes em áreas cerebrais afetadas por desordens neurodegenerativas (Lopes et al., 2008). Além disso, células fagocíticas contendo ferro podem ser uma fonte de depósito de ferro isoladamente, ao migrar ao sistema nervoso central como parte da resposta inflamatória (Andersen et al., 2014).

Além das evidências de que o ferro está diretamente relacionado ao estresse oxidativo no cérebro (Zecca, 2004), também se sabe que está ligado diretamente ao acúmulo de placas beta amiloide e formação de placas senis, contribuindo com a neurotoxicidade e patologia da doença de Alzheimer (Mantyh et al., 1993; Connor et al., 1992). Como demonstrado, os peptídeos de beta amiloide foram capazes de produzir diretamente peróxido de hidrogênio pela redução do ferro, sugerindo seu papel primário na geração de estresse oxidativo (Huang, 1999).

Na Doença de Parkinson também há diversas evidências indicando que o depósito de ferro na substância *nigra* exerce um papel essencial na severidade da doença (Berg, 1999). Estudos *post mortem* (Sofic, 1988) e técnicas de ressonância magnética (Wallis, 2008) demonstram o acúmulo seletivo de ferro tanto na substância nigra quanto em outras regiões dos gânglios da base. Estudos realizados *in vitro* demonstraram que a expressão de alfa-sinucleína é modificada pela deposição de ferro, a qual consequentemente resulta na

agregação e toxicidade associada ao acúmulo de proteína (Febbraro, 2012; Ostrerova-Golts, 2000).

1.1. 2.1 Ferro no período neonatal e déficits cognitivos

Há evidências de que o excessivo depósito de ferro em regiões específicas do cérebro pode gerar radicais livres e causar alterações no metabolismo do ferro, colaborando para a etiologia das doenças neurodegenerativas (Zecca et al., 2004; Sengstock et al., 1993). O período neonatal é crítico para o estabelecimento do conteúdo normal de ferro e sua distribuição no cérebro adulto (Connor, 1995; Dal-Pizzol et al., 2001; Schröder et al., 2013).

O estudo de dal-Pizzol (2001) demonstrou que a suplementação com ferro no período neonatal pode induzir o estresse oxidativo na substância nigra em cérebro adulto, a qual é uma das principais regiões afetadas na doença de Parkinson. Além disso, há também um impacto na formação da memória e déficits cognitivos (Schröder et al., 2001; de Lima et al., 2005). Além de aumentar marcadores de estresse oxidativo, a sobrecarga de ferro no período neonatal aumenta a ocorrência de processos apoptóticos (da Silva et al., 2014; 2018).

Os efeitos do ferro durante o período neonatal sobre parâmetros cognitivos estão bem elucidados. O estudo de Schröder et al., (2001) mostrou que ratos que receberam ferro durante determinado período do desenvolvimento cerebral, tiveram déficits de memória espacial e prejuízo na tarefa de esquiva inibitória, um tipo de condicionamento aversivo. Além disso, outro estudo (De Lima et al., 2005) demonstrou que o tratamento com ferro neonatal prejudica a memória de reconhecimento de longa duração em ratos adultos e aumenta o estresse oxidativo em regiões cerebrais relacionadas à formação de memória.

Outra evidência é a distribuição regional do ferro neonatal, que induziu um aumento seletivo nos níveis do metal na *nigra* e nos gânglios da base em ratos

(Schröder et al., 2001). Estudos indicam que a absorção de ferro é máxima durante o período pós-natal, com um pico no décimo quinto dia pós-parto, e uma vez absorvido pelo cérebro durante o período de desenvolvimento, o ferro fica retido no cérebro não podendo mais retornar ao plasma (Dwork et al., 1990; Taylor and Morgan, 1990, Schröder et al., 2001). Além disso, referente à memória, estudos com ratos idosos demonstraram que animais que receberam ferro no período neonatal apresentaram um prejuízo significativo na retenção da memória de longa e curta duração (De Lima et al., 2007; Rech et al., 2010).

Reforçando a relação do ferro com o prejuízo de memória, a administração de quelantes de ferro demonstrou-se eficaz como potencial estratégia ao atenuar os déficits cognitivos em diversos modelos animais de disfunção cognitiva. Estudos utilizando Deferroxamina (DFO), um quelante de ferro, em ratos idosos normais, viu-se que foi capaz de reverter déficits cognitivos, ao melhorar a memória de reconhecimento e diminuir o dano oxidativo (De Lima et al., 2008). Ainda, o tratamento com Deferroxamina melhorou a memória de curta duração e também diminuiu o dano oxidativo em áreas cerebrais específicas que estão envolvidas na formação da memória, como o córtex e o hipocampo. Jiang et al., (2006) também demonstraram atividades neuroprotetoras do quelante Deferroxamina quando a concentração de ferro na substância nigra estava aumentada.

O ferro também está envolvido com a dinâmica mitocondrial e parâmetros apoptóticos. O tratamento com ferro no período neonatal reduziu os níveis de proteínas de fissão mitocondrial no hipocampo e no córtex de ratos, além de induzir significativamente os níveis da proteína caspase 3 (ativada no evento apoptótico), tanto hipocampal quanto cortical (Da Silva et al., 2014). Ainda, também se verificou em outro estudo um aumento dos níveis da proteína PAR-que é um marcador apoptótico (Miwa et al., 2011). Conclui-se, portanto, que a regulação do ferro é essencial no contexto de prejuízos cognitivos relacionados à neurodegeneração (da Silva et al., 2013; Fagherazzi et al., 2012). Portanto, em conjunto, esses dados sugerem que o ferro está envolvido em eventos

progressivos do processo de envelhecimento, sob diversas perspectivas, e sua modulação é essencial no contexto da neurodegeneração e prejuízos funcionais.

1.1.3 Autofagia

Há duas formas principais pelas quais é possível às células eucarióticas realizar a degradação de proteínas e organelas: através da via proteolítica dependente do sistema ubiquitina proteossoma e através da autofagia (Ravikumar et al., 2003). A autofagia é um mecanismo que foi descrito pela primeira vez por Christian de Duve em 1967. Nesse estudo, foi induzida a autofagia através do hormônio pancreático glucagon em fígados de ratos, e observou-se a degradação de mitocôndrias e de outras estruturas intracelulares dentro dos lisossomos desse órgão. No entanto, recentemente esse processo foi redescoberto, sendo sugerido em diversos estudos com um processo altamente benéfico para o correto funcionamento fisiológico, bem como tem sido demonstrada sua importância na regulação do crescimento, desenvolvimento e envelhecimento de mamíferos. (Wang et al., 2019).

O termo cunhado significa literalmente “autodigestão”, fazendo referência ao seu mecanismo de atuação, ao englobar partículas e fragmentos da própria estrutura celular, dessa forma reciclando partes ou removendo totalmente o material a ser degradado. Portanto, a autofagia pode ser definida, de modo geral, como um processo catabólico de degradação e reciclagem, responsável pela remoção e digestão de conteúdos celulares, organelas e proteínas malformadas ou danificadas (Cheung, 2011).

Esse mecanismo é dependente da maquinaria lisossômica, e possui um alto nível de conservação entre os eucariotos, o que é facilmente explicável, visto que sua função é primordial para proteger e adaptar o organismo em uma situação estressora, até que a célula consiga retornar ao seu estado de

homeostase. Além disso, a autofagia basal é extremamente necessária enquanto via de limpeza sob condições normais de fornecimento de nutrientes, e não apenas em condições patológicas. Sobretudo, para proteger as células de efeitos tóxicos de proteínas disfuncionais que não podem ser removidas via divisão celular (Mizushima et al., 2008).

Inicialmente e por um longo tempo, os estudos a respeito desse processo se concentraram em um tipo específico de estresse, denominado “privação de nutrientes”, um mecanismo bastante útil para proteção celular ao fornecer energia pela degradação de macromoléculas em moléculas menores, e assim, facilitar o engolfamento (Tsukada 1993; Shen e Mizushima, 2014). Atualmente, entretanto, estudos tem relacionado essa via a variadas condições patológicas, como cânceres e doenças neurodegenerativas (Klionsky, 2007; Mizushima et al., 2008). Sabe-se que esse processo está presente em diversas e heterogêneas situações biológicas, sendo primordial no contexto neoplásico, na supressão tumoral (Gozuacik et al., 2004), no envelhecimento (Rubinsztein et al., 2011), na estabilidade genômica (Netea-Maier et al., 2015) e em diferentes formas de estresse, como o estresse oxidativo, hipóxia e estresse osmótico (Nowikovsky et al., 2009).

A autofagia também é a via mais utilizada para a degradação de organelas intracelulares danificadas e proteínas agregadas ou malformadas (Mizushima et al., 2008). Visto que a presença de agregados proteicos é uma característica comum e está presente na maioria das doenças neurodegenerativas, incluindo Alzheimer (placas de beta amiloide e Tau), Parkinson (alfa sinucleína) e Huntington (huntingtina) (Frake et al., 2015), é esperado que a autofagia exerça função crucial na remoção desses agregados tóxicos, ao diminuir os efeitos prejudiciais e proteger a célula (Zheung, 2011, Menzies et al., 2017).

Além disso, a autofagia é capaz de proteger contra doenças infecciosas e promover imunidade, sendo a principal forma de imunidade inata contra invasores exógenos (Deretic et al., 2013). Tanto em doenças infecciosas quanto nas

inflamações observadas nas desordens neurodegenerativas verificou-se que a estimulação da autofagia teve efeitos protetores em ensaios pré-clínicos (Rubinsztein et al., 2015). Há estudos com diversos modelos animais demonstrando que ao modular a autofagia pela via dependente da mTOR (*mammalian target of rapamycin*) há um aumento da depuração de proteínas tóxicas (Menzier et al., 2017). Ainda, a inibição da autofagia foi capaz de aumentar a toxicidade dessas proteínas e levar a um considerável aumento nos agregados (Frake et al., 2015). Essa modulação tem sido feita nos estudos com o fármaco rapamicina, e representa uma estratégia promissora em doenças com acúmulo de proteínas (Menzies et al., 2017; Spilman et al., 2010; Frake et al., 2015).

1.1.3.1 Maquinaria e mecanismo autofágico

Recentemente, a maquinaria autofágica foi “redescoberta” no que se refere a mecanismos moleculares e genes envolvidos. Estudos com *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que a família de genes relacionados à autofagia (Atg) é extensa, havendo mais de 30 diferentes genes identificados, e muitos destes estão conservados e apresentam homólogos em mamíferos (Klionsky, 2007; Nakatigawa et al., 2009; Galluzi et al., 2014).

Há três diferentes mecanismos pelos quais a autofagia pode fazer o processamento das estruturas celulares: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (Todde et al., 2009) (Figura 1). A macroautofagia é uma via conservada nos mamíferos e o processo mais recorrente nos eventos autofágicos. Consiste no transporte de substratos aos lisossomos através da formação de vesículas criadas a partir de uma membrana de isolamento, formando uma estrutura de dupla membrana denominada autofagossoma, a qual age como uma estrutura “isolante” de proteínas e organelas. Para que a degradação desses substratos ocorra, o autofagossoma sofre uma fusão com o lisossomo, formando assim um autolisossoma, no qual

posteriormente ocorrerá a quebra e reciclagem desse material pelas hidrolases lisossomais (Klionsky, 2007; Mizushima et al., 2008).

A formação do autofagossoma é altamente regulada pela montagem ordenada de uma família de proteínas denominadas ATG (AuTophagy-related) (Mehrpour et al., 2010; Mizushima et al., 2011), sendo que o complexo Beclina 1/Vps34 é o núcleo essencial para a formação do autofagossoma, podendo tanto estimular quanto suprimir o início do processo autofágico, participando de diferentes passos, incluindo a biossíntese e maturação do autofagossoma (Pickford et al., 2008).

Na microautofagia ao contrário da macroautofagia, não há a formação da estrutura intermediária do autofagossoma, consistindo em um processo de invaginação ou protusão direta da membrana lisossomal (Santabrogio e Cuervo, 2011), por meio da qual os substratos são engolfados e posteriormente degradados pelas enzimas lisossomais, podendo ser tanto seletivo quanto não seletivo. Esse processo e seus mecanismos nas patologias ainda é pouco elucidado, em parte devido à dificuldade de análise.

Já a autofagia mediada pelas chaperonas consiste em uma via altamente específica (Dice, 2007). Os substratos a serem degradados por essa via são marcadas pelo motivo contendo o pentapeptídeo KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) (Dice, 1990), o qual é reconhecido por um complexo formado com a proteína citosólica de choque térmico (HSPA8/HSC70), que faz o transporte do substrato até a membrana do lisossomo onde ocorre o seu desdobraimento e ligação a monômeros do receptor LAMP2A (proteína associada à membrana do lisossomo) (Cuervo et al., 2014).

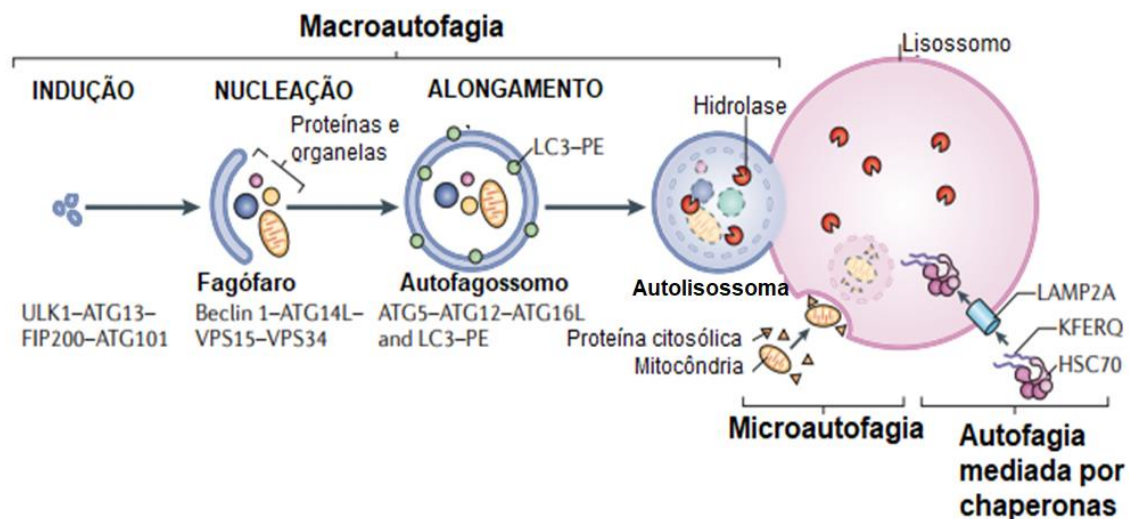


Figura 1 – Organização geral do processo autofágico e subtipos de autofagia em mamíferos. O processo de macroautofagia inicia com a captura do material citoplasmático por uma vesícula de membrana dupla chamada de fagóforo ou membrana de isolamento. A membrana da formação da vesícula pode ter origem do retículo endoplasmático (ER), Aparelho de Golgi, membrana plasmática ou mitocôndrias. Com o fechamento do fagóforo, é formado o autofagossomo, cuja membrana externa se funde com o lisossomo, formando o autolisossomo, onde o material interno será degradado. Adaptado de Kaur, 2015.

1.1.3.2 Progressão morfológica e maquinaria molecular da macroautofagia

Como mencionado anteriormente, foram caracterizadas uma série de moléculas envolvidas no processo autofágico, sobretudo após a identificação dos genes relacionados à autofagia (Atg) em *Saccharomyces cerevisiae* (Maiuri et al., 2007, Klionsky, 2007). Acredita-se que a formação do autofagossoma envolve uma cascata de sinalizações altamente orquestrada a partir da nucleação vesicular de uma membrana de isolamento (Cheung, 2011). A formação da vesícula autofágica envolve três etapas básicas: Iniciação ou formação do fagóforo, alongamento ou captura do substrato a ser degradado e maturação, finalizando com a fusão do autofagossoma com o lisossomo, seguido da

degradação proteolítica através das proteases lisossomais (Glick 2010; Ghavami 2014).

O processo autofágico envolvendo a família das proteínas Atg é regulado principalmente pela mTOR, a qual em condições fisiológicas normais regula a autofagia negativamente, ao bloquear a atividade quinase da ULK (Ubiquitin like Kinase). A etapa inicial de síntese da membrana de isolamento, também conhecido como pré autofagossoma ou fagóforo é uma característica marcante que a distingue de outros processos de nucleação, pois aqui ela acontece *de novo*, a partir de outras membranas, e não como um brotamento de uma membrana isolada (Yang e Klionsky, 2009). Alguns autores chamam essa membrana de isolamento primária de PAS, ou pré autofagossoma, que posteriormente se expande para circundar porções do citoplasma e formar o autofagossomo maduro (Xie e Klionsky, 2007).

Nos mamíferos, a origem da membrana inicial que formará o autofagossomo ainda não está bem clara, mas parece originar-se primariamente do retículo endoplasmático (Axe et al., 2008; Yla-Anttila 2009). Outras membranas também têm sido sugeridas e parecem estar envolvidas na formação da membrana do fagóforo, como a face *trans* do Complexo de Golgi, a mitocôndria, membrana plasmática, compartimentos endossomais (Axe et al., 2008, Puri *et al.*, 2013; Mizushima et al., 2007; Takahashi *et al.*, 2011), e a partir do envelope nuclear sob condições de privação ou estresse (English et al., 2009, Glick 2010).

Nessa fase inicial está envolvida o complexo de iniciação ULK1/2 (serina treonina quinase) com proteínas da família Atg, principalmente a Atg13 (Hosokawa *et al.*, 2009). A Atg 13 se liga a ULK1 e medeia a interação desse com complexo com a FIP200, levando a formação da maquinaria ULK1–Atg13–FIP200, que interagem diretamente com a mTORC1. A ULK1 pode ser ativada por AMP (AMPK), que atua como medidor dos níveis de energia intracelular, ou em processo independente de AMPK, pela mTOR (Kim, 2011). A ativação do complexo ULK é necessária para o recrutamento de outro complexo relacionado

ao início da autofagia: o complexo PI3K de classe III (enzima fosfatidilinositol-3-quinase) que inclui a Vps34 (*vesicular protein sorting 34*), Beclina-1 (BECN1) e a subunidade regulatória p150. A Vps34 interage com beclina-1 para formar os sítios de iniciação no pré autofagossoma e assim permitir o recrutamento de outras proteínas Atg (Menzies et al., 2017; Ghavani et al., 2014). A regulação do complexo PI3K acontece positivamente, através da AMBRA1 (molécula reguladora da beclina-1), que é fosforilada pela ULK e translocada ao retículo endoplasmático, onde participa da formação do autofagossoma (Nazio et al., 2013), e negativamente pela BCL2, que se liga a beclina-1 e impede sua interação desta com PI3K, inibindo a autofagia (Deegan et al., 2013).

O papel do complexo PI3k/Vps34 e sua proteína de ligação Beclina-1 na formação do pré autofagossomo está bem elucidada nos mamíferos. Vps34 usa fosfatidilinositol para gerar fosfatidilinositol trifosfato (PI3P), que é essencial para a etapa de alongamento do PAS (Xie et al., 2007). Ainda permanecem incertos os exatos mecanismos pelos quais a ULK1 regula a indução de autofagia, mas a forma ativa desse complexo parece servir como reguladora negativa da mTORC1 (Wirth et al., 2013).

A fase seguinte da maquinaria é o alongamento dessa vesícula, através de dois importantes sistemas de proteínas. O primeiro é através de proteínas Atg12 e Atg5, cujas reações de conjugação são facilitadas pela Atg7, Atg10 e Atg16 (Mizushima, Noda, et al., 1998). A Atg7 (enzima ativadora de ubiquitina E1) ativa a proteína Atg12, que é então transferida à Atg10 (enzima conjugadora de ubiquitina E2) e, posteriormente é ligada covalentemente à Atg5 (Ohsumi 2001, Mizushima et al., 2007).

Essa estrutura conjugada Atg12-Atg5 forma um grande complexo com Atg16 (Atg12-Atg5-Atg16L) que é essencial para a etapa de alongamento do fagóforo, ao especificar o local de lipidação de LC3 na membrana do autofagossoma (Fujita *et al.*, 2008). Entretanto, uma vez que o autofagossoma esteja formado, o conjugado Atg5-At12 se dissocia da membrana externa,

fazendo desse sistema um marcador relativamente pobre do processo autofágico, sendo as medidas da LC3 parâmetros mais confiáveis em função da maior persistência no evento (Kabeya *et al.*, 2000; Glick *et al.*, 2010).

O processamento ou lipidação da LC3 é o outro sistema ligado a ubiquitina envolvido na formação do autofagossoma. A LC3 (proteína de cadeia leve associada à microtúbulo) é codificada pelo homólogo mamífero do gene Atg8. Na indução da autofagia, a LC3-I está presente no citosol da célula e é clivada para gerar a isoforma LC3-II processada, que passa a se localizar em ambas as superfícies externa e interna do autofagossoma, onde exerce os papéis de auxiliar na fusão das membranas para a expansão e o fechamento do fagóforo, formando o autofagossoma, onde permanece associada ao longo de sua vida útil. Dessa forma, os níveis de LC3-II se correlacionam diretamente com o número de autofagossomas (Nakatogawa, 2007; Kabeya 2003). Já está evidente que a síntese e o processamento da LC3 estão aumentados durante autofagia na maioria dos tipos celulares, inclusive no sistema nervoso central, fazendo dela um parâmetro confiável do evento (Glick *et al.*, 2010; Ravikumar *et al.*, 2010; Cheung *et al.*, 2011) (Figura 2).

Além desse papel na fusão da membrana do autofagossomo, há crescentes estudos demonstrando que a LC3 funcionaria como um “receptor” na membrana do fagóforo, selecionando o material a ser degradado ao interagir com moléculas “adaptadoras”, fazendo com que essa membrana consiga selecionar especificamente os agregados proteicos ou organelas que serão degradados (Moscat *et al.*, 2007, Stolz *et al.*, 2014).

O próximo passo na maturação do autofagossomo é chamado “desacoplador”, onde ocorre a fusão com o lisossomo para formar o autolisossoma (Mizushima, 2007) e posteriormente a degradação do material engolfado. Nessa etapa, está descrita principalmente a Atg9, que auxilia no desacoplamento das proteínas Atg do autofagossoma madura. Também se sabe

que a catepsina B e D (cisteínas-proteases lisossomais) são essenciais para a formação do autolisossoma (Eskelinen 2005).

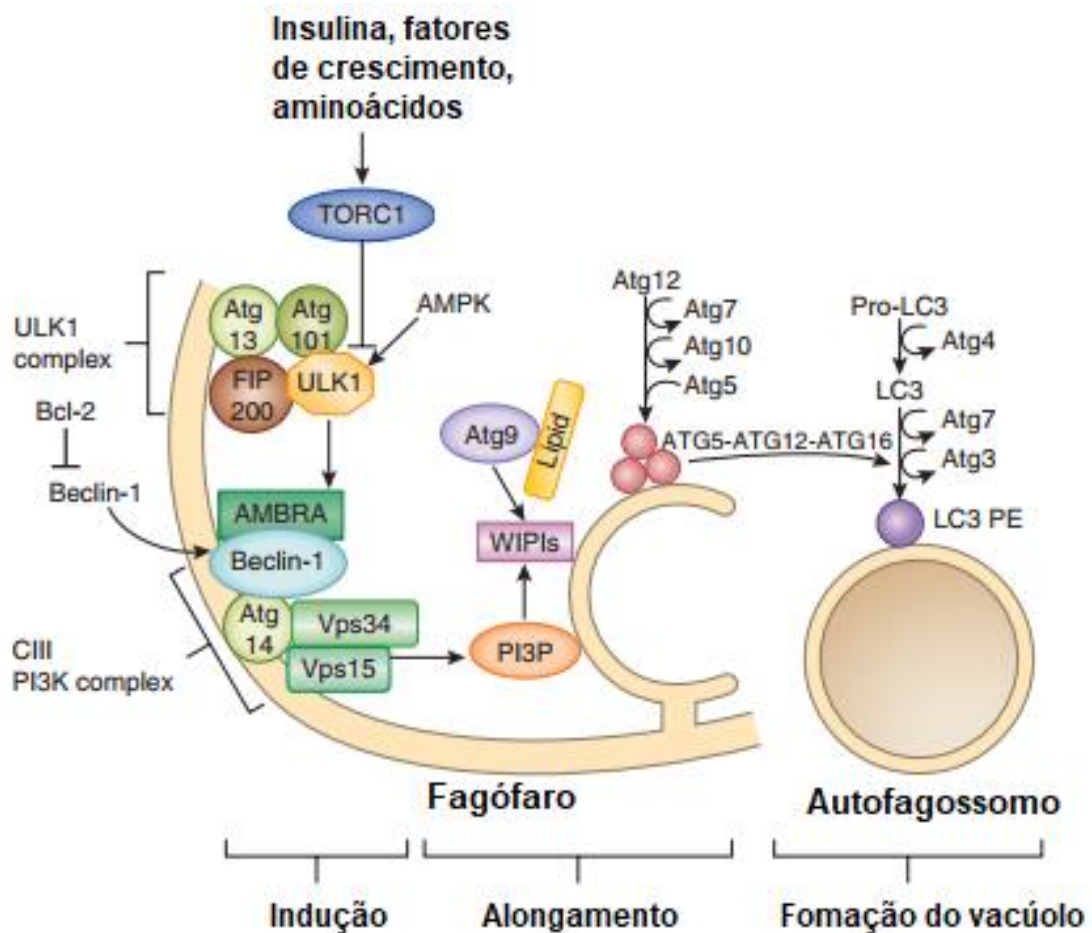


Figura 2 - Maquinaria molecular central da autofagia. Esquema representativo das principais proteínas envolvidas no processo autofágico em mamíferos e as respectivas etapas. De modo generalizado, pode-se dividir em três grandes grupos: O complexo ULK1, o complexo PI3K e o complexo da família de proteínas Atg-LC3. Adaptado de Nixon, 2013.

1.1.3.3 mTOR e a via de sinalização da autofagia

A mTOR foi descrita pela primeira vez em 1991 como uma proteína alvo do antifúngico e agente imunossupressor rapamicina (Heitman, 1991). É uma

proteína serina-treonina quinase codificada pelo gene mTOR, possuindo um peso molecular elevado, de cerca de 300 kD. A mTOR controla uma grande variedade de processos celulares e é descrita como um regulador mestre do metabolismo celular, por regular o crescimento, diferenciação e proliferação celular em resposta a diversas situações fisiológicas. A mTOR também desempenha um papel crucial na regulação da autofagia, sendo bem descrita a inibição de sua atividade durante a inanição de nutrientes, e assim, a indução da autofagia em eucariotos (Alers et al., 2012). Sua via de sinalização é desregulada em muitas doenças humanas, incluindo doenças neoplásicas, diabetes e desordens neurodegenerativas (Laplante e Sabatini, 2012).

Estão identificados dois tipos funcional e estruturalmente distintos de complexos mTOR. O complexo mTOR de tipo I (mTORC1) é composto de 5 subunidades: A mTOR, subunidade catalítica Raptor (Proteína regulatória da mTOR), mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*), PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) e DEPTOR (*DEP-domain containing mTOR-interacting protein*). O mTORC1 funciona como um sensor do metabolismo de nutrientes em condições normais e de estresse, também está envolvido na proliferação e crescimento celular, através da regulação da tradução de proteínas, e diretamente como regulador negativo da autofagia, fosforilando o ULK e Atg 13, as quais são essenciais para a formação do pré autofagossoma. A fosforilação da ULK1 e Atg 13 inibe a autofagia (Meijer e Codogno 2004).

O complexo mTOR de tipo 2 (mTORC2) é composto por rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (*mammalian stress-activated mitogen-activated protein kinase-interacting protein 1*), Protor-1, mLST8 e DEPTOR (Sarbasov 2005, Laplante e Sabatini, 2012). mTORC2 modula a organização do citoesqueleto, sobrevivência e proliferação celular através da ativação de AKT/PKB (Sarbasov, 2005).

Essa diferenciação é substancialmente caracterizada pela sensibilidade à rapamicina. A rapamicina tem sua atividade inibitória com maior eficiência no

complexo mTORC1 em comparação com mTORC2 (Laplante 2009-2012). A inibição da mTORC1 e indução da autofagia estão associadas com a redução da fosforilação da proteína ribossomal p70^{S6}, sendo outro parâmetro que pode ser avaliado na autofagia (Klionsky et al., 2000; Sarkar 2013).

1.1.4 Autofagia e neurodegeneração

Apesar de ser um mecanismo muito eficiente quando ativado em condições de hipóxia e privação nutricional, diversos estudos têm demonstrado que a autofagia exerce um papel de extrema importância no contexto das doenças neurodegenerativas, pois como já comentado, a maioria delas apresenta ao menos em algum grau a presença de agregados intraneurais de proteína malformadas, as quais servem como substrato para a degradação autofágica. Além disso, é de grande valia para a homeostase neuronal que se recicle e remova adequadamente pela via autofágica essas estruturas, visto que não é possível que isso se faça através da divisão celular (Menzies 2017; Hara et al., 2006).

Beclina-1 (também conhecido como Atg6) é uma proteína autofágica que faz parte do complexo quinase PI3K e desempenha um papel essencial na formação de autofagossomas. Foi observada reduzida em cérebros de pacientes com doença de Alzheimer (Furuya et al., 2005). No trabalho de Pickford et al., (2008) confirmando o papel essencial da Beclina 1 na autofagia, o *knockout* do gene Beclina 1 em camundongos PDAPP comprometeu drasticamente a autofagia. Houve um aumento do acúmulo de beta amiloide intraneuronal, diminuição da autofagia neuronal, neurodegeneração, ruptura lisossomal e alterações microgliais, indicando injúria neuronal. Também se verificou nesse mesmo estudo que a superexpressão de Beclina-1 reduziu os níveis de beta amiloide tanto intracelular quanto extracelular. Ainda, corroborando com estes achados, conforme Salminen (2013), há claras evidências de que a deficiência de Beclina 1, causada pela diminuição da expressão ou sequestro ineficiente do

autofagossoma provoca prejuízos na autofagia no processamento de APP na doença de Alzheimer.

O sistema ubiquitina-proteossoma é um importante mecanismo de degradação de proteínas agregadas, e sua desregulação está relacionada com a patogênese de diversas doenças neurodegenerativas. Porém, visto que os agregados proteicos encontrados nessas doenças, como beta amiloide e alfa sinucleína, são estruturas de alto peso molecular, se torna difícil serem degradadas pela via de ubiquitina proteossoma, em função de seu poro relativamente pequeno e, portanto, a via autofágica exerce um importante papel (Klionsky et al., 2011; Ravikumar et al., 2003).

Conforme Sridhar et al. (2011), há uma diminuição no volume de processos autofágicos basais em neurônios, a qual é dependente da idade. Essa desregulação, ainda que se trate de um processo fisiológico comum ao envelhecimento, pode resultar em um acúmulo de agregados proteicos, e dessa forma, favorecer condições neurodegenerativas. Também se sabe que quando desregulada, a autofagia como evento isolado pode levar a doenças neurodegenerativas em modelos animais (Komatsu, 2006). Portanto, o papel da autofagia na reciclagem de proteínas tóxicas tem chamado atenção para o desenvolvimento de possíveis estratégias terapêuticas.

Na doença de Alzheimer, há uma evidente e complexa relação entre depuração de beta amiloide e autofagia. Sabe-se que a beta amiloide é degradada pela via autofágica e diversos estudos demonstram que a estimulação autofágica é capaz de reduzir os níveis de acúmulo de beta amiloide e amenizar déficits cognitivos associados à patologia em camundongos transgênicos para Alzheimer (Spilman et al., 2010; Vingtdeux et al., 2011).

Em estudos com pacientes acometidos pela Doença de Alzheimer, pela primeira vez, foi demonstrada a ligação entre autofagia e a patologia no Alzheimer. Através de microscopia eletrônica, foram observados acumulados

vacúolos autofágicos imaturos em cérebros de pacientes com Alzheimer, e que, portanto, havia significativas falhas na autofagia nos pacientes com essa desordem (Nixon et al., 2000-2005-2007). Posteriormente, Yu et al., (2005) verificou que havia um expressivo acúmulo de beta amiloide na ausência desses vacúolos, sugerindo que a autofagia está diretamente envolvida na progressão da doença de Alzheimer.

Estudos genéticos com ratos mutantes para deleções de genes essenciais a autofagia também tem fornecido importantes considerações sobre a relevância autofágica. Nilsson (2013) verificou que a autofagia está diretamente envolvida na formação e secreção de placas beta amiloide. Ao ser deletado o gene Atg7 (envolvido na formação do autofagossomo) em camundongos transgênicos (assim os tornando autofagia-deficientes), houve um expressivo acúmulo de placas beta amiloide. Além disso, foi observado um prejuízo na memória decorrente da deficiência autofágica. Nos trabalhos de Hara et al., (2006) e Komatsu et al., (2006), a deleção dos genes ATG5 e ATG7 resultou em disfunções no sistema nervoso central, com déficits progressivos na função motora e reflexos anormais dos membros. Também se observou perda neuronal massiva e acúmulo de proteínas poliubiquitinadas como corpos de inclusão nos neurônios deficientes em autofagia, que aumentaram em tamanho e número com o envelhecimento.

Falhas lisossomais isoladas têm sido demonstradas como causas do acúmulo de proteínas no Alzheimer. Disfunções lisossomais podem causar o acúmulo de beta amiloide (Keilani et al., 2012). Também foi encontrado que mutações no gene presenilina 1 (forma mais comum de Alzheimer familiar de início precoce) interrompe a autofagia diretamente impedindo a proteólise lisossômica, tendo como consequência dessa depuração lisossomal defeituosa, o acúmulo de beta amiloide. Efeitos terapêuticos foram observados por esse mesmo grupo ao modular a proteólise lisossomal na doença de Alzheimer (Yang et al., 2011a, Yang et al., 2011b).

Spilman et al. (2010) e Caccamo et al. (2010) demonstraram que o tratamento crônico com rapamicina e consequente inibição da via da mTOR amenizou prejuízos cognitivos associados à doença de Alzheimer, como déficits de aprendizado e diminuição do comprometimento da memória em um modelo mamífero de Alzheimer (camundongo PDAPP). Além disso, foi visto que a administração da indutora autofágica rapamicina foi capaz de exercer uma função proteolítica, dessa forma diminuindo os níveis de placas beta amiloide tóxicas no tecido cerebral ao depurar a proteína pela via da mTOR.

Conforme Menzies (2017), apesar de haver evidências crescentes da importância fisiológica da autofagia na normalidade fisiológica neuronal, a manifestação patológica clínica da maioria das doenças neurodegenerativas é tardia, portanto é possível que pequenas alterações na maquinaria autofágica e consequente reciclagem dos agregados possua efeitos cumulativos que se manifestarão apenas em um período já tardio da vida. Soma-se ainda, a autofagia consistir em um processo extremamente dinâmico e altamente regulado, tornando a identificação da ocorrência complexa a curto prazo em passos iniciais com menor repercussão biológica.

Levando todos esses estudos em consideração, o presente conjunto de achados sugere que a diminuição de eventos autofágicos ou o seu prejuízo pode contribuir para a patologia do Alzheimer. É essencial que toda a via autofágica, desde a etapa de indução até as etapas subsequentes de maturação e depuração sejam altamente reguladas. Sugere-se que a patologia caracterizada pelo acúmulo beta amiloide se dê em parte através do prejuízo da autofagia, uma via essencial para a degradação de agregados proteicos citotóxicos (Steele, 2013). Com base nos dados encontrados nestes estudos, tem se tentado entender a relação entre o processo de autofagia e os mecanismos pelos quais esse fenômeno acontece no contexto de neuroproteção frente às doenças neurodegenerativas. A autofagia pode significar um relevante alvo terapêutico para essas desordens.

1.1.5 O ferro e a autofagia

Recentemente, têm sido relatadas crescentes evidências indicando que o ferro exerce um papel essencial na regulação da autofagia (Krishan, 2015; Asano, 2011). Um estudo recente, realizado por Wan et al., (2017) encontrou importantes correlações entre o depósito de ferro e a disfunção autofágica, onde ele demonstrou que o depósito de ferro contribui para a patologia do acúmulo de alfa sinucleína através da indução da disfunção autofágica. O ferro foi capaz de aumentar os níveis de alfa sinucleína e a geração de espécies reativas de oxigênio. Além disso, ao medir parâmetros autofágicos, o ferro inibiu a autofagia e a rapamicina (já conhecida indutora autofágica) foi capaz de reverter o acúmulo de alfa sinucleína induzido pelo ferro, além de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio, indicando que disfunções na autofagia estão diretamente envolvidas no estresse oxidativo induzido pelo ferro.

Estudos genéticos em pacientes com doenças neurodegenerativas com acúmulo de ferro (NBIA) demonstram que há mutações em genes que regulam o processo de degradação autofágica. O gene WDR45, o qual medeia a fusão dos autofagossomos com os lisossomos e a consequente formação dos autolisossoma, possui diversas mutações descritas, e o ATP13A2, que está mutado na doença de Parkinson familiar, e é altamente expresso no cérebro, tipicamente se localiza na membrana lisossomal, mas em situação de disfunção se encontra acumulado no retículo endoplasmático (Haack et al., 2012; Hayflick et al., 2013; Fonseca et al., 2014). Além disso, Usenovic, (2012) demonstrou que a deficiência de ATP13A2 também resultou em comprometimento autofágico, falha na depuração de autofagossomas, disfunção lisossomal, maior acúmulo de alfa sinucleína e neurotoxicidade. Esses resultados sugerem que o comprometimento das funções autofágicas, desde a formação do autolisossoma até a fase de depuração de proteínas tóxicas pode ser uma consequência do acúmulo exacerbado de ferro (Zhang, 2016).

Os lisossomas estão diretamente envolvidos nos eventos autofágicos através da reciclagem de organelas e proteínas de longa vida, muitas das quais possuem o ferro em sua estrutura. Portanto, há um aumento da suscetibilidade dos lisossomas ao estresse oxidativo. Estando o ferro em sua forma redox-ativa, e, portanto, tornando os lisossomas ricos em ferro, se torna um metal extremamente danoso para essas estruturas, visto que muitos dos seus processos ocorrem dentro dos compartimentos lisossômicos (Kurz et al., 2008-2011). Conforme Krishan, 2015, os vacúolos lisossômicos envolvidos na degradação de proteínas ricas em ferro são mais propensos ao estresse oxidativo. Portanto, a quantidade de ferro está diretamente ligada com a estabilidade dos lisossomas (Kurz et al., 2011; Terman et al., 2010). Karlsson (2013) demonstrou que células que realizavam a autofagocitose de proteínas de ligação ao ferro (como ferritina e HSP70, que são capazes de sequestrar o ferro em sua forma redox ativa) foram mais resistentes ao estresse oxidativo, sugerindo que a autofagia desempenha papel essencial no balanço adequado nos níveis de ferro lisossomal.

Outro importante papel da autofagia na homeostase do ferro no organismo se refere à degradação da ferritina, principal proteína de armazenamento de ferro. Sabe-se que a ferritina está envolvida na remoção do excesso de ferro do citoplasma (Theil, 2004) e que é degradada pelas hidrolases lisossômicas (Kidane, 2006). Portanto, nesse contexto, os níveis de ferritina precisam ser altamente balanceados para o correto funcionamento fisiológico (Krishan, 2015). No entanto, embora múltiplos mecanismos de degradação de proteínas tenham sido implicados na reciclagem da ferritina, como a autofagia se relaciona com essa proteína e o acúmulo de ferro ainda não está bem claro (Asano, 2011).

Outro ponto relevante a ser abordado é a relação entre quelantes de ferro e autofagia. Alguns estudos demonstram que quelantes de ferro são capazes de aumentar o número de autofagossomas e também os níveis de proteínas envolvidas na via autofágica, como a LC3 (Gutierrez, 2014). Além disso, um estudo recente mostrou que tanto os quelantes de ferro Deferroxamina quanto deferasirox levaram ao aumento da autofagia pela supressão da via de

sinalização da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (Pullarkat, 2014). Esses estudos corroboram que ao alterar a quantidade de ferro disponível é possível intervir nos parâmetros autofágicos.

Há diversas evidências de que o acúmulo de ferro está ligado a disfunção autofágica, porém, ainda permanece incerta a dinâmica envolvida nesse evento, se o ferro desempenha um papel primário ou secundário na geração de estresse oxidativo e sua relação direta e dos radicais livres com o desencadeamento autofágico. Embora muitas pesquisas estejam sendo feitas em relação a neurotoxicidade do ferro e seu acúmulo anormal, ainda são necessários mais estudos sobre a conexão dessa patologia com a autofagia.

1.1.6 Rapamicina

Rapamicina é um antibiótico macrolídeo lipofílico extraído da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, descoberta no solo da Ilha de Páscoa em 1972. Esse composto foi inicialmente utilizado como um composto antifúngico. Em 1997, a rapamicina foi aprovada pelo FDA como um medicamento imunossupressor para prevenir a rejeição de órgãos durante transplantes, principalmente transplantes de rim (Geissler et al., 2010). Também é amplamente usada em ensaios clínicos de tratamentos neoplásicos por suas propriedades anti-proliferativas (Fasolo et al., 2011). Nas últimas décadas diversos estudos têm sido feitos sobre a arquitetura molecular da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), já que se viu que a via mTOR está relacionada a muitas doenças humanas (Tsang et al., 2007).

A rapamicina é um inibidor específico da mTORC1, mas não inibe diretamente a atividade da quinase mTORC1. Inicialmente, ele forma um complexo com a proteína de ligação FKPB12, uma proteína de ligação citosólica chamada imunofilina, que por sua vez se liga e age especificamente como um

inibidor alostérico da mTOR (Abraham, 2002). Portanto, a formação do complexo de rapamicina-FKBP12 resulta em um ganho de função porque o complexo se liga a mTOR e inibe a atividade quinase da mTOR (Tsang, 2007). Como mencionado anteriormente, a mTOR é uma reguladora negativa da autofagia, portanto, a rapamicina também vem sendo amplamente usada para indução autofágica (Berger et al., 2006).

Vários grupos de pesquisa têm demonstrado que ao inibir a mTOR, a rapamicina exerce atividade neuroprotetora em diversas desordens neurodegenerativas. Majunder et al., (2012) demonstraram pela primeira vez que a rapamicina foi capaz de melhorar os déficits cognitivos de aprendizagem e memória de maneira idade dependente, além de reduzir profilaticamente a quantidade de placas beta amiloide e a formação de emaranhados neurofibrilares em camundongos transgênicos para doença de Alzheimer. Também houve uma redução substancial da ativação microglial, a qual se sabe estar ativada no Alzheimer (Cameron et al., 2010).

Na doença de Huntington, a Rapamicina protegeu contra a neurodegeneração ao diminuir o acúmulo de huntingtina e atenuar a morte celular em modelo animal da doença (Ravikumar, 2004). Em um modelo de esclerose tuberosa, a rapamicina também restaurou déficits de memória e aprendizado (Ehninger et al., 2008). Também há estudos demonstrando que a rapamicina pode ser benéfica em taupatias (doenças associadas ao acúmulo anormal da proteína tau) pela degradação autofágica tanto de tau mutante quanto tau selvagem em moscas (Berger et al., 2006). Esses resultados sugerem veementemente que a indução da autofagia poderia ser usada para tratar doenças neurodegenerativas, e que mais estudos na área são necessários (Ravikumar, 2006; Majunder et al., 2011).

Portanto, dada a relevante contribuição exercida pela sobrecarga de ferro nas doenças neurodegenerativas, e tais desordens sendo comprovadamente marcadas pelo acúmulo proteico danoso, conclui-se que o evento autofágico

exerce papel essencial na retirada desses agregados. Assim, sugere-se que a presença do metal ferro poderia exercer algum papel também no contexto autofágico. Dessa forma, a modulação da via, através do uso da Rapamicina, pode trazer importantes informações a respeito da influência do ferro e do processo autofágico nas desordens neurodegenerativas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Esta dissertação teve como objetivo investigar o efeito da estimulação da via da autofagia, pelo uso da Rapamicina nas alterações de memória induzidas pelo tratamento de ferro no período neonatal em ratos, além de investigar os efeitos do tratamento neonatal com ferro sobre parâmetros moleculares da via da autofagia em hipocampo de ratos, bem como verificar se possíveis alterações nesses mecanismos poderiam ser revertidas por meio do tratamento com rapamicina.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da rapamicina sobre o parâmetro cognitivo de esquia inibitória em ratos adultos tratados com ferro no período neonatal
- Avaliar o efeito do tratamento com ferro neonatal na autofagia através da proteína LC3 no hipocampo de ratos adultos
- Avaliar o efeito do tratamento com ferro neonatal na autofagia através da proteína Beclina-1 no hipocampo de ratos adultos

- Avaliar o efeito da rapamicina na idade adulta sobre a autofagia através da proteína LC3 em ratos tratados com ferro no período neonatal no hipocampo de ratos adultos
- Avaliar o efeito da rapamicina na idade adulta sobre a autofagia através da proteína Beclina-1 em ratos tratados com ferro no período neonatal no hipocampo de ratos adultos

CAPÍTULO 2

2.1 ARTIGO CIENTÍFICO

SUBMETIDO AO PERIÓDICO MOLECULAR NEUROBIOLOGY

Original article

Iron overload impairs autophagy: effects of Rapamycin in ameliorating iron-related memory deficits

Vanise Hallas Uberti^a, Betânia Souza de Freitas^a, Patrícia Molz^a,

Elke Bromberg^{a,b}, Nadja Schröder^{b,c*}

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

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

c - Department of Physiology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*** Corresponding author**

Nadja Schröder (ORCID – 0000-0002-4227-5702)

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

Telephone number: +55 51 99139-4308

Email: nadja_s@terra.com.br

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 308290/2015-1 and 421643/2016-1 to N.S.); the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM – grant number 465458/2014-9). The funding source(s) had no involvement in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Abstract

Over the years, iron accumulation in specific brain regions has been observed in normal aging and related to the pathogenesis of neurodegenerative disorders. Many neurodegenerative diseases may involve cognitive dysfunction, and we have previously shown that neonatal iron overload induces permanent cognitive deficits in adult rats and exacerbates age-associated memory decline. Autophagy is a catabolic pathway involved in the removal of toxic protein aggregates, which are a hallmark of neurodegenerative events. In the present study, we investigated whether iron accumulation would interfere with autophagy and also sought to determine the effects of rapamycin-induced stimulation of autophagy in attenuating iron-related cognitive deficits. Male Wistar rats received a single daily oral dose of vehicle or iron carbonyl (30 mg/kg) at postnatal days 12–14. In adulthood, they received daily intraperitoneal injections of vehicle or rapamycin (0.25 mg/kg) for 14 days. Results showed that iron given in the neonatal period impaired inhibitory avoidance memory and induced a decrease in proteins critically involved in the autophagy pathway, Beclin 1 and LC3, in the hippocampus. Rapamycin in the adulthood reversed iron-induced memory deficits, decreased the ratio phospho-mTOR/total mTOR, and recovered LC3 II levels in iron treated rats. Our results suggest that iron accumulation, as observed in neurodegenerative disorders, hinders autophagy, which might play a role in iron-induced neurotoxicity. Rapamycin, by inducing autophagy, was able to ameliorate iron-induced cognitive impairments. These findings support the use of rapamycin as a potential neuroprotective treatment against the cognitive decline associated to neurodegenerative disorders.

Key words: Iron; autophagy; rapamycin; cognitive deficits; neurodegenerative disorders

1. Introduction

Iron is an essential micronutrient required for many biological processes in the human body. During central nervous system (CNS) development, high levels of iron are required for the synthesis of neurotransmitters, acting as a cofactor for many enzymes, generation of ATP, and myelination [1]. The functions of iron are based on its biological capacity of interconversion between the ferrous (Fe^{+2}) and ferric (Fe^{+3}) states [1,2]. However, although crucial for neuronal metabolism, when in excess, this metal can also lead to cellular damage and oxidative stress via free radical production [2], a well-known hallmark of neurodegenerative diseases [3]. Moreover, consistent evidence suggest a pivotal relationship between high iron levels in specific brain regions, such as the hippocampus, substantia nigra and cortex, and the pathogenesis of neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) diseases [4-6]. Moreover, high iron content in brain regions, associated to aging or neurodegenerative disorders, correlates with poor performance in cognitive tests in healthy elderly individuals [7,8] or in patients with neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease [9,10].

Further studies are necessary to determine the exact mechanism of neurotoxicity mediated by iron as well as its role on cognitive impairments. Findings from studies using animal models have contributed to elucidate the impact of iron accumulation in neurodegenerative disorders (for a review see [11]). Previous studies from our research group have established an animal model of iron administration during the neonatal period, in which maximum iron absorption by the CNS occurs. Iron treatment in this period induces accumulation in brain

regions affected by neurodegenerative disorders [12]. Remarkably, in agreement with studies performed in humans, previous studies have shown that iron overload induces persistent memory impairments in several cognitive tasks, including spatial [12], emotional [13-15], and recognition memories [16-19]. In addition, we have also demonstrated that iron loading leads to oxidative damage [16], decreases BDNF levels [20], increases the expression of apoptotic markers [21-23], affects mitochondrial dynamics [22], and results in the accumulation of ubiquitinated proteins [15] in the hippocampus of adult rats.

Autophagy and ubiquitin-proteasome system are the two main pathways of protein and cellular content degradation in eukaryotic cells. The autophagy-lysosome pathway is a major intracellular catabolic process, in which cytoplasmic contents are engulfed and transported to the lysosome for degradation. In addition, autophagy is a pathway responsible to degrade damaged, misfolded or aggregated proteins, for the maintenance of cellular homeostasis [24-26]. Defective autophagy has been recently implicated in the pathogenesis of several human diseases, including neurodegenerative disorders. Because neurodegeneration is marked by abnormal long-lived protein aggregation, such as amyloid-beta (A β) peptide in AD and alpha-synuclein in PD [27-30] studies have consistently suggested autophagy as a protective strategy for effective clearance of these aggregates [27,29-34].

Furthermore, recent evidence has suggested that iron plays an important role in autophagy regulation since iron overload collaborates with the increase of the protein aggregates [35-37]. Thereby, both in vivo and in vitro studies have reported that autophagy induction could potentially mitigate progression in

neurodegenerative diseases with iron deposition, but the relationship between these mechanisms remains poorly understood [33, for a review see [34]).

Autophagy is an intricate machinery regulated by many signaling pathways and can be pharmacologically induced by inhibiting negative regulators such as the mammalian target of rapamycin (mTOR), a serine/threonine kinase [38-40]. This event is regulated by at least sixteen key proteins named autophagy-related genes (ATGs), which are recruited to the pre-autophagosomes elongation and autophagosome formation. A large protein complex is necessary to form the autophagosome nucleation; Beclin1 is a protein involved in the isolation of membranes to form autophagosomes [41-44]. During the elongation phase, the conjugation of phosphatidylethanolamine (PE) to the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-I forms LC3-II, which is transported from cytoplasm to the membrane of the pre-autophagosomes. LC3 II is a marker for the progression of autophagy [40,45-48]. Once autophagosome formation is completed, this structure fuses with lysosomes for degradation [49].

Rapamycin is a macrolide antibiotic that inhibits mTOR [50]. Rapamycin binds to the cytosolic protein FK-binding protein 12 (FKBP12) and inhibits the mTOR kinase activity by phosphorylation of P70S6K [51,52]. Thus, inhibition of mTOR by rapamycin treatment induces autophagy [38]. A few studies show that rapamycin enhances the clearance of aggregate-prone proteins and reduces their toxicity in neurodegenerative disorders [53-56]. However, additional information about the precise role of autophagy in neuroprotection and associated signaling pathway(s) is necessary. Thus, in the present study, we aimed to investigate whether iron accumulation plays a causative role in autophagy impairments

accompanying neurodegeneration. Moreover, we sought to determine whether the pharmacological activation of autophagy by rapamycin could ameliorate iron-induced memory deficits.

2. Materials and methods

2.1 Animals

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

All behavioral experiments were performed at light phase between 09:00 a.m and 4:30 p.m. All experimental procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th Edition, 2011) and the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI, Brazil). All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution at which the studies were conducted and approved by the Institutional Ethics Committee of the Pontifical Catholic University

(permit number: SIPESQ #8469). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

2.2 Experimental design

In order to investigate a possible interplay between iron overload and autophagy, as well as a potential protective effect of rapamycin against iron-induced memory deficits, male Wistar rats divided in two groups received iron carbonyl or vehicle solution. Subsequently, at the age of four months, the two groups were further separated into four groups, resulting in four experimental groups: Veh-Veh, Veh-rapamycin, Iron-Veh, Iron-rapamycin. After 14 days of rapamycin treatment, rats were tested in the inhibitory avoidance memory task. Twenty-four hours after the completion of behavioral task, rats were euthanized by decapitation and their hippocampi were quickly removed and stored in -80°C freezer for posterior biochemical analysis. Experimental design is shown in Figure 1.

2.3 Pharmacological treatments

2.3.1 Neonatal iron treatment

The neonatal iron treatment was performed as previously described [13,15,16]. Briefly, 12-day-old rat pups received a single oral daily dose (10 ml/kg solution volume) of vehicle (5% sorbitol in water, control group) or 30 mg/kg of body weight of Fe²⁺ (iron carbonyl, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) via a metallic gastric tube, over 3 days (postnatal days 12-14).

2.3.2 Rapamycin

Adult (four-month-old, weighing approximately 550g) rats, treated neonatally with either vehicle or iron as described above, received a daily intraperitoneal injection of vehicle or rapamycin (Sigma Aldrich, São Paulo, Brazil). Rapamycin was dissolved in 0.9 g% saline solution containing 0.5 % DMSO (vehicle), and administered daily for fourteen days at the dose of 0.25 mg/kg [57]. Inhibitory avoidance training was performed 24 h after the last rapamycin administration.

2.4 Inhibitory Avoidance Task

We used the single-trial, step-down inhibitory avoidance (IA) conditioning as an established model of fear-motivated memory. In IA training, animals learn to associate a location in the training apparatus with an aversive stimulus (footshock). The IA behavioral training and retention test procedures were described in previous reports [12,13,15]. The IA apparatus was a 50x25x25-cm³ acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1-mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm wide, 2.5-cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. On the training trial, rats were placed on the platform and their latency to step-down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. Immediately after stepping down on the grid, rats received a mild footshock (0.4 mA) and were removed from the apparatus immediately afterwards. A retention test trial was carried out 24 h after the training trial. The retention test trial was procedurally identical to training, except that no footshock was presented. Step-down latencies

(in seconds) on the retention test trial (maximum 180 s) were used as a measure of IA retention.

2.5 Western Blot Analysis

Hippocampi obtained from rats treated with iron in the neonatal period and rapamycin in adulthood were homogenized in homogenization buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, protease inhibitor cocktail, 0.5% Triton X-100, and 0.1% SDS. After 30 min in ice, samples were centrifuged at 13,500 rpm for 10 min [22,23]. The supernatant was collected and the protein content was determined using Bradford assay [58]. Aliquots were stored at -20°C.

Twenty-five µg of protein was separated on a 10% SDS polyacrylamide gel (or 8% SDS polyacrylamide gel for mTOR and phospho-mTOR analyses) and transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in TBS containing 0.05% Tween 20 and were incubated overnight with one of the following antibodies: anti-β-actin (Abcam, Cambridge, UK) at 1:1500; anti-LC3 II (Abcam, Cambridge, UK) at 1:1000; anti-beclin1 (Abcam, Cambridge, UK) at 1:1000; anti-Phospho-mTOR (phospho S2448) (Abcam, Cambridge, UK) at 1:2000; and anti-mTOR (Abcam, Cambridge, UK) at 1:2000. Goat anti-mouse IgG and goat polyclonal anti-rabbit IgG (both from Abcam, Cambridge, UK) secondary antibodies were used and detected using ECL Western Blotting Substrate Kit (Abcam, Cambridge, UK). Pre-stained molecular weight protein markers (SuperSignal Molecular Weight Protein Ladder, Thermo Scientific, Rockford, USA) were used to determine the detected bands' molecular

weight. The densitometric quantification was performed using Chemiluminescent photo finder (Kodak/Carestream, model GL2200). Total blotting protein levels of samples were normalized according to each sample's β -actin levels [22,23].

2.6 Statistical Analysis

Latencies to step-down and data from western blot experiments are expressed as mean \pm standard error (S.E.). Statistical comparisons were performed using two-way analysis of variance (2-way ANOVA), with neonatal treatment (vehicle or iron) and adult treatment (vehicle or rapamycin) as fixed factors. In all comparisons, p values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

3. Results

Our first goal was to determine if subchronic rapamycin treatment would be able to reverse iron-induced memory deficits. Two-way ANOVA indicated a statistically significant main effect of neonatal iron treatment ($F_{(1, 43)} = 4.329$, $p = 0.043$) in latencies to step-down in the retention test session, confirming previous findings that show that iron given in the neonatal period impairs inhibitory avoidance memory. Remarkably, a significant interaction ($F_{(1, 43)} = 6.383$, $p = 0.015$) indicates that rapamycin treatment ameliorates memory in iron-treated rats, as latency to step-down in the retention test was higher in the iron-treated group that received rapamycin than in the iron-treated group that received vehicle

in the adulthood (Figure 2). No statistically significant effects were found when latencies from the training session were compared.

To confirm the autophagy stimulating effects of rapamycin, we first analyzed mTOR phosphorylation in the hippocampus of rats that received iron or vehicle in the neonatal period and rapamycin for 14 days in adulthood (Figure 3). Two-way ANOVA indicated a significant main effect of rapamycin treatment. Besides improving memory retention, rapamycin treatment in the adulthood caused a decrease in the ratio phospho-mTOR/total mTOR ($F_{(1, 11)} = 8.00$, $p < 0.016$).

In order to examine the effects of iron overload and of the treatment with rapamycin on autophagy in iron-treated rats, we analyzed the expression of proteins critically involved in the autophagic cascade. Beclin 1, a protein involved in autophagy initiation, was quantified. Two-way ANOVA indicated a significant main effect of neonatal iron treatment ($F_{(1, 9)} = 6.567$, $p < 0.031$), which induced a decrease in Beclin 1 levels (Figure 4). No significant effects of rapamycin treatment in the adulthood or interactions were observed.

When LC3 II levels were analyzed, two-way ANOVA revealed significant main effects of iron treatment reducing LC3 II levels ($F_{(1, 9)} = 19.27$, $p = 0.002$) and rapamycin in the adulthood rising LC3 II levels ($F_{(1, 9)} = 13.175$, $p = 0.005$). Importantly, a significant interaction was observed ($F_{(1, 9)} = 10.541$, $p = 0.010$), suggesting that rapamycin in the adulthood was able to restore iron-induced decreases in LC3 II levels (Figure 5).

Discussion

In the present study, we show that neonatal iron treatment impairs inhibitory avoidance memory, a form of emotionally-modulated memory, confirming previous findings from our research group showing that iron overload hinders memory in rodents [12,15,16]. Studies with humans have also shown that iron accumulation in brain regions, measured by magnetic resonance imaging, is related to memory deficits in normal aging [8,59] as well as in neurodegenerative disorders [60,61]. Using an animal model based on iron administration for three days during the neonatal period, a period of high iron uptake by the brain, we have demonstrated that iron overload induces alterations consistently affected in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, including increased oxidative stress [16] and altered mitochondrial dynamics [22], induction of apoptosis [21-23] and reactive gliosis [62], and decreased expression of synaptic marker synaptophysin [22] in the hippocampus. Previous findings also indicate that iron overload is associated with impairments in the ubiquitin proteasome system, a major cellular protein degradation pathway [15].

There is increasing evidence indicating the role of misfolded protein degradation mediated by the autophagy system in neurodegenerative diseases, suggesting that failure in this pathway may represent an important contribution to disease progression. This is supported by the presence of aggregates of misfolded proteins, which are substrates for autophagy degradation in most neurodegenerative disorders [27,63]. However, the exact influence of autophagy is yet to be determined, since the incorrect removal of aggregated protein may have

cumulative effects that can be expressed later in life [63]. Although both autophagy impairment and iron deposition seem to be involved in the development and progression of neurodegenerative disorders, if and how they interact remain unknown.

Rapamycin is US Food and Drug Administration (FDA)-approved drug that has been used as an immunosuppressant in organ transplantation. Rapamycin acts inhibiting the activity of mammalian target of rapamycin (mTOR), an intracellular serine/threonine protein kinase that has a central role in various cellular processes. Studies using *in vitro* and *in vivo* experimental models of age-linked neurodegenerative diseases have suggested that rapamycin, through induction of mTOR-dependent autophagy process, can be a promising therapeutic strategy, for the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's disease [63]. The present findings demonstrate that rapamycin treatment in adult life was able to ameliorate memory retention in the inhibitory avoidance task, suggesting a significant memory improvement in the iron-treated group. In agreement, studies have demonstrated that rapamycin improved learning and memory deficits in transgenic mouse models of AD [56,64], as well as in a rat model of AD-like phenotype, induced by A β 1-42 peptides injection into the hippocampus [57]. In addition, rapamycin was also able to recover sepsis- [65] as well as anesthesia-induced memory deficits [66]. The mechanisms underlying rapamycin-induced memory recovery are poorly understood. However, a recent study by Glatigny and coworkers [67] demonstrated that fear learning upregulates autophagy in the hippocampus. In agreement, it was found that water maze training increases the number of autophagosomes [68]. Moreover, downregulation

of hippocampal autophagy reduces both short- and long-term activity-dependent synaptic plasticity capacities in hippocampal neurons in response to novel neuronal stimuli [67]. Thus, these findings support the view that autophagy may be required for learning and memory. Our results indicated that rapamycin subchronic treatment in a low dose in adulthood was able to decrease the ratio of phosphorylated mTOR to total mTOR in both Veh and Iron groups, thereby stimulating autophagy, as previously reported by Singh and coworkers [57]. These findings are corroborated by Liu and coworkers [65], showing that rapamycin decreased mTOR phosphorylation at S2448 and protected against sepsis-induced memory impairments. Based on the observation that autophagy may play a role on memory consolidation, this mechanism may contribute to rapamycin-induced amelioration of iron-related memory deficits.

Aiming to understand the role of iron overload and possible interactions with rapamycin treatment in the autophagy cascade, in this study we have investigated the effects of iron on key proteins involved in the autophagy pathway in hippocampi of adult rats. Beclin1 is the mammalian homolog of yeast autophagy related gene 6 (Atg6), and participates in the autophagosome formation and initiation of autophagy through class III PI3K pathway [28]. It has been reported that Beclin1 deletion disrupts neuronal autophagy and promotes β -amyloid deposition and neurodegeneration in mice [69]. Here we demonstrate that the group that received neonatal iron treatment showed a significant decrease in beclin-1 levels. Also, LC3 II, a protein critically involved in the fusion of autophagosomal membranes was found to be reduced in hippocampi of iron-treated rats, suggesting that autophagy cascade is down-regulated by iron

overload. Wan and coworkers [37] recently demonstrated using SH-SY5Y cells that iron treatment impaired autophagy, decreasing the levels of autophagy-related proteins including beclin-1 and LC3, leading to α -synuclein accumulation, and reactive oxygen species (ROS) production. Studies show that iron-loaded lysosomes are sensitive to oxidative stress and to consequent lysosomal disruption [70], while multiple myeloma cell lines exposure to iron chelators led to repression of mTOR signaling, inducing autophagy [71], corroborating that iron availability may modulate autophagy. Iron-induced decreased levels of beclin-1 and LC3 II suggest that iron overload *in vivo* compromises downstream autophagy components.

Rapamycin decreased mTOR phosphorylation and also recovered LC3 II levels in iron-treated rats, while no effects were observed on Beclin-1 in iron-treated rats. Although the reasons why rapamycin has not directly recovered beclin-1 levels, its actions on mTOR phosphorylation and LC3 II indicate stimulatory effects on autophagy. LC3 II association with autophagosomal membranes is closely related with the formation of mature autophagosomes, thus measuring LC3 II levels has been consistently used as a marker of autophagosome formation [63]. Additionally, rapamycin-induced stimulation of autophagy may contribute to neuroprotection against iron-related neurotoxicity, which can ultimately result in memory recovery.

This is a pioneer study, linking for the first time, *in vivo* iron overload with impaired autophagy, suggesting that iron-induced autophagy deregulation might be related to memory deficits observed in this animal model. From a translational point of view, the present findings alert for the risk imposed by the indiscriminate

iron supplementation in infancy, period in which iron access to the brain is maximal. The induction of autophagy by rapamycin alleviated the memory decline induced by iron accumulation, which has been implicated in memory loss in aging and neurodegenerative disorders, giving support for its use as a potential candidate for the treatment of cognitive deficits.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted (Institutional Ethics Committee of the Pontifical Catholic University, permit number SIPESQ #8469).

REFERENCES

- [1] Hare D, Ayton S, Bush A, Lei P (2013) A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain. *Front Aging Neurosci* 5: 34. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00034>
- [2] Papanikolaou G, Pantopoulos K (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 202: 199-211. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.021>
- [3] Zucca FA, Segura-Aguilar J, Ferrari E, Muñoz P, Paris I, Sulzer D, Sarna T, Casella L, Zecca L (2017) Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 155: 96–119. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.012>
- [4] Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5: 863–873. <https://doi.org/10.1038/nrn1537>
- [5] Sian-Hulsmann J, Mandel S, Youdim MB, Riederer P (2011) The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 118: 939-957. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07132.x>
- [6] Ward RJ, Zecca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L (2014) The role of iron brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 13: 1045–1060. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70117-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70117-6)
- [7] Del C Valdés Hernández M, Ritchie S, Glatz A, Allerhand M, Muñoz Maniega S, Gow AJ, Royle NA, Bastin ME, Starr JM, Deary IJ, Wardlaw JM (2015)

Brain iron deposits and lifespan cognitive ability. *Age (Dordr)* 37:100.

<https://doi.org/10.1007/s11357-015-9837-2>

[8] Kalpouzos G, Garzón B, Sitnikov R, Heiland C, Salami A, Persson J, Bäckman L (2017) Higher Striatal Iron Concentration is Linked to Frontostriatal Underactivation and Poorer Memory in Normal Aging. *Cereb Cortex* 27: 3427-3436. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx045>

[9] Luo Z, Zhuang X, Kumar D, Wu X, Yue C, Han C, Lv J (2013) The correlation of hippocampal T2-mapping with neuropsychology test in patients with Alzheimer's disease. *PLoS One* 8:e76203.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076203>.

[10] Ayton S, Fazlollahi A, Bourgeat P, Raniga P, Ng A, Lim YY, Diouf I, Farquharson S, Fripp J, Ames D, Doecke J, Desmond P, Ordidge R, Masters CL, Rowe CC, Maruff P, Villemagne VL; Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle (AIBL) Research Group, Salvado O, Bush AI (2017) Cerebral quantitative susceptibility mapping predicts amyloid- β -related cognitive decline. *Brain* 140: 2112-2119. <https://doi.org/10.1093/brain/awx137>.

[11] Schröder N, Figueiredo LS, de Lima MN (2013) Role of Brain Iron Accumulation in Cognitive Dysfunction: Evidence from Animal Models and Human Studies. *J Alzheimers Dis* 34: 797–812. <https://doi.org/10.3233/JAD-121996>

[12] 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* 124: 77-85.

[13] Silva PF, Garcia VA, Dornelles Ada S, Silva VK, Maurmann N, Portal BC, Ferreira RD, Piazza FC, Roesler R, Schröder N (2012) Memory impairment

induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. *Neuroscience* 200: 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.038>

[14] Garcia VA, Souza de Freitas B, Busato SB, D'avila Portal BC, Piazza FC, Schröder N (2013) Differential effects of modafinil on memory in naïve and memory-impaired rats. *Neuropharmacology* 75: 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.038>

[15] Figueiredo LS, de Freitas BS, Garcia VA, Dargél VA, Köbe LM, Kist LW, Bogo MR, Schröder N (2016) Iron Loading Selectively Increases Hippocampal Levels of Ubiquitinated Proteins and Impairs Hippocampus-Dependent Memory. *Mol Neurobiol* 53: 6228-6239. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9514-6>

[16] de Lima MN, Polydoro M, Laranja DC, Bonatto F, Bromberg E, Moreira JC, Dal-Pizzol F, Schröder N (2005) Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur J Neurosci* 21: 2521-2528. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04083.x>

[17] de Lima MN, Presti-Torres J, Caldana F, Grazziotin 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 J Pharmacol* 570: 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.002>

[18] Rech RL, de Lima MN, Dornelles A, Garcia VA, Alcalde LA, Vedana G, Schröder N (2010) Reversal of age-associated memory impairment by rosuvastatin in rats. *Exp Gerontol* 45: 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.02.001>

[19] Fagherazzi EV, Garcia VA, Maurmann N, Bervanger T, Halmenschlager LH, Busato SB, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Schröder N (2012) Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. *Psychopharmacol (Berl.)* 219: 1133–1140. [https://doi.org/ 10.1007/s00213-011-2449-3](https://doi.org/10.1007/s00213-011-2449-3)

[20] Alcalde LA, de Freitas BS, Machado GDB, de Freitas Crivelaro PC, Dornelles VC, Gus H, Monteiro RT, Kist LW, Bogo MR, Schröder N (2018) Iron chelator deferiprone rescues memory deficits, hippocampal BDNF levels and antioxidant defenses in an experimental model of memory impairment. *Biometals* 31: 927-940. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0135-1>.

[21] Miwa CP, de Lima MN, Scalco F, Vedana G, Mattos R, Fernandez LL, Hilbig A, Schröder N, Vianna MR (2011) Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. *Neurotox Res* 19: 527–535. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9181-3>

[22] da Silva VK, de Freitas BS, da Silva Dornelles A, Nery LR, Falavigna L, Ferreira RD, Bogo MR, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Schröder N (2014) Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNM1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection. *Mol Neurobiol* 49: 222-233. [https://doi.org/ 10.1007/s12035-013-8514-7](https://doi.org/10.1007/s12035-013-8514-7)

[23] da Silva VK, de Freitas BS, da Silva Dornelles A, Garcia RC, Monteiro RT, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Schroder N (2018) Antiapoptotic effects of cannabidiol in an experimental model of cognitive decline induced by brain iron overload. *Transl Psychiatry* 8: 176. [https://doi.org/ 10.1038/s41398-018-0232-5](https://doi.org/10.1038/s41398-018-0232-5)

[24] Klionsky DJ (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 931–937. <https://doi.org/10.1038/nrm2245>

[25] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>

[26] Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147: 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>

[27] Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11: 1107–1117. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1107>

[28] Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J (2008) The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain* 131(Pt 8): 1969-1978. <https://doi.org/10.1093/brain/awm318>

[29] Selkoe DJ (2011) Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb. Perspect Biol* 3(7). pii: a004457. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004457>.

[30] Moloudizargari M, Asghari M, Ghobadi E, Fallah M, Rasouli S, Abdollahi M (2017) Autophagy, its mechanisms and regulation: Implications in neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev* 40: 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.09.005>

[31] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the

central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441: 880–884.
<https://doi.org/10.1038/nature04723>

[32] Sanchez PE, Zhu L, Verret L, Vessel KA, Orr AG, Cirrito JR, Devidze N, Ho K, Yu GQ, Palop JJ, Mucke L (2012) Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Proc Natl Acad Sci* 109: E2895–E2903.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1121081109>

[33] Giordano S, Darley-Usmar V, Zhang J (2014) Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. *Redox Biol* 2: 82-90.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.013>

[34] Fujikake N, Shin M, Shimizu S (2018) Association Between Autophagy and Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* 12: 255.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00255>

[35] Wong AS, Cheung ZH (2011) Molecular machinery of macroautophagy and its deregulation in diseases. *Biochim Biophys Acta* 1812: 1490-1497.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.07.005>

[36] Krishan S, Jansson PJ, Gutierrez E, Lane DJ, Richardson D, Sahni S (2015) Iron metabolism and autophagy: a poorly explored relationship that has important consequences for health and disease. *Nagoya J Med Sci* 77: 1–6.

[37] Wan W, Jin L, Wang Z, Wang L, Fei G, Ye F, Pan X, Wang C, Zhong C (2017) Iron Deposition Leads to Neuronal α -Synuclein Pathology by Inducing Autophagy Dysfunction. *Front Neurol* 8: 1.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00001>.

[38] Wang CW, Klionsky DJ (2003) The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* 9: 65–76.

[39] Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>

[40] Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>

[41] Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T, Ohsumi Y (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16: 2967–2983. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025395>

[42] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7- deficient mice. *J Cell Biol* 169: 425–434. <https://doi.org/10.1083/jcb.200412022>

[43] Cao Y, Klionsky DJ (2007) Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res* 17: 839–849. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.78>

[44] He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43: 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>

[45] Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki KT, Tokuhiya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001) Dissection of autophagosome

formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152: 657–668. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.657>

[46] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282: 24131–24145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>

[47] Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T (2008) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* 19: 2092–2100. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1257>

[48] Cherra SJ, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW, Chu CT (2010) Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol* 190: 533–553. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002108>

[49] Eskelinen EL (2005) Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy* 1: 1–10. <https://doi.org/10.4161/auto.1.1.1270>

[50] Li J, Kim SG, Blenis J (2014) Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab* 19: 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.001>

[51] Kamada Y, Sekito T, Ohsumi Y (2004) Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol* 279: 73–84.

[52] Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E (2005) mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 16: 525–537. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi113>

[53] Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O’Kane CJ, Rubinsztein DC (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36: 585–595.
<https://doi.org/10.1038/ng1362>

[54] Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, Oroz LG, Underwood BR, Pangalos MN, Schmitt I, Wullner U, Evert BO, O’Kane CJ, Rubinsztein DC (2006) Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet* 15: 433–442. [https://doi: 10.1093/hmg/ddi458](https://doi.org/10.1093/hmg/ddi458)

[55] Erlich S, Alexandrovich A, Shohami E, Pinkas-Kramarski R (2007) Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 26: 86–93. [https://doi.org/ 10.1016/j.nbd.2006.12.003](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.003)

[56] Spilman P, Podlitskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, Richardson A, Strong R, Galvan V (2010) Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer’s disease. *PLoS ONE* 5: e9979.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009979>

[57] Singh AK, Kashyap MP, Tripathi VK, Singh S, Garg G, Rizvi SI (2017) Neuroprotection through Rapamycin-induced activation of autophagy and PI3K/Akt1/mTOR/CREB signaling against Amyloid- β -induced oxidative stress, synaptic/neurotransmission dysfunction, and neurodegeneration in adult rats. *Mol Neurobiol* 54: 5815-5828. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0129-3>

[58] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

[59] Steiger TK, Weiskopf N, Bunzeck N (2016) Iron Level and Myelin Content in the Ventral Striatum Predict Memory Performance in the Aging Brain. *J Neurosci* 36(12):3552-8. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3617-15.2016>.

[60] Fujiwara E, Kmech JA, Cobzas D, Sun H, Seres P, Blevins G, Wilman AH (2017) Cognitive Implications of Deep Gray Matter Iron in Multiple Sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 38(5):942-948. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5109>

[61] Ayton S, Wang Y, Diouf I, Schneider JA, Brockman J, Morris MC, Bush AI (2019) Brain iron is associated with accelerated cognitive decline in people with Alzheimer pathology. *Mol Psychiatry* <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0375-7>.
[Epub ahead of print]

[62] Fernandez LL, de Lima MN, Scalco F, Vedana G, Miwa C, Hilbig A, Vianna M, Schröder N (2011) Early post-natal iron administration induces astroglial response in the brain of adult and aged rats. *Neurotox Res* 20: 193-199. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9235-6>

[63] Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, Füllgrabe J, Jackson A, Jimenez Sanchez M, Karabiyik C, Licitra F, Lopez Ramirez A, Pavel M, Puri C, Renna M, Ricketts T, Schlotawa L, Vicinanza M, Won H, Zhu Y, Skidmore J, Rubinsztein DC (2017) Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* 93(5):1015-1034. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.022>

[64] Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S (2010) Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem* 285:13107-13120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.100420>

[65] Liu W, Guo J, Mu J, Tian L, Zhou D (2017) Rapamycin Protects Sepsis-Induced Cognitive Impairment in Mouse Hippocampus by Enhancing Autophagy. *Cell Mol Neurobiol* 37: 1195-1205. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0449-x>

[66] Zhang X, Zhou Y, Xu M, Chen G (2016) Autophagy Is Involved in the Sevoflurane Anesthesia-Induced Cognitive Dysfunction of Aged Rats. *PLoS One* 11(4):e0153505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153505>

[67] Glatigny M, Moriceau S, Rivagorda M, Ramos-Brossier M, Nascimbeni AC, Lante F, Shanley MR, Boudarene N, Rousseaud A, Friedman AK, Settembre C, Kuperwasser N, Friedlander G, Buisson A, Morel E, Codogno P, Oury F (2019) Autophagy Is Required for Memory Formation and Reverses Age-Related Memory Decline. *Curr Biol* 29: 435-448.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.12.021>

[68] Hylin MJ, Zhao J, Tangavelou K, Rozas NS, Hood KN, MacGowan JS, Moore AN, Dash PK (2018) A role for autophagy in long-term spatial memory formation in male rodents. *J Neurosci Res* 96: 416-426. <https://doi.org/10.1002/jnr.24121>

[69] Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer

disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* 118: 2190-2199. <https://doi.org/10.1172/JCI33585>

[70] Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT (2011) Cell sensitivity to oxidative stress is influenced by ferritin autophagy. *Free Radic Biol Med* 50(11):1647-1658. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.014>

[71] Pullarkat V, Meng Z, Donohue C, Yamamoto VN, Tomassetti S, Bhatia R, Krishnan A, Forman SJ, Synold TW (2014) Iron chelators induce autophagic cell death in multiple myeloma cells. *Leuk Res* 38(8):988-996. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.06.005>

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 Experimental design. Groups of rats were treated with vehicle or iron (orally, 30 mg/kg) in the neonatal period at postnatal days 12th to 14th. In adulthood (4 months of age) they received i.p. injections of rapamycin (0.25 mg/kg) or vehicle for 14 days. Twenty-four hours after the last injection animals were trained in the inhibitory avoidance memory task. Twenty-four hours after the completion of behavioral testing, animals were euthanized by decapitation and their hippocampi were quickly isolated and stored in -80°C for western blot analysis.

Fig. 2 Subchronic rapamycin in the adulthood rescues iron-induced inhibitory avoidance memory impairment. Inhibitory avoidance task was performed in rats treated neonatally with vehicle (Veh) or iron (30 mg/kg of Fe²⁺) and given vehicle (Veh) or rapamycin (Rapa, 0.25 mg/kg) in adulthood (4 months of age). (Veh-Veh N =14, Veh-Rapa N = 9, Iron-Veh N = 11, Iron-Rapa N = 13). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, with neonatal treatment (vehicle or iron) and adult treatment (vehicle or rapamycin) as fixed factors. # indicates $p < 0.05$ (significant main effect of iron treatment in the neonatal period) and * indicates $p < 0.05$ (significant interaction)

Fig. 3 Rapamycin treatment in the adulthood decreases the ratio phospho-mTOR/total mTOR. Western blotting of phospho-mTOR and total mTOR in the hippocampus of 4-month-old rats treated with sorbitol (Sorb) or iron neonatally and treated with vehicle (Veh) or rapamycin (Rapa) in the adulthood. Twenty five µg of protein were separated on SDS-PAGE and probed with specific antibodies.

Representative Western Blots for phospho-mTOR/total mTOR are shown in the lower panel. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, with neonatal treatment (vehicle or iron) and adult treatment (vehicle or rapamycin) as fixed factors. (Veh-Veh N =5, Veh-Rapa N = 3, Iron-Veh N = 3, Iron-Rapa N = 4). * indicates $p < 0.05$ (significant main effect of rapamycin treatment in the adulthood)

Fig. 4 Neonatal iron treatment decreases Beclin 1 levels. Western Blotting of Beclin in the hippocampus of 4-month-old rats treated with sorbitol (Sorb) or iron neonatally and treated with vehicle (Veh) or rapamycin (Rapa) in the adulthood. Twenty five μg of protein were separated on SDS-PAGE and probed with specific antibodies. Representative Western Blots for Beclin 1 and β -actin are shown in the lower panel. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, with neonatal treatment (vehicle or iron) and adult treatment (vehicle or rapamycin) as fixed factors. (Veh-Veh N =3, Veh-Rapa N = 3, Iron-Veh N = 3, Iron-Rapa N = 4). # indicates $p < 0.05$ (significant main effect of iron treatment in the neonatal period)

Fig. 5 Neonatal iron treatment induced a decrease in LC3 II levels, which was reversed by rapamycin in the adulthood. Twenty five μg of protein were separated on SDS-PAGE and probed with specific antibodies. Representative Western Blots for LC3 II and β -actin are shown in the lower panel. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, with neonatal treatment (vehicle or iron) and adult treatment (vehicle or rapamycin) as fixed factors. Veh-Veh N =3, Veh-Rapa N = 3, Iron-Veh N =3 Iron-Rapa N = 4 rats per group. ## indicates $p < 0.01$

(significant main effect of iron treatment in the neonatal period) and ** indicates $p = 0.01$ (significant interaction)

Author contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Vanise Hallas Uberti, Betânia Souza de Freitas, Patrícia Molz, and Elke Bromberg. The first draft of the manuscript was written by Nadja Schröder and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FIGURE 1

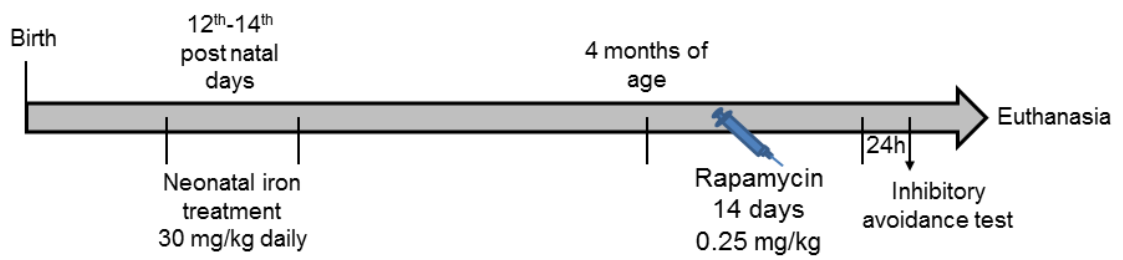


FIGURE 2

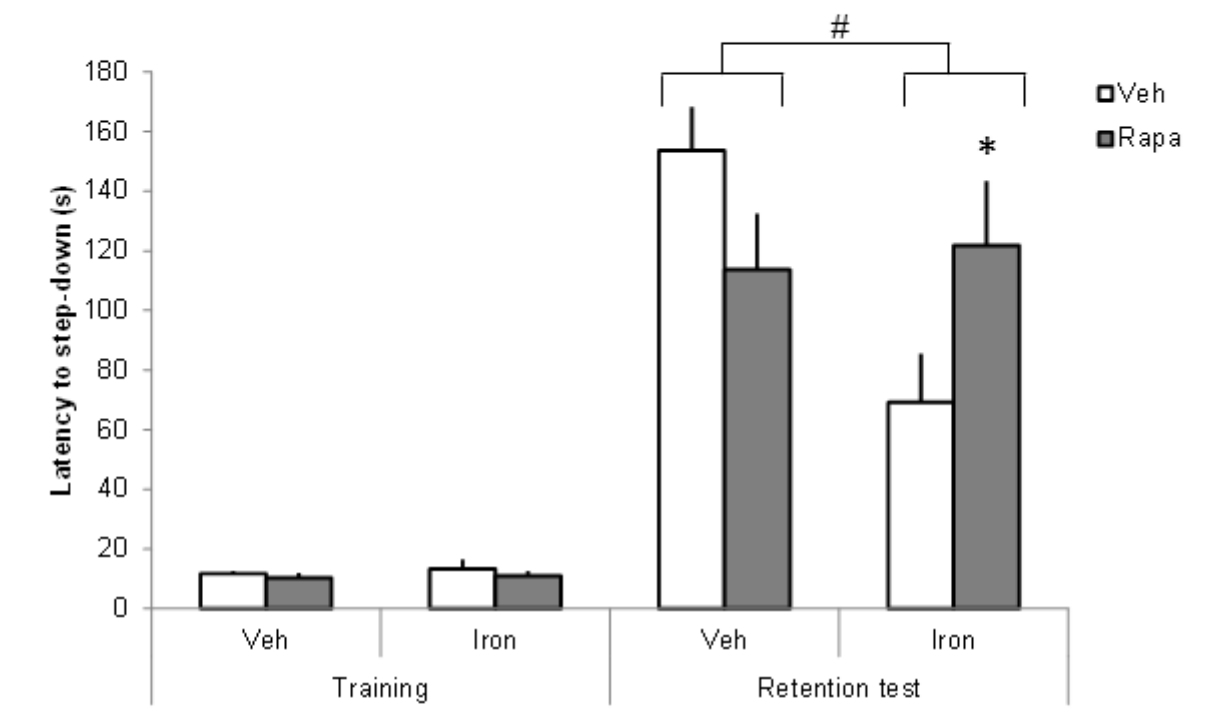


FIGURE 3

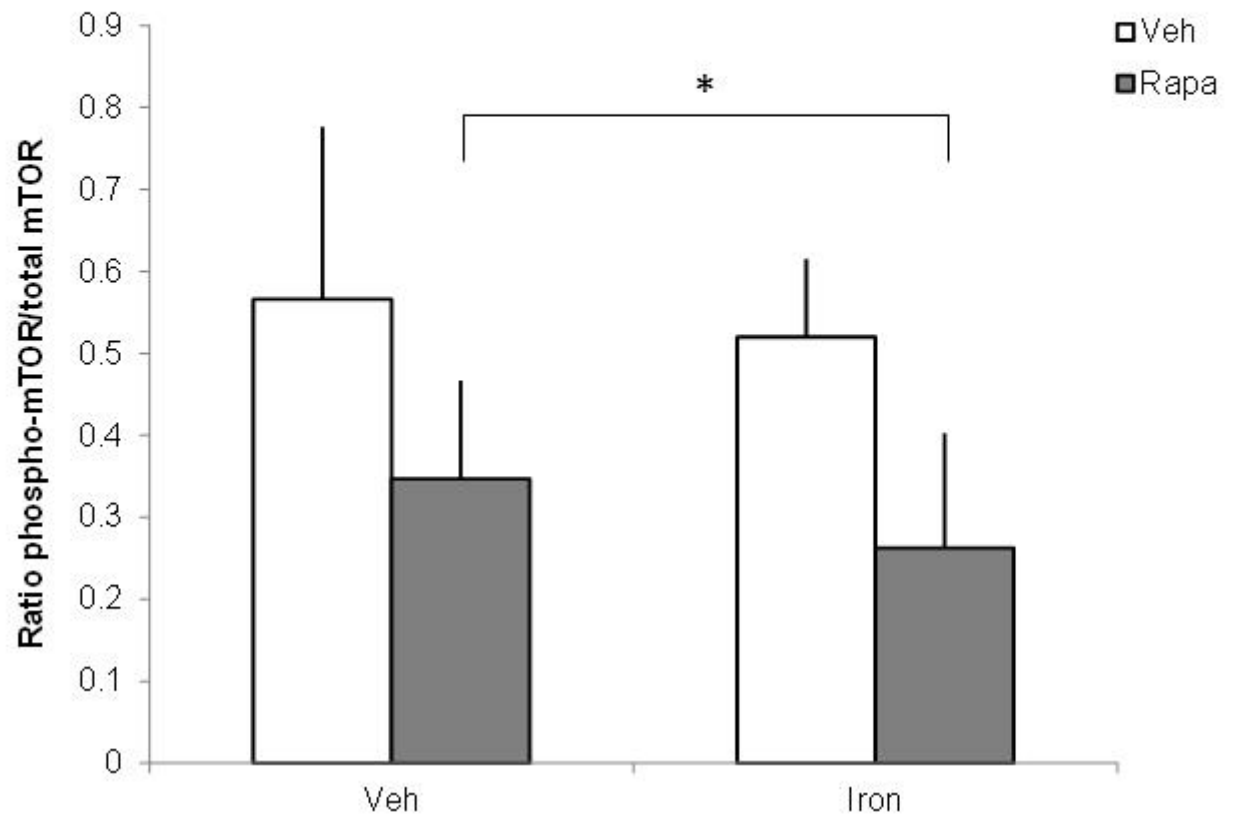


FIGURE 4

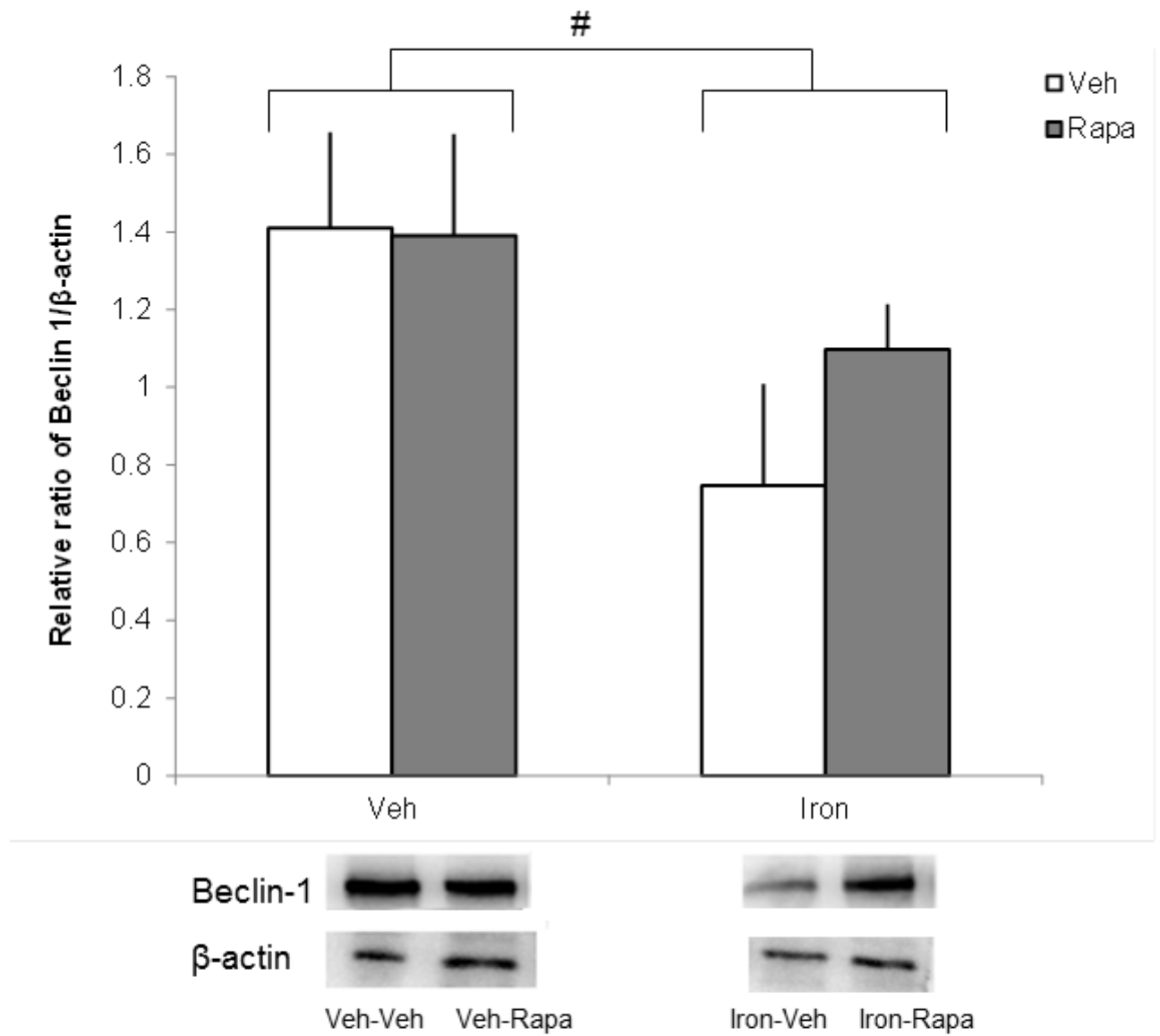
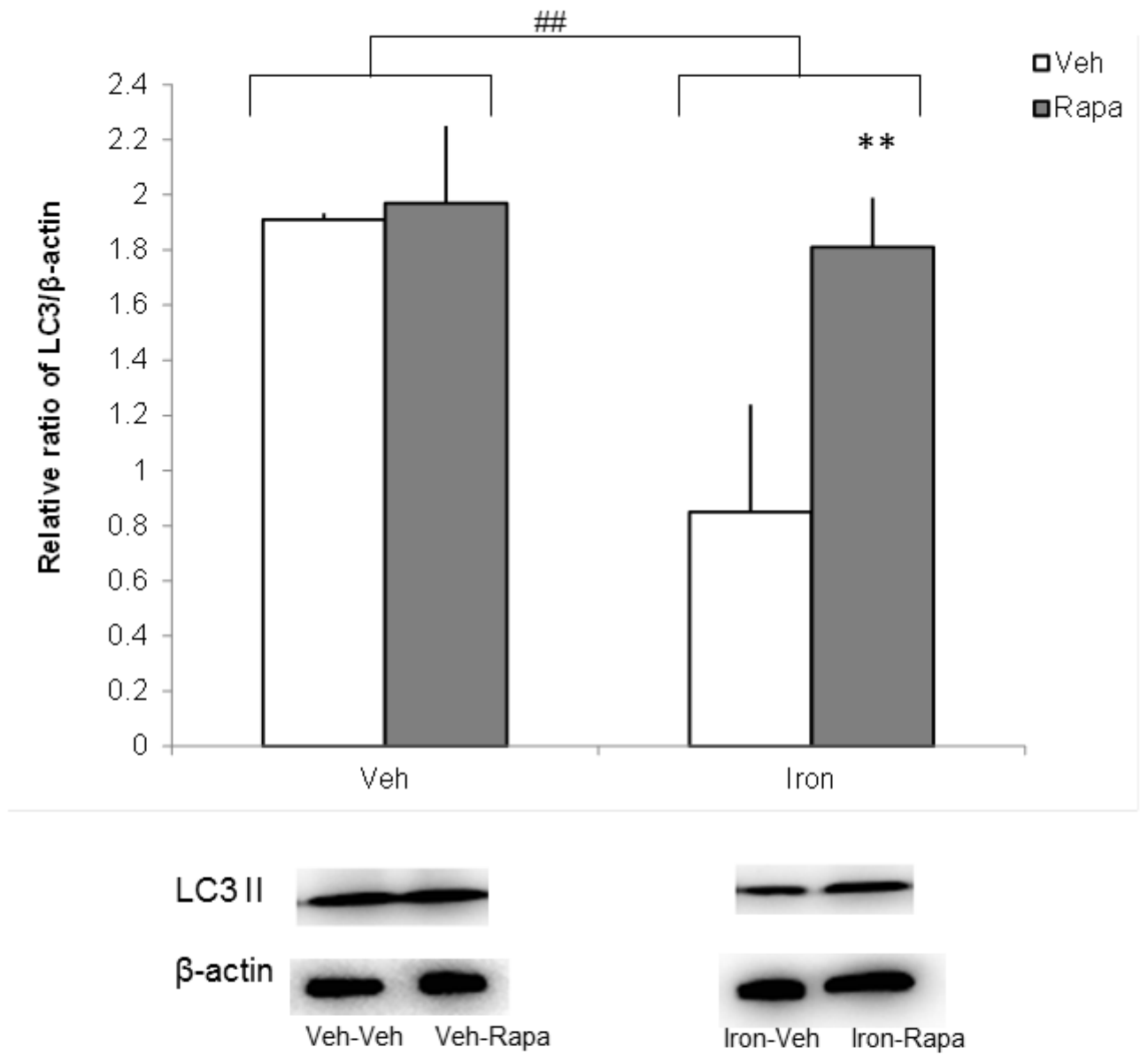


FIGURE 5



CAPÍTULO 3

3.1 CONCLUSÕES

- O tratamento neonatal com ferro ocasionou prejuízo na tarefa de memória aversiva, confirmando achados anteriores publicados por nosso grupo de pesquisa
- O tratamento crônico com rapamicina na vida adulta recuperou o prejuízo da tarefa de memória aversiva
- O tratamento neonatal com ferro ocasiona uma redução da expressão proteica de Beclina 1 no hipocampo
- O tratamento neonatal com ferro ocasiona uma redução da expressão proteica de LC3 no hipocampo
- O tratamento crônico com rapamicina restaurou a expressão proteica de LC3 no hipocampo após redução ocasionada pela administração de ferro no período neonatal

3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora inicialmente descrita apenas em condições de privação de nutrientes, nas últimas duas décadas a via autofágica tem sido extensivamente relacionada à diversas condições patológicas. Atualmente, sabe-se que é a via mais utilizada para a degradação agregados proteicos ou proteínas malformadas, condição presente na maioria das doenças neurodegenerativas (Mizushima et al., 2008). Portanto, evidências sugerem que o adequado funcionamento da via autofágica possa exercer um efeito neuroprotetor ao remover esses acúmulos tóxicos, e desse modo, contribuir para diminuição da progressão da doença (Menzies et al., 2017).

Visto que o ferro é essencial à muitos processos biológicos, se faz necessária a regulação criteriosa desse metal no organismo. (Jomova et al., 2010). Entretanto, estudos demonstram que em condição de desequilíbrio e consequente acúmulo, o ferro possa causar estresse oxidativo ao catalisar a formação de radicais hidroxila através da reação de Fenton (alteração de sua forma de cátion divalente, ou ferroso (Fe^{2+}) para o cátion trivalente, ou férrico (Fe^{3+}), gerando radicais hidroxila, OH^-) e desse modo, contribuir para doenças neurodegenerativas. (Zecca et al., 2004)

Nosso grupo desenvolveu um modelo animal já bem estabelecido de sobrecarga de ferro no período neonatal, e tem realizado consistentes estudos demonstrando que esse acúmulo ocorre em regiões cerebrais que estão afetadas nas doenças neurodegenerativas, resultando, também, em déficits cognitivos que permanecem na vida adulta. (Schröder et al., 2001; de Lima et al., 2005).

Trabalhos recentes tem demonstrado que há uma importante correlação entre a desregulação quantitativa do ferro e falhas no processo autofágico em desordens neurodegenerativas (Wan et al., 2017; Spilman et al., 2010). À luz da busca por maior compreensão sobre as origens e possíveis tratamentos para essas doenças, buscamos investigar se o acúmulo de ferro possui implicações na disfunção autofágica relacionadas à neurodegeneração, bem como determinar se a ativação farmacológica da autofagia através da rapamicina poderia melhorar os déficits de memória induzidos pelo ferro.

A rapamicina é uma droga imunossupressora aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA. Nos últimos anos, porém, a rapamicina tem recebido atenção como uma estratégia para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos em diversos modelos experimentais (Spilman et al., 2010; Caccamo et al. 2010; Berger et al., 2006), visto que a maioria dessas desordens apresentam acúmulo de proteínas. A rapamicina atua inibindo a atividade quinase da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), a qual negativamente regula a autofagia, e desse modo, dá início à cascata de sinalização para a indução autofágica (Bove et al., 2011). No entanto, ainda que diversos e crescentes estudos estejam sendo feitos, maiores informações sobre os mecanismos neuroprotetores da rapamicina são necessários.

Em nosso trabalho, nossos resultados demonstraram que o tratamento crônico com a rapamicina foi capaz de reverter e melhorar déficits de memória causados pelo acúmulo de ferro no período neonatal. Combinado a isso, ao medirmos parâmetros moleculares, foi observado que o acúmulo de ferro resultou em uma diminuição dos níveis de expressão da proteína LC3, e que a rapamicina

conseguiu aumentar sua expressão na idade adulta. Ao medirmos os níveis da proteína Beclina 1, encontramos uma diminuição decorrente do tratamento com ferro, entretanto, a rapamicina não foi capaz de reverter esses níveis.

O fato de a rapamicina não conseguir efetivamente aumentar os níveis de beclina 1 pode estar relacionado à incompleta dissociação da proteína anti-apoptótica bcl-2 da beclina, uma vez que, como já mencionado anteriormente, a ação da beclina é inibida pela ligação a essa molécula (Patingre et al., 2005). Sustenta-se essa hipótese tendo em vista que podem ter ocorrido processos apoptóticos decorrentes da sobrecarga de ferro no período neonatal, o que já foi documentado por estudos anteriores do nosso grupo (da Silva et al., 2014; 2018).

Também é possível considerar que o prejuízo autofágico decorrente da sobrecarga de ferro seria mais expressivo em uma fase tardia do evento autofágico, conforme visualizado através do aumento da proteína LC3, relacionada à formação e maturação do fagóforo e considerada um parâmetro confiável da ocorrência do processo autofágico (Menzies et al., 2017). Esse aumento não foi possível detectar pelos níveis de beclina 1, visto estar relacionada com a formação do pré-autofagossomo, ou seja, uma etapa inicial da autofagia (Patingre et al., 2005, Pan et al., 2008).

Em conclusão, esse trabalho é pioneiro ao relacionar a sobrecarga de ferro no período neonatal como uma possível causa nas disfunções da autofagia. Também se observou que a inibição da via da mTOR através do uso da rapamicina, resultando em uma indução autofágica, foi capaz de reverter os prejuízos de memória associados ao acúmulo de ferro. Ainda que mais estudos pré-clínicos e clínicos sejam necessários, espera-se que esse estudo possa

contribuir para o entendimento da relação entre o acúmulo de ferro e o processo autofágico. Além disso, estes achados suportam o uso da rapamicina como um potencial tratamento neuroprotetor para o declínio cognitivo associado a distúrbios neurodegenerativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham R.T. (2002) Identification of TOR signaling complexes: more TORC for the cell growth engine. *Cell*, 111: 9–12.

Ahmed A., Tollefsbol T. (2001) Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* 49, 1105–1109.

Alers S., Löffler A. S., Wesselborg S., Stork B. (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol.*; 32:2–11.

Alexeyev M.F., LeDoux S.P., Wilson G.L. (2004) Mitochondrial DNA and aging. *Clin Sci (Lond.)*; 107:355–64.

Alzheimer's Association. (2010) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2010; 6 (2):158–94.

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

Anderton B.H., Betts J., Blackstock W.P., Brion J.P., Chapman S., Connell J. (2001) Sites of phosphorylation in tau and factors affecting their regulation. *Biochem Soc Symp.*; (67):73 80.

Asano T., Komatsu M., Yamaguchi-Iwai Y., Ishikawa F., Mizushima N., Iwai K. (2011) Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Mol Cell Biol.* 31:2040–52.

Axe E.L., Walker S.A., Manifava M., Chandra P., Roderick H.L., Habermann A. (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*; 182:685–701.

Bachurin S., Shevtsova E., Kireeva E., Oxenkrug G., Sablin S. (2003) Mitochondria as a target for neurotoxins and neuroprotective agents. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 993:334–44.

Barth S., Glick D., Macleod K.F. (2010) Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol.*

Bartzokis G. M., Beckson D. B., Hance et al. (1997) MRI evaluation of age-related increase of brain iron on Young adult and older normal males. *Magn. Reson. Imag.* 15: 29-35.

Bartzokis G. M., Cummings S., Perlman et al. (1999) Increased basal ganglia iron levels in Huntington disease. *Arch. Neurol.* 56: 569-574.

Bates G. (2003) Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet* 361, 1642–1644.

Batista-Nascimento L., Pimentel C., Menezes R. A. et al. (2012) Iron and neurodegeneration: from cellular homeostasis to disease. *Oxid Med Cell Longev*, 128647, doi: 10.1155/2012/128647 (2012).

Batista-Nascimento L., Pimentel C., Menezes R.A., Rodrigues-Pousada C. (2012) Iron and neurodegeneration: From cellular homeostasis to disease. *Oxid Med Cell Longev*.

Berg D., Grote C., Rausch W.D., Maurer M., Wesemann W., Riederer P., et

al. (1999) Iron accumulation in the substantia nigra in rats visualized by ultrasound. *Ultrasound Med Biol*.

Berger Z., Ravikumar B., Menzies F.M., Oroz L.G., Underwood B.R., Pangalos M.N., Schmitt L., Wullner U., Evert B.O., O’Kane C.J. (2006) Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum. Mol. Genet.* 15:433–442.

Cameron B., Landreth G.E. (2010) Inflammation, microglia, and Alzheimer’s disease. *Neurobiol Dis* 37: 503–509.

Chen X., Guo C., Kong J. (2012) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 7:376-385.

Cheung Z.H. & Ip N.Y. (2011) Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases—recent advances and future perspectives, *Journal of Neurochemistry*, vol. 118, no. 3, pp. 317–325.

Chu L.W. (2012) Alzheimer’s disease: early diagnosis and treatment, *Hong Kong Medical Journal*, vol. 18, no. 3, pp. 228–237.

Cipriani G., Dolciotti C., Picchi L., Bonuccelli U. (2011) Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurological sciences: Official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*; 32(2):275–9.

Connor J.R., Menzies S.L., St Martin S.M., Mufson E.J. (1992) A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer’s diseased brains. *J Neurosci Res* 31:75–83.

Connor J.R., Pavlick G., Karli D., Menzies S.L., Palmer C. (1995) A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 355, 111-123.

Cuervo A. M. & Wong, E. (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92–104.

Da Fonseca T., Outeiro T.F. (2014) ATP13A2 and alpha-synuclein: A metal taste in autophagy. *Exp Neurol.* 23:314–323.

Da Silva, V.K., de Freitas, B.S., da Silva Dornelles, A., Garcia, R.C., Monteiro, R.T., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Schroder, N., (2018) Antiapoptotic effects of cannabidiol in an experimental model of cognitive decline induced by brain iron overload. *Transl Psychiatry* 8, 176.

Da Silva V.K., de Freitas B.S., da Silva Dornelles A., Nery L.R., Falavigna L., Ferreira R.D., Bogo M.R., Hallak J.E., Zuardi A.W., Crippa J.A., Schroder N. (2014) Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNM1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection. *Mol Neurobiol* 49(1):222–233.

Dal-Pizzol F., Klamt F., Frota J.R., Andrades M.E. et al. (2001) Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rats. *Dev. Brain Res.* 130: 109 - 114.

De Lima M.N., Dias C.P., Torres J.P., Dornelles A., Garcia V.A., Scalco F.S., Guimarães M.R., Petry R.C., Bromberg E., Constantino L., Budni P., Dal-Pizzol F., Schröder N. (2008) Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol Aging* 29 (7):1052-9.

De Lima M.N., Laranja D.C., Caldana F., Grazziotin M.M., Garcia V.A., Dal-Pizzol F., et al. (2005b) Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp Neurol* 196(1):177-83.

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

Deegan S., Saveljeva S., Gorman A. M., Samali A. (2013) Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cell Mol Life Sci.* 70:2425–2441.

Deretic V., Saitoh T., Akira S. (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 13:722–737.

Deter R.L., De Duve C. (1967) Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol*; 33:437–449.

Dexter D.T. et al. (1989) Increased nigral iron content and alteration in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52: 1830-1836.

Dice J.F. (2007) Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, v. 3, n. 4, p. 295-9, Jul-Aug. ISSN 1554-8627.

Dusek P., Roos P.M., Litwin T., Schneider S.A., Flaten T.P. & Aaseth J. (2015) The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. *Journal of trace elements in medicine and biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, 31, 193-203.

Dwork A.J., Lawler G., Zybert P.A., Durkin M., Osman M., Willson N., Barkai A. (1990) An autoradiographic study of the uptake and distribution of iron by the brain of the young rat. *Brain Res* 518, 31-39.

Ehninger D., Han S., Shilyansky C., Zhou Y., Li W., Kwiatkowski D.J., Ramesh V., Silva A.J. (2008) Reversal of learning deficits in a *Tsc2+/-* mouse model of tuberous sclerosis. *Nat. Med.* 14, 843–848.

English L., Chemali M., Duron J., Rondeau C., Laplante A., Gingras D., et al. (2009) Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol*; 10:480–487.

Eskelinen E.L. (2005) Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy* ;1:1–10.

Fagherazzi E., Garcia V., Maurmann N., Bervanger T., et al. (2012) Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. *Psychopharmacologia (Heidelberg)*, v. 219, p. 1133-1140.

Fasolo A., Sessa C., (2011) Current and future directions in mammalian target of rapamycin inhibitors development. *Expert Opin Investig Drugs* 20: 381–394.

Febbraro F., Giorgi M., Caldarola S., Loreni F., Romero-Ramos M. (2012) Alpha-Synuclein expression is modulated at the translational level by iron. *Neuroreport.* 23:576–580

Feng Y. et al. (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, v. 24, n. 1, p. 24-41, Jan. ISSN 1748-7838

Fernandez L.L., de Lima M.N., Scalco F., Vedana G., Miwa C., Hilbig A., Vianna M., Schroder N. (2011) Early post-natal iron administration induces astroglial response in the brain of adult and aged rats. *Neurotox Res* 20:193-199.

Forstl H., Zefass R., Geiger-Kabisch C., Sattel H., Besthorn C., Hentschel

- F. (1995) Brain atrophy in normal aging and Alzheimer's disease. Volumetric discrimination and clinical correlations. *Biol. Psychiatry* 29, 68–81. *Br. J. Psychiatry* 167, 739–746
- Fraga M.F., Esteller M. (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.* 23:413–418.
- Frake R. A., Ricketts T., Menzies F. M. & Rubinsztein, D. C. (2015) Autophagy and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 125, 65–74.
- Fujita N., Itoh T., Omori H., Fukuda M., Noda T., and Yoshimori T. (2008) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell* 19:2092–2100.
- Furuya N., Yu J., Byfield M., Pattingre S., Levine B. (2005) The Evolutionarily Conserved Domain of Beclin 1 is Required for Vps34 Binding, Autophagy, and Tumor Suppressor Function. *Autophagy.* 1:46–52.
- Gaasch J.A., Lockman P.R., Geldenhuys W.J., Allen D.D., Van der Schyf C.J. (2007) Brain iron toxicity: differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells. *Neurochem Res.* 32(7):1196–1208
- Galluzzi L., Pietrocola F., Levine B., Kroemer G. (2014) Metabolic control of autophagy. *Cell*, 159, 1263–1276.
- Garinis G.A. et al. (2008) DNA damage and aging: new-age ideas for an age-old problem. *Nature Cell Biology* 10: 1241-7.
- Geissler E.K., Schlitt H.J. (2010) The potential benefits of rapamycin on renal function, tolerance, fibrosis, and malignancy following transplantation. *Kidney Int* 78: 1075–1079.
- Ghavami S., Shojaei S., Yeganeh B., Aude S.R., Jangamreddy J.R., Mehrpour M., Christoffersson J., Chaabane W., Moghadam A.R., Kashani H.H., Hashemi M., Owji A.A., Łos M.J. (2014) Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 112:24–49.
- Glick D., Barth S., Macleod K.F. (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.*; 221(1):3-12.
- Gozuacik D. & Kimchi A. (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891–2906.
- Gutierrez E., Jansson P.J., Richardson D.R. (2014) The anticancer agent di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) overcomes prosurvival autophagy by two mechanisms: persistent induction of autophagosome synthesis and impairment of lysosomal integrity. *J Biol Chem*, 289: 33568–33589.
- Haack T.B., Hogarth P., Kruer M.C., et al. (2012) Exome sequencing reveals de novo WDR45 mutations causing phenotypically distinct, X-linked dominant form of NBIA. *Am J Hum Genet.* 91:1144–1149.
- Hagen T.M., Yowe D.L., Bartholomew J.C., Wehr C.M., Do K.L., Park J.Y., Ames B.N. (1997) Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci USA.* ;94:3064–3069.
- Hara T., Nakamura K., Matsui M., Yamamoto A., Nakahara Y., Suzuki-Migishima R., Yokoyama M., Mishima K., Saito L., Okano H., et al. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441, 885–889.
- Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300.

Harman D. (1972) The biologic clock: The mitochondria? *J Am Geriatr Soc*;20:145-147.

Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475:324–332.

Hayflick S.J., Kruer M.C., Gregory A., et al. (2013) Beta-propeller protein-associated neurodegeneration: a new X-linked dominant disorder with brain iron accumulation. *Brain* 136:1708–1717.

Heitman J., Movva N. R., Hall M. N. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905–909.

Hosokawa N., Hara T., Kaizuka T., Kishi C., Takamura A., Miura Y. et al. (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol. Cell.* 20:1981–1991.

Huang X., Atwood C. S., Hartshorn M. A., Multhaup G., Goldstein L. E., Scarpa R. C., et al. (1999). The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 38, 7609–7616.

Hultcrantz R., Glaumann H. (1987) Intracellular fate of ferritin in HeLa cells following microinjection. *Exp Cell Res*, 171: 203–212.

Jiang H., Luan Z., Wang J., Xie J. (2006) Neuroprotective effects of iron chelator Desferal on dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats with iron-overload. *Neurochem Int* 49:605–609.

Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., Valko M. (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 345:91-104.

Kabaya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Komami E., Ohsumi Y., Yoshimori T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19:5720–5728.

Karlsson M., Frennesson C., Gustafsson T., Brunk U.T., Nilsson S., Kurz T. (2013) Autophagy of iron-binding proteins may contribute to the oxidative stress resistance of ARPE-19 cells. *Exp Eye Res*, 116: 359–365.

Kaur J. & Debnath J. (2015) Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16, 461–472.

Kidane T.Z., Sauble E., Linder M.C. (2006) Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291: C445–C455.

Kim J., Kundu M., Viollet B., Guan K.-L. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 13:132–141

Kirstein J., Morito D., Kakhana T., Sugihara M., Minnen A. et al. (2015) Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments. *EMBO J.* 34:2334–49.

Klionsky DJ. (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:931–937.

Klionsky D.J., Emr S.D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717–1721.

Komatsu M., Waguri S., Chiba T., Murata S., Iwata J., Tanida I. et al. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 441:880–884.

Krishan S. et al. (2015) Iron metabolism and autophagy: a poorly explored relationship that has important consequences for health and disease. *Nagoya*

journal of medical science. 77(1-2): 1–6.

Kuma A., Hatano M., Matsui M., Yamamoto A., Nakaya H., Yoshimori T. et al. (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 432:1032–6.

Kumar A., Singh A., Ekavali (2015) A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep*. 67(2):195–203.

Kurz T., Eaton J.W., Brunk U.T. (2011) The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *Int J Biochem Cell Biol*, 43: 1686–1697.

Kurz T., Gustafsson B., Brunk U.T. (2011) Cell sensitivity to oxidative stress is influenced by ferritin autophagy. *Free Radic Biol Med*, 50: 1647–1658.

Kurz T., Terman A., Gustafsson B., Brunk U.T. (2008) Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem. Cell Biol*. 129:389–406.

Laplante M., Sabatini D.M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 149(2):274–293.

Laplante M., Sabatini D.M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274–293.

Li W., Li J., & Bao, J.K. (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci*. 69, 1125–1136.

Lloyd D., Aon M.A., Cortassa S. (2001) Why homeodynamics, not homeostasis? *Scientific World Journal*. ;1:133–45.

Lopes K.O., Sparks D.L., Streit W.J. (2008) Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity, *Glia* 56 (10) 1048–1060.

Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. (2007) Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:741–752.

Mantyh P.W., Ghilardi J.R., Rogers S., DeMaster E., Allen C.J., Stimson E.R., Maggio J.E (1993) Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *J Neurochem* 61:1171–1174.

McGreer P.L., McGreer E.G. (2007) NSAIDs and Alzheimer's disease: epidemiological, animal, model and clinical studies. *Neurobiology of Aging*;28(5):639–47.

Meijer A.J., Codogno P. (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2445-2462.

Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, Füllgrabe J, Jackson A, Jimenez Sanchez M, Karabiyik C, Licitra F, Lopez Ramirez A, Pavel M, Puri C, Renna M, Ricketts T, Schlotawa L, Vicinanza M, Won H, Zhu Y, Skidmore J, Rubinsztein DC (2017) Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* 93(5):1015-1034.

Milic S., Mikolasevic I., Orlic L., Devcic E., Starcevic-Cizmarevic N., Stimac D. et al. (2016) The role of iron and iron overload in chronic liver disease. *Med Sci Monit*. 22:2144–51.

Miwa C.P., de Lima M.N., Scalco F., Vedana G., Mattos R., Fernandez L.L., Hilbig A., Schröder N., Vianna M.R. (2011) Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. *Neurotox Res* 19(4):527-35.

Mizushima N. (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev*;21:2861–2873.

Mizushima N., Klionsky D.J. (2007) Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Ann Rev Nutr* 27:19–40.

Mizushima N., Levine B., Cuervo A. M. & Klionsky D. J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075.

Mizushima N., Noda T., Yoshimori T., Tanaka Y., Ishii T., George M.D., Klionsky D.J., Ohsumi M., Ohsumi Y. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395:395–398.

Moos T., Morgan E.H. (2004) The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review. *Ann N Y Acad Sci.* 1012:14–26.

Moreira P.I., Santos M.S., Oliveira C.R. (2007) Alzheimer's disease: a lesson from mitochondrial dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 9:1621–1630.

Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., and Wooten, M.W. (2007) Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem. Sci.* 32: 95–100.

Mrak R. E., Griffin S. T. & Graham D. I. (1997) Aging-associated changes in human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 1269–1275.

Nakatogawa H., Suzuki K., Kamada Y., Ohsumi Y. (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:458–467.

Nakatogawa H., Ichimura Y., Ohsumi Y. (2007) Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130:165–178.

Nazio F., Strappazzon F., Antonioli M., Bielli P., Cianfanelli V., Bordi M. et al. (2013) mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol.* 15:406–416,

Netea-Maier R. T., Plantinga T. S., Van De Veerdonk F. L., Smit J. W. & Netea M. G. (2015) Modulation of inflammation by autophagy: consequences for human disease. *Autophagy* 12, 1–16.

Nixon R.A. (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci.* 120:4081–4091.

Nixon R.A. (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature Med.* 19, 983–987.

Nixon R.A., Cataldo A.M., Mathews P.M. (2000) The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res.* 25:1161–1172.

Nixon R.A., Wegiel J., Kumar A., Yu W.H., Peterhoff C., Cataldo A., Cuervo A.M. (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64:113–122.

Noda T., Ohsumi Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem;*273:3963–6.

Nowikovsky K., Devenish R. J., Froschauer E. & Schweyen R. J. (2009) Determination of yeast mitochondrial KHE activity, osmotic swelling and mitophagy. *Methods Enzymol.* 457, 305–317.

Nussbaum R.L. & Ellis C.E. (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 348, 1356–1364.

Ohsumi Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*2:211–216.

Ostrerova-Golts N, Petrucelli L, Hardy J, Lee JM, Farer M, Wolozin B.

(2000) The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *J Neurosci* 20:6048–54.

P. Dusek, T. Litwin, A. Czlonkowska, Wilson (2015) Disease and other neurodegenerations with metal accumulations, *Neurol. Clin.* 33 (1) 175–204.

Pan T., Kondo S., Zhu W., Xie W., Jankovic J., Le W. (2008) Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. *Neurobiology of Disease*. 32(1):16–25

Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang XH., Mizushima N., et al. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 122:927- 39;

Phippen B., Horvath C., Nordin R., Nagpal N. (2008) Ambient water quality guidelines for iron: overview; Ministry of Environment Province of British Columbia.

Pickford F., Masliah E., Britschgi M., Lucin K., Narasimhan R., Jaeger P.A., Small S., Spencer B., Rockenstein E., Levine B., Wyss-Coray T. (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 2190–2199.

Pullarkat V., Meng Z., Donohue C., Yamamoto V.N., Tomassetti S., Bhatia R., Krishnan A., Forman S.J., Synold T.W. (2014) Iron chelators induce autophagic cell death in multiple myeloma cells. *Leuk Res*, 38: 988–996.

Railey A.M., Groeber C.M., Flinn J.M. (2011) The effect of metals on spatial memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 24, 375-381.

Ravikumar B. et al. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 36, 585–595.

Ravikumar B., Sarkar S., Berger Z., Rubinsztein D.C. (2003) The roles of the ubiquitin–proteasome and autophagy–lysosome pathways in Huntington's disease and related conditions. *Clin. Neurosci. Res.*, 3, 141–148.

Rech R.L., de Lima M.N., Dornelles A., Garcia V.A., Alcalde L.Z., Vedana G., Schroder N. (2010) Reversal of age-associated memory impairment by rosuvastatin in rats. *Exp Gerontol* 45, 351-356.

Reynolds C.H., Van Slegtenhorst M. (2001) Sites of phosphorylation in tau and factors affecting their regulation. *Biochem. Soc. Symp.* 73–80.

Ross C.A. & Pickart C. (2004) The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol.*

Ross C.A., Poirier M.A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 10:S10–S17.

Rubinsztein D. C., Marino G. & Kroemer G. (2011) Autophagy and aging. *Cell* 146, 682–695.

Rubinsztein D.C., Bento C.F., Deretic V. (2015) Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases. *J. Exp. Med.* 212:979–90.

Santambrogio L., Cuervo A.M. (2011) Chasing the elusive mammalian microautophagy. *Autophagy*. 7(6):652–4.

Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictorTOR complex. *Science* 307:1098-1101.

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

Sedelnikova O.A., Horikawa I., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Bonner W.M., Barrett J.C. (2004) Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 6:168–170.

Selkoe D.J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298: 789–791. 298: 789–791.

Sengstock G.J., Olanow C.W., Menzies R.A., Dunn A.J., Arendash G.W. (1993) Infusion of iron into the rat substantia nigra: nigral pathology and dose-dependent loss of striatal dopaminergic markers. *J Neurosci Res.* 35(1):67-82.

Sharp P., Srai S.K. (2007) Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroenterol.* 13(35):4716–24.

Shen H.M., Mizushima N. (2014) At the end of the autophagic road: An emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem. Sci.*, 39, 61–71.

Sofic E., Riederer P., Heinsen H. et al. (1988) Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm.* 74:199-205.

Sperling R. (2007) Functional MRI studies of associative encoding in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1097:146–155.

Spilman P., Podlitskaya N. , Hart M.J., Debnath J., Gorostiza O., Bredesen D. et al. (2010) Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 5: e9979.

Sridhar S., Botbol Y., Macian F., Cuervo A.M. (2012) Autophagy and disease: always two sides to a problem. *J Pathol* 226(2):255–73.10.1002.

Stohs S.J., Bagchi D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 18:321–336.

Stolz A, Ernst A, Dikic I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* 16:495–501

Sun X.T., Jin L., Ling P.X. (2012) Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug Discov Ther.* Dec;6(6):285-90.

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

Taylor J.P., Hardy J. & Fischbeck K.H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296, 1991–1995.

Terman A., Gustafsson B., Brunk U.T. (2007) Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol.* 211:134–43.

Todde V. et al. (2009) Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1792:3–13.

Tosato M., Zamboni V., Ferrini A., Cesari M. (2007) The aging process and potential interventions to extend life expectancy, *Clin Interv Aging*, vol. 2 (pg. 401-412).

Tsang C. K., Qi H., Liu L. F., Zheng X. F. (2007) Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov. Today* 12, 112–124.

Tsukada M. & Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of

autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169–174.

Tsukada T., Tomooka Y., Takai S. et al. (1993) Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene.* 8:3313–22.

Usenovic M., Tresse E., Mazzulli J.R., Taylor J.P., Krainc D. (2012) Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, α -synuclein accumulation, and neurotoxicity. *J Neurosci.* 32:4240–4246.

Uttara B., Singh A.V., Zamboni P., Mahajan R.T. (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 7:65–74.

Valko M., Morris H., Cronin M. T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161–1208.

Vezina C., Kudelski A., Sehgal S.N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28: 721–726.

Vingtdeux V., Davies P., Dickson D.W., Marambaud P. (2011) AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta Neuropathol.* 121:337–349.

Wallis L.I., Paley M.N., Graham J.M., Grunewald R.A., Wignall E.L., Joy H.M. et al. (2008) MRI assessment of basal ganglia iron deposition in Parkinson's disease. *J Magn Reson Imaging.*

Wan W., Jin L., Wang Z., Wang L., Fei G., Ye F. et al. (2017) Iron deposition leads to neuronal alpha-synuclein pathology by inducing autophagy dysfunction. *Front Neurol*, 8: 1.

Wang, L., Ye, X., Zhao, T., (2019) The physiological roles of autophagy in the mammalian life cycle. *Biol. Rev.* 94, pp. 503 – 516

Wirth M., Joachim J., Tooze S. A. (2013) Autophagosome formation—the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Seminars in Cancer Biology.* 23(5):301–309.

Xie Z., Klionsky D.J. (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* ;9:1102–1109.

Yang D.S., Stavrides P., Mohan P.S., Kaushik S., Kumar A. et al. (2011a) Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain.* 134:258–277.

Yang D.S., Stavrides P., Mohan P.S., Kaushik S., Kumar A. et al. (2011b) Therapeutic effects of remediating autophagy failure in a mouse model of Alzheimer disease by enhancing lysosomal proteolysis. *Autophagy.* 7:788–789.

Yla-Anttila P., Vihinen H., Jokitalo E., Eskelinen E.L. (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 5:1180–1185.

Yu W.H., Cuervo A.M., Kumar A., Peterhoff C.M., Schmidt S.D., Lee J-H., Mohan P.S., Mercken M., Farmery M.R., Tjernberg L.O. et al. (2005) Macroautophagy -- a novel β -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol.* 171:87–98.

Zecca L., Youdim M.B., Riederer P., Connor J.R., Crichton R.R. (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reiview Neuroscience.* 5(11):863.

Zheng & Monnot (2012) Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: Implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacology and Therapeutics*. 2012;133:177–88.

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 8469

Porto Alegre, 17 de maio de 2018

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Efeito Da indução Autofágica Em Um Modelo Animal De Disfunção Cognitiva Induzido Pela Sobrecarga De Ferro No Período Neonatal" coordenado por ELKE BROMBERG

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

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

Duração do Projeto: 17/05/2018 - 17/05/2020

Nº de Animais	Espécie
17	Ratos
Total de Animais: 17	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

ANEXO 2 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

MOLN-D-19-00668 -Acknowledgement of Receipt

De: "Molecular Neurobiology" <em@editorialmanager.com>

Para:
Nadja Schröder <nadja_s@terra.com.br>

Data: Qua 19/06/19 11:54

19 Jun 2019

Dear Dr. Schröder:

This is to acknowledge receipt of your manuscript titled "Iron overload impairs autophagy: effects of Rapamycin in ameliorating iron-related memory deficits." Your manuscript number will be sent to you in a second email.

The submission id is: MOLN-D-19-00668
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

Your username is: nadja_s@terra.com.br
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/moln/>.

Thank you very much for your contribution.

Sincerely,
Zevie Davis , MS for
Nicolas G. Bazan, M.D., Ph.D.
Editor in Chief, Molecular Neurobiology

P.S.: If your manuscript is accepted for publication in Molecular Neurobiology, you may wish to have it published with open access in our Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>.

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding. Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springemature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/moln/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.