

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

Clívia Pazin Miwa

**Efeito do tratamento neonatal com ferro e do envelhecimento sobre
as proteínas Par-4 e Caspase-3 em estruturas cerebrais de ratos**

Porto Alegre
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CLÍVIA PAZIN MIWA

**Efeito do tratamento neonatal com ferro e do envelhecimento sobre
as proteínas Par-4 e Caspase-3 em estruturas cerebrais de ratos**

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.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mônica Ryff Moreira Roca Vianna

Porto Alegre
2010

AGRADECIMENTOS

À Profª Mônica Vianna, por sua orientação, ensinamentos, dedicação e incentivo. Muito obrigada.

À Profª Nadja Schröder, por sua co-orientação e incentivo, possibilitando o primeiro trabalho em conjunto com a Drª Mônica.

Ao meu pai, Roberto, por ter proporcionado meus estudos.

À minha mãe, Wanda, e ao meu irmão, Fábio, por sempre terem acreditado em mim, mesmo quando eu não acreditava mais.

Ao Diego, por ser uma pessoa paciente, me dando todo apoio nos momentos difíceis. Muito obrigada.

À colega de Pós-Graduação Liana Fernandez.

Às colegas e amigas de jornada, Gabriela Carvalho e Marialice Soares, pelas horas de estudo e aprendizado, pela descontração, apoio e carinho. Obrigada meninas!

À Raquel Mattos, pelo seu profissionalismo excelente, pela amizade e por sempre ajudar quando achamos que tudo está perdido.

Às técnicas Terezinha Stein e Rosalva Meuer pelos seus ensinamentos.

RESUMO

O processo de envelhecimento é caracterizado por alterações morfológicas e fisiológicas ao longo do tempo. No cérebro, este processo é marcado por alterações estruturais e funcionais levando a disfunção e ao declínio cognitivo. Nos mamíferos o ferro é encontrado em diversas áreas do cérebro, sendo essencial em muitos processos bioquímicos que são importantes no desenvolvimento e manutenção das funções neurobiológicas normais. Estudos revelam que há aumento do conteúdo de ferro tanto em cérebros de ratos velhos como em humanos idosos quando comparados com indivíduos jovens, indicando que durante o processo de envelhecimento existe um desequilíbrio no metabolismo desse metal. Com o avanço da idade, há aumento da morte celular programada que está relacionada a desordens neurológicas. A apoptose envolve cascatas de sinalização que são ativadas em diversas situações. Dentre as proteases envolvidas, a Par-4 e caspase-3 apresentam importante papel na sinalização apoptótica. Par-4 foi primeiramente identificada entre genes pró-apoptóticos ativados em resposta a insultos às células cancerosas na próstata. A caspase executora caspase-3, pertence a família de enzimas proteolíticas com resíduo cisteína no seu sítio catalítico que cliva proteínas em resíduos aspartato. Esta protease é importante no controle da apoptose no tecido nervoso responsável pela transdução e execução dos sinais de morte. Devido à carência de estudos que relacionem as proteínas pró-apoptóticas Par-4 e caspase-3 em modelos de neurodegeneração incluindo a ausência de trabalhos que relacionem estas proteases com estudos sobre os efeitos do ferro no sistema nervoso, este trabalho teve como objetivo avaliar alterações destas proteínas nas regiões do hipocampo, estriado e córtex de ratos adultos (3 meses) e idosos (24 meses) controles ou tratados com ferro durante o período neonatal através de imunohistoquímica. Para tanto, os animais controles foram tratados com dose oral diária de 5% sorbitol em água e os animais experimentais com 10 mg Fe^{2+}/kg de peso corporal do 12º ao 14º dia de vida pós-natal. Os resultados obtidos mostram aumento da imunorreatividade de ambas proteínas nas regiões CA1, CA3 e córtex ao longo do envelhecimento normal. Imunorreatividade de Par-4 mostrou significativo aumento nas regiões CA1, CA3, DG e córtex nos animais adultos tratados com ferro e significativa diminuição nos animais velhos tratados com ferro em relação aos seus respectivos controles. Imunorreatividade de caspase-3 mostrou significativo aumento nas regiões CA1, CA3 e córtex nos animais adultos tratados com ferro e significativa diminuição nos animais velhos tratados com ferro. Não houve diferença significativa no estriado para ambas proteínas. Os resultados indicam que a sobrecarga de ferro no período neonatal ocasiona maior apoptose na fase adulta, aumentando as chances de desenvolvimento de desordens neurológicas.

Palavras-chaves: ferro – apoptose - Par-4 - caspase-3 - envelhecimento

ABSTRACT

The aging process is characterized by morphological and physiological changes over time. In the brain, this process is marked by structural and functional alterations leading to dysfunction and cognitive decline. In mammals, iron is found in several areas of the brain, is essential in many biochemical processes that are important in the development and maintenance of normal neurobiological functions. Studies show that there is an increase of iron existing in both the brains of aged rats and elderly humans compared with young subjects, indicating that during the aging process there is an imbalance in the metabolism of this metal. With advancing age, there is an increase of programmed cell death that is related to neurological disorders. Apoptosis involves signaling cascades that are activated in different situations. Among the proteases involved, the Par-4 and caspase-3 play an important role in apoptotic signaling. Par-4 was the first identified between pro-apoptotic genes activated in response to insults to cancer cells in the prostate. The executioner caspase-3, belongs to the family of proteolytic enzymes with cysteine residue in its catalytic site that cleaves proteins at aspartate residues. This protease is important about control of apoptosis in neural tissue responsible for the transduction and execution of the signs of death. Due to lack of studies that relate the protein Par-4 and caspase-3 in neurodegeneration's models including a shortage of studies that relate these proteases with studies on the effects of iron in the nervous system, the goal of this study was evaluate changes of these proteins in regions of the hippocampus, striatum and cortex of adult rats (3 months) and aged rats (24 months) controls or treated with iron during the neonatal period by immunohistochemistry. Therefore, the control animals were treated with orally daily dose of 5% sorbitol in water and the experimental group with 10 mg Fe²⁺ / kg body weight of 12 to 14 days of postnatal life. The results show increased immunoreactivity of both proteins in CA1, CA3 and cortex regions during normal aging. Par-4 immunoreactivity showed a significant increase in the CA1, CA3, DG and cortex regions in adult iron-treated animals and a significant decrease in aged iron-treated animals in relation to their respective controls. Caspase-3 immunoreactivity showed a significant increase in the CA1, CA3 and cortex regions in adult iron-treated animals and a significant decrease in aged iron-treated animals. There was no significant difference in the striatum for both proteins. Our results indicate that iron overload in the neonatal period leads to increased apoptosis in adulthood, increasing the chances of developing neurological disorders.

Keywords: iron – apoptosis - Par-4 - caspase-3 - aging

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 – Processo de envelhecimento.....	8
1.2 – Ferro no sistema nervoso central (SNC).....	9
1.3– Apoptose	11
1.3.1 – Par-4.....	12
1.3.2 – Caspases / Caspase-3	15
2 OBJETIVOS	21
2.1– Objetivo Geral	21
2.2– Objetivos Específicos.....	21
CAPÍTULO 2	23
CAPÍTULO 3	33
REFERÊNCIAS	36

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO

1.1 – Processo de envelhecimento

O processo biológico pelo qual ocorrem as alterações das características morfológicas e fisiológicas no organismo vivo ao longo do tempo é conhecido como envelhecimento. As características desse processo incluem a perda gradativa das funções biológicas, aumento da probabilidade de morte e/ou estão associadas com patologias. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que após a idade reprodutiva, a perda da função celular e a quantidade de células de um organismo são progressivamente diminuídas com o passar dos anos (Harper, 1982). No caso dos humanos, essas alterações trazem consigo reflexos no comportamento, habilidade intelectual e capacidade física no cumprimento das atividades diárias (Kluger *et al.*, 1997). Entre as variáveis externas que afetam o envelhecimento, talvez a mais importante seja a nutrição (Harper, 1982; Joseph *et al.*, 1983; Bartus, 1990; Kluger *et al.*, 1997; Shukitt-Hale *et al.*, 1998; Joseph *et al.*, 2000). Numerosos estudos mostram que em diferentes modelos animais, o consumo de suplementos antioxidantes e a restrição de dieta retardam déficits comportamentais observados durante o envelhecimento (Dubey *et al.*, 1996; Eastwood, 1999; Greenwood & Winocur, 1999; Masoro, 2000; Casadesus *et al.*, 2002). Porém, há controvérsias sobre o uso de suplementos ricos em ferro durante o período neonatal que podem acarretar no surgimento de desordens neurológicas na fase adulta (Fomon *et al.*, 2000; Rao & Georgieff, 2007).

O aumento na expectativa de vida é um fenômeno que vem se manifestando de forma crescente em escala mundial (Ricklefs & Finch, 1995; Arking, 1998). Essa mudança no padrão de distribuição etária da população ocasionou maior prevalência de doenças associadas ao envelhecimento. A Figura 1 ilustra em nível mundial, a evolução da expectativa de vida ao nascer da população.

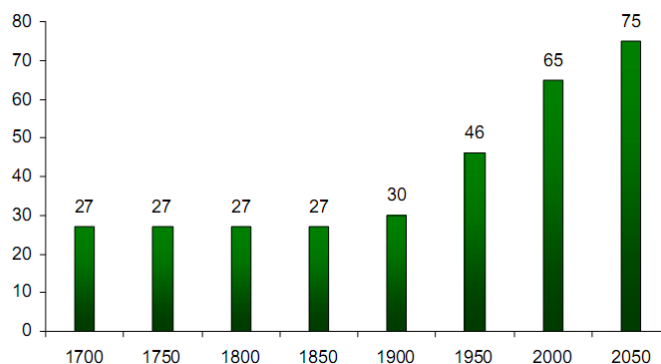


Figura 1 - Evolução da expectativa de vida mundial (1700 – 2050).
Fonte: Lee, RD (2003, p. 167).

O envelhecimento do cérebro é um processo caracterizado por alterações estruturais e funcionais levando a disfunção e ao declínio cognitivo. Durante a fase de envelhecimento o surgimento de patologias como doença de Parkinson (DP) e doença de Alzheimer (DA) (Ricklefs & Finch, 1995; Arking, 1998; Maccione *et al.*, 2001) é frequente. Em pacientes com DP é observada profunda disfunção motora devido à degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra. A causa da DP ainda é desconhecida, porém, o aumento do estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial em neurônios de dopamina são características principais da doença (Jenner & Olanow, 1998). Já a DA é caracterizada pelo progressivo declínio cognitivo e distúrbios emocionais que são fortemente relacionados com a degeneração sináptica e morte dos neurônios nas estruturas límbicas (hipocampo e amígdala) e regiões associadas ao córtex cerebral (Cummings *et al.*, 1998). Portanto, as doenças neurodegenerativas são desordens progressivas típicas do envelhecimento que afetam determinadas populações neuronais do sistema nervoso central, levando à morte neuronal e à ruptura de circuitos neurais.

1.2 – Ferro no sistema nervoso central (SNC)

Nos mamíferos o ferro é encontrado em diversas áreas do cérebro (Hill & Switzer, 1984), sendo essencial em muitos processos bioquímicos que são importantes no desenvolvimento e manutenção das funções neurobiológicas normais (Hill & Switzer, 1984; Andrews, 2002).

Atualmente, tem-se sugerido a relação da disfunção nas vias de homeostase do ferro e a patogênese de doenças neurodegenerativas (Martin *et al.*, 1998) caracterizado pelo aumento do estresse oxidativo que medeia a morte celular e o prejuízo cognitivo associado ao envelhecimento (Dexter *et al.*, 1989; Butterfield *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Mattson, 2004; Mecocci *et al.*, 2004).

O acúmulo de ferro no cérebro tem sido associado à doença de Parkinson (DP) e doença de Alzheimer (DA) (Dexter *et al.*, 1991; Kienzl *et al.*, 1995). A substância negra é a região com maior depósito desse metal em portadores de DP, acredita-se que essa é a região cerebral mais afetada pela perda neuronal (Dexter *et al.*, 1991; Hirsch *et al.*, 1992; Jellinger *et al.*, 1993; Kienzl *et al.*, 1995; Ebaldi *et al.*, 1996; Griffiths *et al.*, 1999). Depósitos de ferro também têm sido encontrados no núcleo caudado de indivíduos com a doença de Huntington (Bartzokis *et al.*, 1999) e ao redor das placas senis de pacientes com DA (Lynch *et al.*, 2000; Falangola *et al.*, 2005).

Estudos revelam que há aumento do conteúdo de ferro tanto em cérebros de ratos velhos como em humanos idosos quando comparados com indivíduos jovens, indicando que durante o processo de envelhecimento existe um desequilíbrio no metabolismo desse metal (Zecca *et al.*, 2001).

Fredriksson e colaboradores demonstraram pela primeira vez em estudos utilizando camundongos e ratos, que o tratamento sistêmico com ferro durante o período de rápido desenvolvimento cerebral (período que vai, em humanos, desde o último trimestre de gravidez até um ano de vida) produz acúmulo de ferro nos gânglios da base, além de causar disfunções neurocomportamentais (Fredriksson *et al.*, 1999). Os ratos tratados com ferro do 10º ao 12º dia de vida pós-natal apresentam hipoatividade motora, bem como déficits no aprendizado e memória em duas tarefas comportamentais, o labirinto radial de oito braços e a esQUIVA inibitória (Fredriksson *et al.*, 1999; Schröder *et al.*, 2001). Em estudo recente, verificou-se que a memória de reconhecimento também está prejudicada em ratos tratados no período neonatal com ferro (de Lima *et al.*, 2005).

Evidências do envolvimento do metabolismo anormal do ferro em diversas patologias relacionadas ao SNC têm promovido um grande esforço dos pesquisadores na tentativa de entender os mecanismos que participam da distribuição desse elemento no encéfalo (Taylor & Morgan, 1990). À medida que esses estudos avançam, é marcante o impacto do conteúdo de ferro

da dieta alimentar sobre o metabolismo desse metal no SNC. O período neonatal é crítico para o estabelecimento do conteúdo de ferro cerebral nos adultos, tornando-se importante estudar os possíveis efeitos tóxicos da sobrecarga desse metal nessa fase (Taylor & Morgan, 1990; Taylor *et al.*, 1991; Benkovic & Connor, 1993).

1.3– Apoptose

Apoptose é um exemplo de morte celular programada que envolve a regulação por cascatas de sinalização que são ativadas em diversas situações. A indução e execução da apoptose requer cooperação de várias moléculas, incluindo moléculas de sinalização, receptores, enzimas e proteínas reguladoras de genes (Launay *et al.*, 2005). O princípio do processo de apoptose pode acontecer por uma via extrínseca, onde é necessário um sinal externo que se ligará ao receptor localizado na superfície celular, ou intrínseca, que requer fatores endógenos conhecidos como “sinais de estresse” (danos ao DNA) provenientes do interior da própria célula. A Figura 2 mostra esquematicamente a cascata intracelular quando há um sinal que levará a célula a morte.

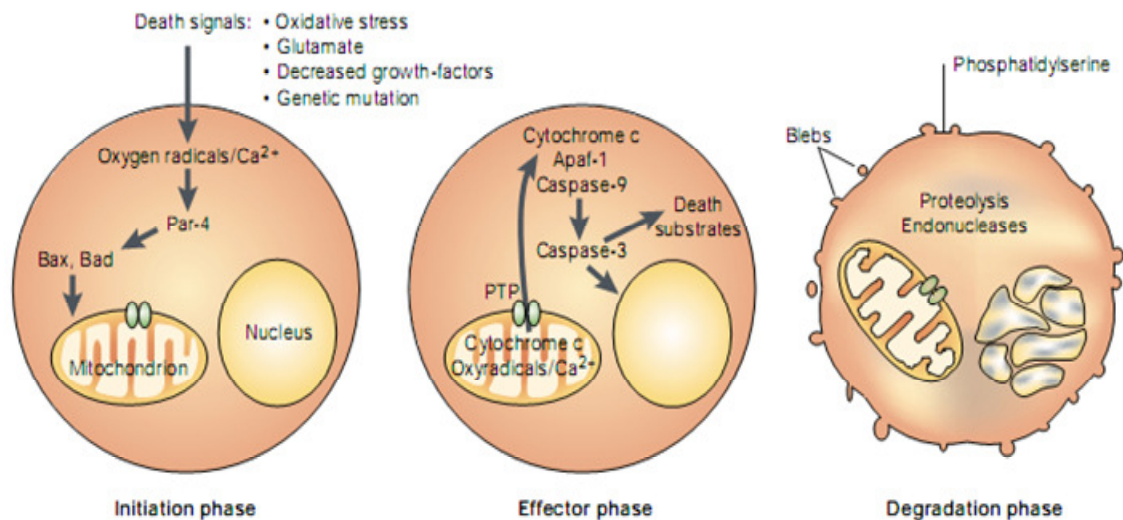


Figura 2 – Características morfológicas e bioquímicas da apoptose.
Fonte: Mattson, MP (2000, p. 120)

O processo de apoptose pode ser modulado em várias situações e dificuldades na regulação dos sinais relacionados com a indução da morte celular e estão associados a uma série de doenças. A resistência das células a morte é associada a muitos tipos de câncer e, a identificação de alterações moleculares responsáveis pela imortalização dessas células é importante para pesquisas nesta área (Wyllie, 1997).

Apoptose também está relacionada a desordens neurológicas que tem como característica central a morte neuronal (Stennicke & Salvesen, 1998; Mattson, 2000). Em contraste ao rápido *turnover* de células em tecidos proliferativos, os neurônios comumente sobrevivem durante o tempo de vida do organismo. Esta característica é necessária para a manutenção da função dessas células dentro do circuito neuronal. Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico, muitos neurônios sofrem apoptose durante a fase de sinaptogênese (Oppenheim, 1991). As razões para esta perda de células nervosas incluem desde competição por espaço ou fatores tróficos até a eliminação de vias redundantes (Pettmann & Henderson, 1998).

Durante o processo de envelhecimento é observada maior perda de neurônios, o que explica o declínio funcional do cérebro (Haug, 1986; Wickelgren, 1996a; Wickelgren, 1996b). Com o avanço da idade, há aumento da apoptose no córtex e na região CA1 hipocampal (zonas cruciais para função da memória) (West & Gundersen, 1990; West *et al.*, 1994). Sugere-se que o aumento do estresse oxidativo (Shukitt-Hale, 1999) e da inflamação (Hauss-Wegrzyniak *et al.*, 2000) podem estar envolvidos no déficit comportamental durante o envelhecimento.

Nos mamíferos os diversos tipos celulares (principalmente os neurônios) co-expressam proteases conhecidas como Par-4 (*prostate apoptosis response 4*) (Sells *et al.*, 1994) e múltiplas caspases que podem agir em diferentes estágios na cascata enzimática envolvida na morte celular programada (Chan & Mattson, 1999).

1.3.1 – Par-4

A proteína Par-4 foi primeiramente identificada entre genes pró-apoptóticos ativados em resposta a insultos às células cancerosas na próstata (Sells *et al.*, 1994).

Par-4 apresenta domínio zíper de leucina na sua região C terminal e duas seqüências sinal de localização nuclear (SNL) na região N terminal. Possui 100% de homologia em humanos, ratos e camundongos, sugerindo que sua função e regulação é similar entre os mamíferos (El-Guendy & Rangnekar, 2003). O domínio zíper de leucina é essencial para a ativação da morte celular programada devido a sua função de interação proteína-proteína (Diaz-Mecco *et al.*, 1996; Sells *et al.*, 1997).

Estudos revelam a presença de Par-4 em diversos tecidos de origem endodérmica, mesodérmica e ectodérmica de ratos com variações de expressão (Boghaert *et al.*, 1997). Análises do RNAm e expressão da proteína Par-4 em vários tecidos demonstram níveis baixos em diferentes tipos celulares, incluindo neurônios (Boghaert *et al.*, 1997). Os níveis desta proteína encontram-se elevados no cérebro, pulmão e testículo, porém encontram-se baixos no coração e fígado. Através de imunohistoquímica, notou-se baixo nível da proteína em muitos neurônios em condições basais. Expressão de Par-4 mostra-se elevada em certas populações neuronais, tais como, células piramidais do hipocampo e neurônios das camadas intermediárias do córtex cerebral. (Boghaert *et al.*, 1997).

Consistente com sua função apoptótica, seus níveis estão elevados em células que estão morrendo, por exemplo, em células do ducto da próstata em ratos castrados e neurônios em processo de degeneração (El-Guendy & Rangnekar, 2003). Esta proteína medeia à interação com proteínas que modulam a apoptose, incluindo proteína kinase C ζ (PKC ζ), Bcl-2 e componentes da sinalização de NF- κ B (Diaz-Meco *et al.*, 1996; Frutos *et al.*, 1999; Camandola & Mattson, 2000).

A indução da Par-4 parece ser a ligação entre a cadeia de eventos que levam a disfunção mitocondrial, ativação de caspase e morte celular seguida da exposição de neurônios a diferentes estímulos apoptóticos como o peptídeo β amilóide (Guo *et al.*, 1998), agentes geradores de oxiradicais (Duan *et al.*, 1999a,b) e retirada do fator trófico (Camandola & Mattson, 2000).

Camandola e colaboradores demonstraram que Par-4 promove apoptose suprimindo a sinalização envolvendo ativação de NF- κ B e expressão de Bcl-2 (Camandola & Mattson, 2000). Este mecanismo é consistente com habilidade da ativação de NF- κ B (Barger *et al.*, 1995; Mattson *et al.*, 1997; Tagliatela *et al.*, 1997) e super expressão de Bcl-2 (Greenlund *et al.*, 1995; Kruman *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1997) de prevenir apoptose em células expostas aos estímulos apoptóticos. A Figura 3 mostra esquematicamente o mecanismo de ação da Par-4.

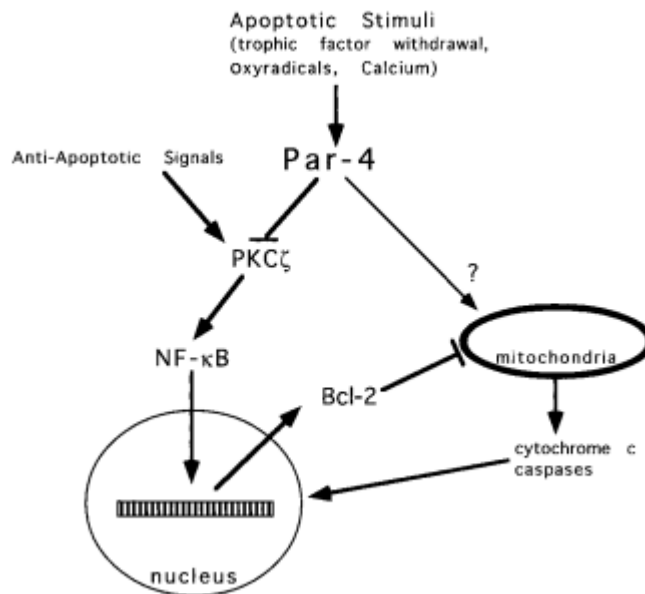


Figura 3: Mecanismo proposto de ação de Par-4 na apoptose neuronal.
 Fonte: Camandola & Mattson (2000, p.138)

Pesquisas apontam o seu papel na apoptose neuronal induzido em modelos experimentais, tais como, retirada do fator trófico e exposição a insultos oxidativos e metabólicos (Mattson *et al.*, 1999). Estudos com tecidos pós-morte de pacientes e modelos animais de desordens neurodegenerativas (doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington e esclerose lateral amiotrófica) mostraram aumento nos níveis de Par-4 em neurônios vulneráveis (Guo *et al.*, 1998; Duan *et al.*, 1999a; Kruman *et al.*, 1999; Pedersen *et al.*, 2000). Tabela 1 mostra as desordens neurodegenerativas em que a Par-4 pode ter função.

Tabela 1 - Desordens neurodegenerativas em que a Par-4 pode estar envolvida	
Desordens	Evidências
Doença de Alzheimer	Aumento do RNAm e da proteína Par-4 em neurônios afetados no tecido humano; peptídeo β -amilóide induz Par-4 em cultura de neurônios do hipocampo; RNA antisense previne apoptose induzida pelo peptídeo β -amilóide
Doença de Parkinson	Aumento dos níveis da proteína Par-4 em neurônios dopaminérgicos vulneráveis na substância negra de macacos e ratos com administração de MPTP; RNA antisense protege os neurônios dopaminérgicos dos insultos relevantes a doença de Parkinson
Doença de Huntington	Aumento de Par-4 nos neurônios estriais seguido da administração de 3NP; RNA antisense protege cultura de neurônios estriais contra a indução de morte celular
Esclerose Lateral Amiotrófica	Aumento dos níveis da proteína Par-4 em neurônios motores no tecido humano e camundongos com ALS; insultos oxidativos induz Par-4 em cultura de neurônios motores; RNA antisense previne apoptose em cultura de neurônios motores
Derrame Cerebral	Aumento dos níveis da proteína Par-4 seguida da oclusão arterial cerebral em ratos; privação glicose/oxigênio induz Par-4 em cultura de neurônio hipocampal; RNA antisense previne apoptose induzida pela excitotoxicidade e insultos metabólicos

Adaptado de Mattson MP, Duan W, Chan SL, Camandola S. Par-4: An Emerging Pivotal Player in Neuronal Apoptosis and Neurodegenerative Disorder. *J Mol Neurosci.* 1999; 13: 17-30.

A Par-4 é rapidamente induzida em neurônios que irão sofrer apoptose e exerce ação pró-apoptótica nos estágios iniciais da morte celular, antes da ativação de caspases e alterações na mitocôndria (Chan *et al.*, 1999).

1.3.2 – Caspases / Caspase-3

Caspases são enzimas proteolíticas com resíduo cisteína no seu sítio catalítico que cliva proteínas em resíduos aspartato (Earnshaw *et al.*, 1999; Yuan & Yankner, 2000; Troy & Salvesen, 2002) e são consideradas indispensáveis para promover a cascata de sinalização intracelular que leva à morte celular programada (Stennicke & Salvesen, 1998). Quatorze caspases já foram identificadas, possuindo distintas funções no processo inflamatório e na apoptose (Wolf & Green, 1999). Baseado na homologia da seqüência de aminoácidos, caspases podem ser divididas em três subfamílias:

Tabela 2- Subfamílias das caspases e seus membros

Subfamília	Função	Membro
I	Ativador Apoptótico	Caspase-2
		Caspase-8
		Caspase-9
		Caspase-10
II	Executor Apoptótico	Caspase-3
		Caspase-6
		Caspase-7
III	Mediador Inflamatório	Caspase-1
		Caspase-4
		Caspase-5
		Caspase-11
		Caspase-12
		Caspase-13
		Caspase-14

Adaptado de Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2005; 37: 719-727.

Sugere-se que a existência de múltiplas caspases deva-se ao fato de algumas serem envolvidas na amplificação da resposta através da clivagem de pró-formas de outras caspases (Chan & Mattson, 1999).

A atividade das caspases é regulada por outras proteínas, como as pertencentes à família Bcl-2 (*B cell leukemia- 2*) com membros anti e pró-apoptóticos e proteína inibidora de apoptose (*inhibitor of apoptosis proteins*, conhecida como IAP). Bcl-2 e Bcl-x_L são considerados reguladores negativos da apoptose neuronal (Merry & Korsmeyer, 1997). A super expressão de Bcl-2 protege contra estímulos de indução apoptótica, tais como, retirada do fator trófico, neurotransmissor excitatório glutamato, danos oxidativos, glucocorticóides e agentes danosos ao DNA (Sentman *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1997; Kruman *et al.*, 1997). Estudos sugerem que Bcl-2 age antes da ativação da caspase prevenindo a morte celular. Enquanto a Bcl-2 inibe ativação da caspase, seus membros pró-apoptóticos (Bax e Bad) são substratos da caspase-3 sendo responsáveis pela ativação da cascata de morte (Cheng *et al.*, 1997; Clem *et al.*, 1998).

As IAPs em mamíferos são pertencentes à família de inibidores de caspases identificados a partir da homologia ao baculovírus IAP. Algumas IAPs possuem a característica de suprimir apoptose pela inativação da pró-caspase 9 (Deveraux *et al.*, 1998), caspases 3 e 7 (Roy *et al.*, 1997). Especula-se que a ativação das caspases possua relação com o aumento da apoptose em diversas patologias. A Figura 4 resume os principais eventos envolvidos na morte celular programada quando ativada através das vias extrínseca e intrínseca.

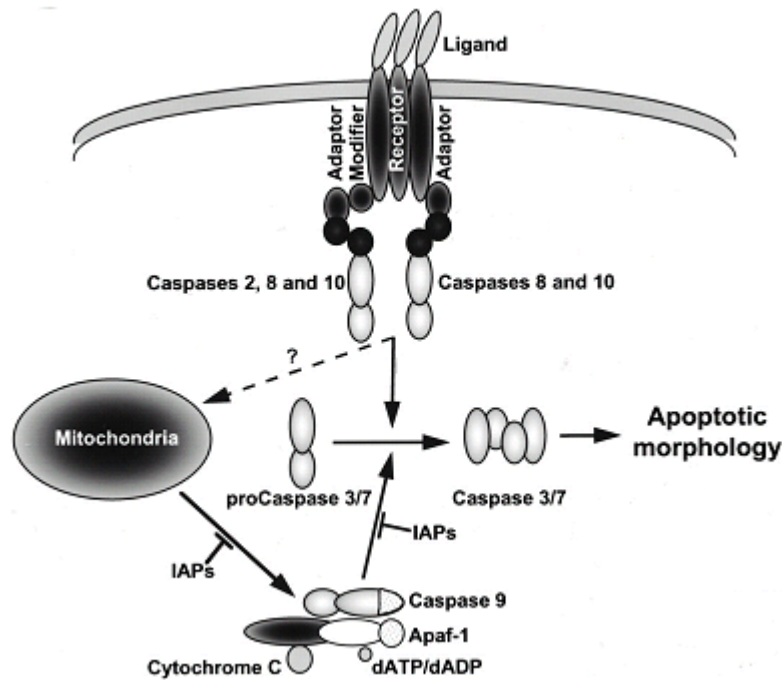


Figura 4 – Na via extrínseca a ativação apoptótica ocorre através da ligação de um sinal extracelular ao receptor na superfície celular, a cascata apoptótica é acionada mediante recrutamento de caspases que levarão a célula à morte. Na via intrínseca há fatores endógenos conhecidos como “sinais de estresse” (danos ao DNA) provenientes do interior da própria célula. Estes sinais acabam sendo detectados pelas mitocôndrias que sofrem desacoplamento da cadeia respiratória e liberam para o citosol o citocromo c. O citocromo c citoplasmático se liga a APAF-1 (*apoptotic protease activation factor-1*) e este complexo, na presença de ATP, ativa a caspase-9 que, por sua vez, ativará a caspase 3 e 7 e levará a célula a morte (Fan et al., 2001). Adaptado de Stennicke HR, Salvesen GS (1998, p. 17).

A caspase executora Caspase-3 é importante no controle da apoptose no tecido nervoso (Salvesen, 2002; Troy & Salvesen, 2002). Ela é responsável pela transdução e execução dos sinais de morte. Estudos evidenciam que o nível de estresse oxidativo pode levar a célula à morte, possivelmente pela modulação diferenciada da atividade das caspases (Hortelano *et al.*, 1997; Leist *et al.*, 1997). Contudo, se torna claro que certas proteases não são meramente enzimas degradativas, mas são moléculas de sinalização altamente reguladas que controlam processos biológicos críticos via proteólise específica (Los *et al.*, 2001).

Recentemente, pesquisas apontam o papel das caspases em vários aspectos não apoptóticos na fisiologia celular. Caspases estão envolvidas na atividade de citocinas durante a inflamação, progressão do ciclo celular, diferenciação de progenitores celulares durante a eritropoiese e células musculares e proliferação de linfócitos T (Fadell *et al.*, 2000; Los *et al.*,

2001; Fernando *et al.*, 2002; Robertson & Zhivotovsky, 2002). No tecido nervoso há crescente evidência sobre os mecanismos apoptóticos não estarem somente envolvidos na morte celular programada, mas podem regular a plasticidade sináptica e motilidade do cone de crescimento (Gilman & Mattson, 2002; Perfettini & Kroemer, 2003).

O sistema nervoso possui uma complexidade estrutural e funcional devido à característica de que suas células, altamente diferenciadas, não se dividem (Mattson, 2000). Durante a evolução, o sistema nervoso desenvolveu mecanismos que protegem as células da morte neuronal. Os sintomas das desordens neurodegenerativas enfatizam a importância de meios que promovam a sobrevivência e a plasticidade das células nervosas. Existem diversas vias de sinalização anti-apoptótico (Mattson, 2000). Fatores neurotróficos podem proteger os neurônios contra apoptose através de ativação de receptores associados a cascatas de sinalização que envolvem quinases e levam à produção de proteínas que promovem a sobrevivência celular. A Figura 5 ilustra alterações na sinalização sináptica em desordens neurodegenerativas.

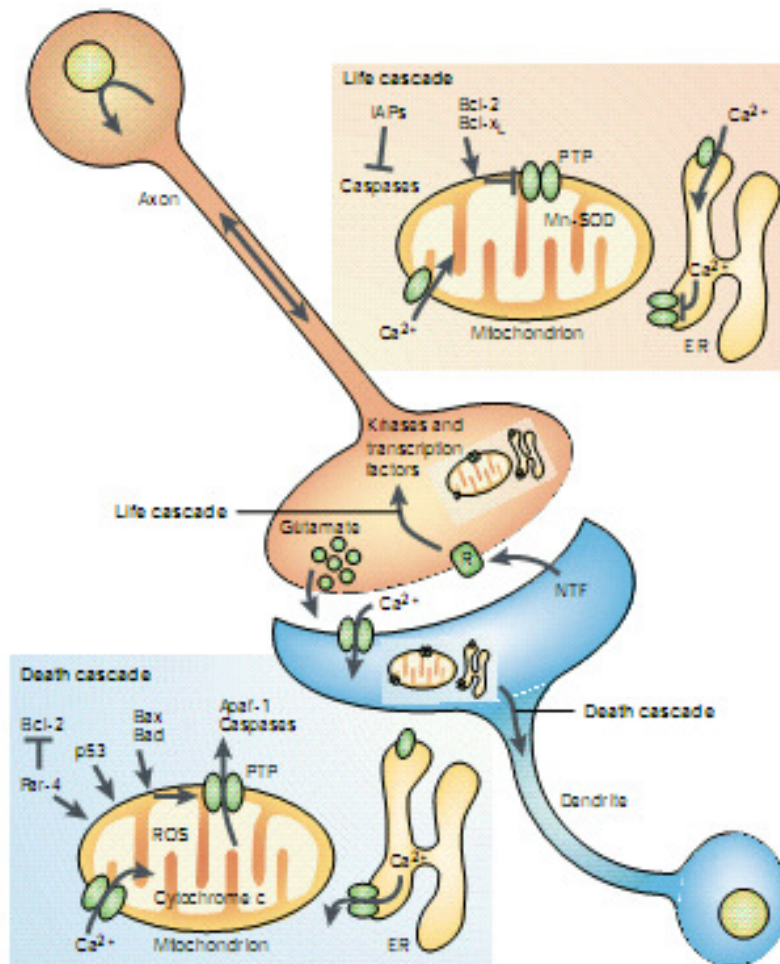


Figura 5 – Alteração na sinalização sináptica em desordens neurodegenerativas. Estressores (idade e doença) promovem ativação apoptótica através de cascatas bioquímicas nos terminais sinápticos e nos neuritos. Por exemplo, a super ativação dos receptores de glutamato reduz a disponibilidade energética ou aumenta o estresse oxidativo (por meio de espécies reativas ao oxigênio – ROS – *reactive oxygen species*), levando ao influxo de Ca^{2+} nos terminais pós-sinápticos dos dendritos, acionando fatores que ativarão caspases induzindo à célula a morte. Já na sinalização anti-apoptótica, pode ocorrer ativação de receptores (R) pelo fator neurotrófico (NTF) nos terminais do axônio que estimulará cascata de quinases e fatores de transcrição e aumentará a produção de proteínas que promovam a sobrevivência (Bcl-2, Bcl- x_L) e proteínas inibidoras de apoptose (IAPs).
Fonte: Mattson, MP (2000, p. 120)

A expressão de proteínas pertencentes à família das caspases em cérebros de ratos durante o desenvolvimento e envelhecimento bem como sua localização subcelular em cérebros de ratos adultos, sugere que as caspases podem contribuir para a regulação da plasticidade sináptica (Shimohama *et al.*, 2001a,b). Yan *et al.* (2001) estudou a expressão da atividade da caspase-3 em células mitóticas e pós-mitóticas na região anterior do cérebro de ratos e demonstrou a atividade da caspase-3 em células em divisão nas zonas proliferativas e migrando para o bulbo olfatório ao se diferenciarem em neurônios. Portanto, a caspase-3 ativa pode ter uma função no processo

celular normal, como a diferenciação neuronal, a migração e a plasticidade (Kudryashov *et al.*, 2001, 2002).

A potenciação de longa duração, conhecida como LTP (*long-term potentiation*), é um fenômeno eletrofisiológico caracterizado pela facilitação duradoura da resposta sináptica. Este fenômeno, descrito primeiramente por Bliss e Lomo (1973), é considerado, desde então, um modelo dos eventos celulares envolvidos em aprendizado e memória. A forma mais tradicional de LTP, dependente do receptor ionotrópico glutamatérgico NMDA (N-methyl-D-aspartate) na região CA1 do hipocampo, é provavelmente a forma mais estudada de plasticidade sináptica. Algumas enzimas proteolíticas tem se mostrado essenciais para a LTP (Gulyaeva *et al.*, 2003). Tomimatsu e colaboradores tem mostrado em estudos recentes, o importante papel do sistema proteolítico na LTP (Tomimatsu *et al.*, 2002).

Atualmente, tem-se sugerido o envolvimento da caspase-3 no fenômeno da LTP. Gulyaeva *et al.* (2003) demonstrou prejuízo na LTP pelo uso de inibidor específico de caspase-3, sugerindo que substratos ou produtos da caspase-3 estão envolvidos no processo. Assim sendo, há evidências de que a caspase-3 é essencial para plasticidade sináptica de longa duração.

Dentre as caspases, este estudo dará enfoque à caspase-3 executora, vista sua importância central na apoptose somada as evidências de suas funções não apoptóticas (Faddeel *et al.*, 2000; Los *et al.*, 2001; Fernando *et al.*, 2002; Gilman & Mattson, 2002; Perfettini & Kroemer, 2003). Devido à carência de estudos que relacionem as proteínas pró-apoptóticas Par-4 e caspase-3 em modelos de neurodegeneração e a ausência de trabalhos que relacionem estas proteases com estudos sobre os efeitos do ferro no sistema nervoso, torna-se importante avaliar possíveis alterações nestas proteínas que podem estar ocorrendo em decorrência do tratamento neonatal com ferro, já que este modelo experimental já está bem estabelecido mostrando diversas alterações na fase de envelhecimento (Sobotka *et al.*, 1996; Fredriksson *et al.*, 1999; Schröder *et al.*, 2001; de Lima *et al.*, 2005; Fredriksson & Archer, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1– Objetivo Geral

Avaliar eventuais alterações nas proteínas Par-4 e caspase-3 em diferentes regiões do cérebro de ratos adultos (3 meses) e idosos (24 meses) controles e tratados com ferro durante o período neonatal através de imunohistoquímica.

2.2– Objetivos Específicos

Avaliar a presença de Par-4 e caspase-3 na região do hipocampo, estriado e córtex em ratos adultos (3 meses) normais (não tratados com ferro no período neonatal) através de imunohistoquímica.

Avaliar a presença de Par-4 e caspase-3 na região do hipocampo, estriado e córtex em ratos velhos (24 meses) normais (não tratados com ferro no período neonatal) através de imunohistoquímica.

Avaliar a presença de Par-4 e caspase-3 na região do hipocampo, estriado e córtex em ratos adultos (3 meses) previamente tratados com ferro durante o período neonatal através de imunohistoquímica.

Avaliar a presença de Par-4 e caspase-3 na região do hipocampo, estriado e córtex em ratos velhos (24 meses) previamente tratados com ferro durante o período neonatal através de imunohistoquímica.

Comparar possíveis alterações das proteínas Par-4 e caspase-3 entre os grupos controle e experimental

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

SUBMETIDO AO PERIÓDICO NEUROTOXICITY RESEARCH EM 19/01/2010 E

ACEITO EM 23/03/2010

7

3 Neonatal Iron Treatment Increases Apoptotic Markers 4 in Hippocampal and Cortical Areas of Adult Rats

5 Clivia Pazin Miwa · Maria Noêmia Martins de Lima · Felipe Scalco ·
6 Gustavo Vedana · Raquel Mattos · Liana Lisboa Fernandez · Arlete Hilbig ·
7 Nadja Schröder · Monica R. M. Vianna

8 Received: 19 January 2010/Revised: 13 March 2010/Accepted: 23 March 2010
9 © Springer Science+Business Media, LLC 2010

Author Proof

10 **Abstract** Oxidative stress, cellular damage, and neuronal
11 apoptosis are believed to underlie the progressive cognitive
12 decline that accompanies natural aging and to be exacer-
13 bated in neurodegenerative diseases. Over the years, we
14 have consistently demonstrated that iron neonatal treatment
15 induces oxidative stress and memory deficits in adult rats,
16 but the mechanisms underlying these effects remained
17 undefined. The purpose of this study was to examine
18 whether neonatal iron overload was associated with apop-
19 totic cell death in adult and old rats. We analyzed Par-4 and
20 caspase-3 immunoreactivity in specific brain areas includ-
21 ing the hippocampus CA1, CA3 and dentate gyrus (DG),
22 the adjacent cortex and the striatum in adult (3 months-old)
23 and aged (24 months-old) rats from control (vehicle-treat-
24 ed) and neonatally iron-treated groups. Neonatal iron
25 treatment consisted of a daily oral administration of 10 mg/
26 kg of Fe²⁺, for three consecutive days, from post-natal
27 12–14. Control aged animals showed increased levels of
28 both markers when compared to untreated adult animals.
29 When adults were compared, iron-treated animals presented
30 significantly higher Par-4 and caspase-3 immunoreactivities

in CA1, CA3 and cortex. In the DG, this effect was statisti-
cally significant only for Par-4. Interestingly, when control
and iron-treated aged animals were compared, a significant
decrease in both apoptotic markers was observed in the
later groups in the same areas. These results may be inter-
preted as an acceleration of aging progressive damages
caused by iron overload and may contribute to a better
understanding of the damaging potential of iron accumula-
tion to brain function and the resulting increased suscepti-
bility to neurodegeneration.

Keywords Iron · Neurodegeneration · Aging ·
Apoptosis · Rat

Introduction

Increasing evidence suggest that iron and its major storage
protein ferritin accumulate in specific brain regions during
aging under physiological conditions (Connor et al. 1995;
Zecca et al. 2001; Polla et al. 2003; Schipper 2004; Zecca
et al. 2004). The deleterious potential of excessive iron
accumulation and its altered metabolism on brain cells is
corroborated by evidences indicating that under pathologi-
cal conditions, there is an exacerbation of the aging
associated changes in iron content in specific brain areas
(Dexter et al. 1991; Kienzl et al. 1995). Iron overload has
been implicated in the pathogenesis of several human
neurodegenerative disorders, i.e., Parkinson's disease (PD)
and Alzheimer's disease (AD), Huntington's (HD), and
neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA),
involving aberrant brain iron metabolism and resulting cell
damages (Dexter et al. 1991; Kienzl et al. 1995; Reich-
mann et al. 1995; Swaiman 1991; Youdim et al. 1993; Lee
et al. 2006).

A1 C. P. Miwa · M. N. M. de Lima · F. Scalco · G. Vedana ·
A2 R. Mattos · L. L. Fernandez · N. Schröder ·
A3 M. R. M. Vianna (✉)
A4 Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty
A5 of Biosciences, Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga,
A6 6681 Prédio 12C, Sala 340, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil
A7 e-mail: monica.vianna@pucrs.br

A8 L. L. Fernandez · A. Hilbig
A9 Health Basic Science Department, Federal University of Medical
A10 Science, Porto Alegre, RS, Brazil

A11 M. N. M. de Lima · N. Schröder · M. R. M. Vianna
A12 National Institute for Translational Medicine (INCT-TM),
A13 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Springer

	Journal : Large 12640	Dispatch : 30-3-2010	Pages : 9
	Article No. : 9181	<input type="checkbox"/> LE	<input type="checkbox"/> TYPESET
	MS Code : NTRE-D-10-00005	<input checked="" type="checkbox"/> CP	<input checked="" type="checkbox"/> DISK

- 63 The immediate postnatal period is critical for the
64 establishment of iron content in the adult brain and its
65 regional distribution profile (Connor et al. 1995). It has
66 been shown that both iron transport and transferrin trans-
67 porter binding sites are maximal during the postnatal peri-
68 od of rapid brain growth, reaching highest values around
69 the 15th day after birth in rats (Taylor and Morgan 1990).
70 Dwork and colleagues (Dwork et al. 1990) demonstrated
71 that once iron is absorbed during this critical period in
72 development, it is retained in the brain. Earlier studies from
73 our group have shown that iron supplementation in the
74 neonatal period induces a selective iron accumulation in
75 specific brain regions, especially in the basal ganglia,
76 which was correlated to behavioral changes in adult mice
77 (Fredriksson et al. 1999, 2000) and rats (Schröder et al.
78 2001) including memory deficits (de Lima et al. 2005a)
79 that could be ameliorated selegiline (de Lima et al. 2005b)
80 or iron chelation (de Lima et al. 2008). The cognitive
81 deficits resulting from iron supplementation were accom-
82 panied by an increased oxidative damage in brain regions
83 (de Lima et al. 2005a). We have also demonstrated that
84 neonatal iron supplementation in mice can lead to
85 increased GFAP immunoreactivity in adulthood, suggest-
86 ing a reactive gliosis response that could be following
87 oxidative damage-induced neuronal loss (Fernandez et al.
88 2009).
- 89 Neuronal death mediated by apoptosis is believed to
90 underlie cognitive and behavioral symptoms of aging and
91 neurodegenerative diseases in humans and animal models
92 (Morrison and Hof 1997; Mattson 2000). Many signals can
93 mediate neuronal apoptosis initiation, including neurotro-
94 phic factor deprivation (McKay et al. 1999; Mattson and
95 Kroemer 2003; Stefanis 2005) and iron-induced oxidative
96 stress (Polla et al. 2003).
- 97 The protease prostate apoptosis response-4 (Par-4), ini-
98 tially identified as an up regulated molecule in prostate
99 tumor cells undergoing apoptosis (Sells et al. 1994), and
100 now known to be essential in developmental and pathol-
101 ogy neuronal death, regulates the early stages of apop-
102 tosis (Guo et al. 1998; Mattson et al. 1999). Levels of Par-4
103 increase rapidly in response to various apoptotic stimuli
104 through enhanced translation of Par-4 messenger RNA
105 (Mattson et al. 1999; El-Guendy and Rangnekar 2003).
106 Par-4 induction seems to link the chain of events leading to
107 mitochondrial dysfunction, caspase activation and cell
108 death (Guo et al. 1998; Chan et al. 1999; Duan et al. 1999;
109 Guo et al. 2001). The caspase members of proteolytic
110 enzymes comprise a large family involved in activation,
111 execution and mediation of apoptosis (Earnshaw et al.
112 1999; Yuan and Yankner 2000; Troy and Salvesen 2002).
113 Among the executioner caspases, caspase-3 plays a critical
114 role in neuronal apoptosis in the nervous system under
115 physiological and pathological conditions (Troy and
Salvesen 2002; Salvesen 2002; Shimohama et al. 1999; 116
Lynch and Lynch 2001; Rohn 2008) playing important 117
roles in neurodegeneration (Friedlander 2003). Oxidative 118
damage mediated by reactive oxygen species (ROS) have 119
been shown to induce caspase activation and result 120
in neuronal apoptosis associated to Parkinson's disease 121
(Tatton et al. 2003). 122
- Oxidative stress, cellular damage, and neuronal apop- 123
tosis are believed to underlie the progressive cognitive 124
decline that accompanies natural aging. Although over the 125
years, we have consistently demonstrated that iron neonatal 126
treatment induces cognitive changes in adult rats, the 127
mechanisms involved remain to be clarified. Thus, the 128
purpose of this study was to examine whether neonatal iron 129
overload is associated with apoptotic cell death in adult and 130
old rats. We analyzed Par-4 and caspase-3 immunoreactiv- 131
ity in specific brain areas including the hippocampal 132
formation subareas CA1, CA3 and DG, the adjacent cortex 133
and the striatum in adult and aged rats from control and 134
neonatal iron-treated groups. 135
- ## 136 Methods
- ### 137 Animals
- Pregnant Wistar rats were obtained from Fundação Esta- 138
dual de Pesquisa e Produção em Saúde (FEEPS), Porto 139
Alegre, Brazil. After birth, each litter was adjusted within 140
48 h to eight rat pups. Each pup was maintained together 141
with its respective mother in a plastic cage with sawdust 142
bedding in a room at a temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and a 12 h 143
light: dark cycle. At the age of 4 weeks the pups were 144
weaned and the males were selected and raised in groups of 145
three to five rats. At postnatal treatment, the animals were 146
supplied with standardized pellet food and tap water ad 147
libitum. All experimental procedures were performed in 148
accordance with the NIH Guide for the Care and Use of 149
Laboratory Animals, and the Brazilian Society for Neuro- 150
science and Behaviour (SBNeC) recommendations for 151
animal care. The protocol for this research was approved 152
by the Institutional Ethics Committee of the Pontifícia 153
Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 154
- ### 155 Animal Treatment
- The neonatal iron treatment was performed as previously 156
described (Schröder et al. 2001; de Lima et al. 2005a, b, 157
2007, 2008). Ten 12-day-old rat pups received orally 158
a single daily dose of $10.0 \text{ mg Fe}^{2+}/\text{kg}$ body weight 159
in solution volume (Ferromyn[®], AB Hässle, Göteborg, 160
Sweden) and nine ones received vehicle (5% sorbitol in 161
water, control group) via a metallic gastric tube, over 162

163 3 days (post natal days 12–14). The period of treatment
164 was chosen based on studies that show that iron uptake by
165 the brain increases rapidly in the first 15 days of life,
166 decreasing after the 15th day of life in rats (Taylor and
167 Morgan 1990; Taylor et al. 1991).

168 Immunohistochemical Analyses (IHC)

169 Five iron-treated and 3 sorbitol-treated 3-month-old rats,
170 and five iron-treated and six sorbitol-treated 24-month-old
171 rats were perfused through the left cardiac ventricle for
172 20 min with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer.
173 The brains were rapidly removed, and immersed in the
174 same fixative solution at room temperature. Immediately
175 afterwards, the brains were cut coronally and embedded in
176 paraffin. Serial, 5- μ m-thick coronal sections were obtained
177 with a microtome, and used for immunohistochemistry.
178 De-waxed sections corresponding to Paxinos and Watson
179 (Paxinos and Watson 2005) striatum (Figs. 25–33), hip-
180 pocampus (Figs. 33–37) and cortex (Figs. 33–37) were
181 immersed in 3% hydrogen peroxide in 100% methanol for

182 15 min to inhibit endogenous peroxidase activity. Then,
183 sections were boiled in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, for
184 30 min or treated with formic acid for 3 min, for antigen
185 retrieval. After rinsing in phosphate-buffered saline (PBS),
186 the sections were incubated with normal horse serum for
187 2 h and then with the primary antibody overnight at 4°C in
188 humid chambers. The following primary antibodies were
189 used following the manufacturer instructions: anti-Par-4
190 rabbit polyclonal (AB75686, Abcam Inc. Cambridge, UK),
191 dilution 1:800, anti-Caspase-3 rabbit polyclonal (AB59388,
192 Abcam Inc. Cambridge, UK), dilution 1:100. The sections
193 were washed three times in PBS and immunostained
194 by a MAX Polymer Detection Kit (secondary biotinylated
195 universal, HRP polymer conjugate, and DAB chromogen,
196 ZIMED) for optical detection.

Densitometry and Statistical Processing of Data

197
198 The immunohistochemical images were captured using
199 Olympus BX 50 microscope, DC300F camera and capture
200 system Leica IM 50. The selection was done manually

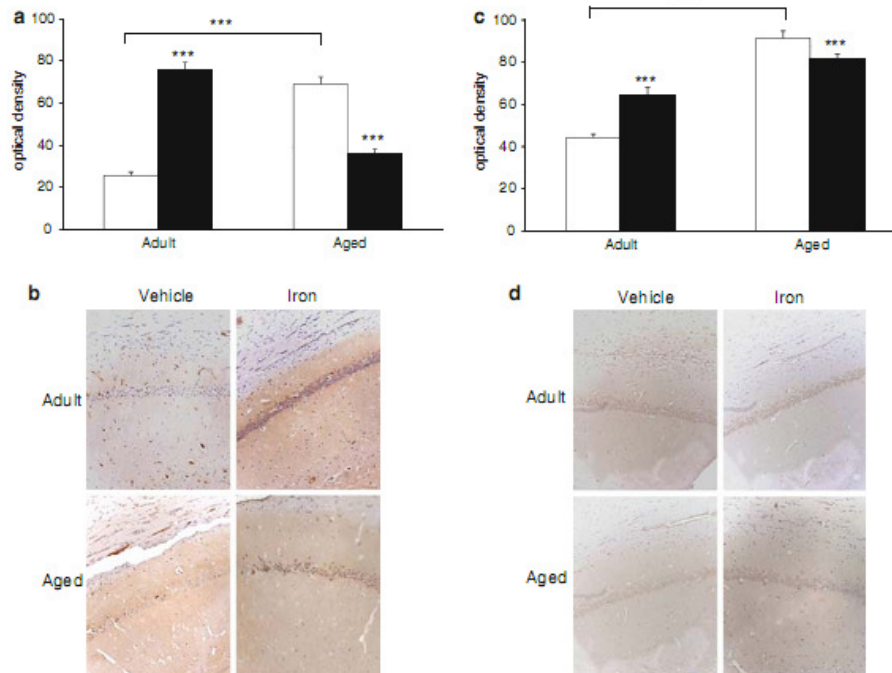


Fig. 1 Densitometric analysis of Par-4 (a) and caspase-3 (c) immunoreactivities in CA1 area. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons among groups were performed using ANOVA followed by Tukey post hoc test. *** Indicates

$P < 0.001$. Representative histological sections of Par-4 (b) and caspase-3 (d) immunohistochemistry of CA1 of adult and aged rats treated with vehicle (*open bars*) or iron (*filled bars*) in the neonatal period. Magnification: 10 \times

201 including striatum, hippocampus or cortex. To analyze
 202 the images, Image J software was used (<http://www.uhn>
 203 [research.ca/facilities/wcif/download.html](http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/download.html)). For each image,
 204 color functions and color de-convolution, H DAB vectors:
 205 color 2 R: 0.26814753, G: 0.57031375, B: 0.77642715 were
 206 applied. The color 2 image (brown) was inverted and the
 207 measurement was obtained as a percentage of the DAB
 208 chromogen. Data were expressed as mean \pm standard error
 209 of the mean (SEM). Comparisons among groups were per-
 210 formed using ANOVA followed by Tukey post hoc test.
 211 P values of less than 0.05 were considered statistical signif-
 212 icant and are indicated in the figure as * $P < 0.05$,
 213 ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

214 Results

215 The studied hippocampal regions showed a similar profile in
 216 terms of immunoreactivity to both apoptotic molecules
 217 studied. When adult animals were compared, iron-treated
 218 animals presented significantly higher Par-4 and caspase-3

219 immunoreactivities in the CA1 (Fig. 1a-d) and CA3
 220 (Fig. 2a-d) areas in comparison to their respective control
 221 groups ($P < 0.001$ for all comparisons). Interestingly,
 222 when control and iron-treated aged animals were com-
 223 pared, a significant decrease in both apoptotic markers was
 224 observed in the later groups in those areas ($P < 0.001$ in
 225 CA1, and $P < 0.01$ in CA3).

226 At the DG formation Par-4 showed an equivalent profile to
 227 that above described, being increased in adult treated
 228 animals when compared to their controls and decreased
 229 when the equivalent aged groups were compared ($P <$
 230 0.001 to both comparisons, Fig. 3a-b). Caspase-3 immu-
 231 noreactivity at this area, however, had lower levels in iron-
 232 treated animals at both ages when they were compared to
 233 their age-matching controls ($P < 0.001$, Fig. 3c, d).

234 As shown in Fig. 4, the analyzed cortical area showed a
 235 profile comparable to that observed in CA1 and CA3. Iron-
 236 treated animals showed significantly higher levels of Par-4
 237 and caspase-3 at the adult age ($P < 0.05$), while that effect
 238 was inverted at a later period in life, when aged treated
 239 animals showed significant less reactivity to both markers
 240 than their respective control group ($P < 0.001$).

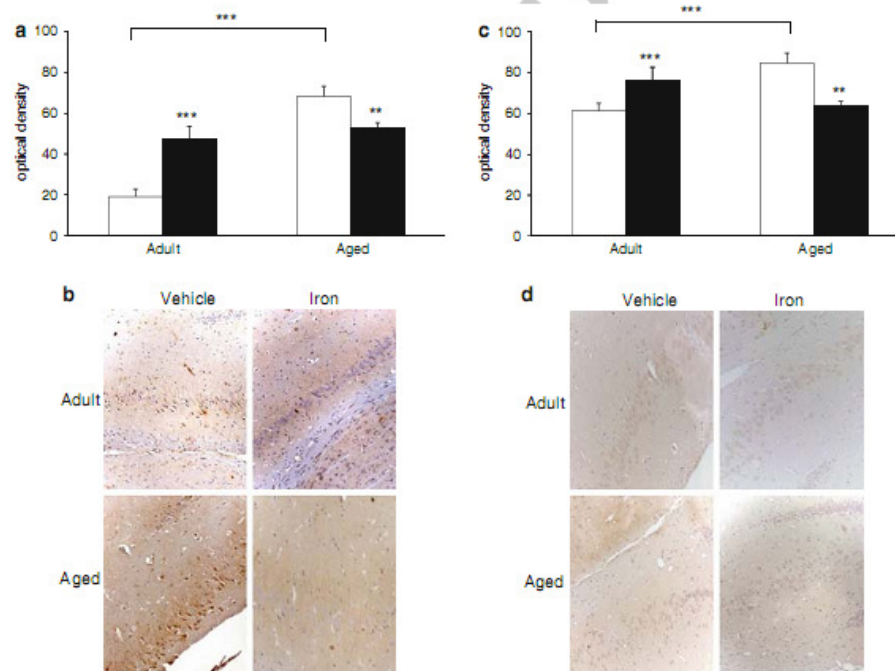


Fig. 2 Densitometric analysis of Par-4 (a) and caspase-3 (c) immu-
 noreactivities in CA3 area. Data were expressed as mean \pm standard
 error of the mean (SEM). Comparisons among groups were performed
 using ANOVA followed by Tukey post hoc test. ** Indicates

$P < 0.01$ and *** indicates $P < 0.001$. Representative histological
 sections of Par-4 (b) and caspase-3 (d) immunohistochemistry of CA3
 of adult and aged rats treated with vehicle (open bars) or iron (filled
 bars) in the neonatal period. Magnification: 10 \times

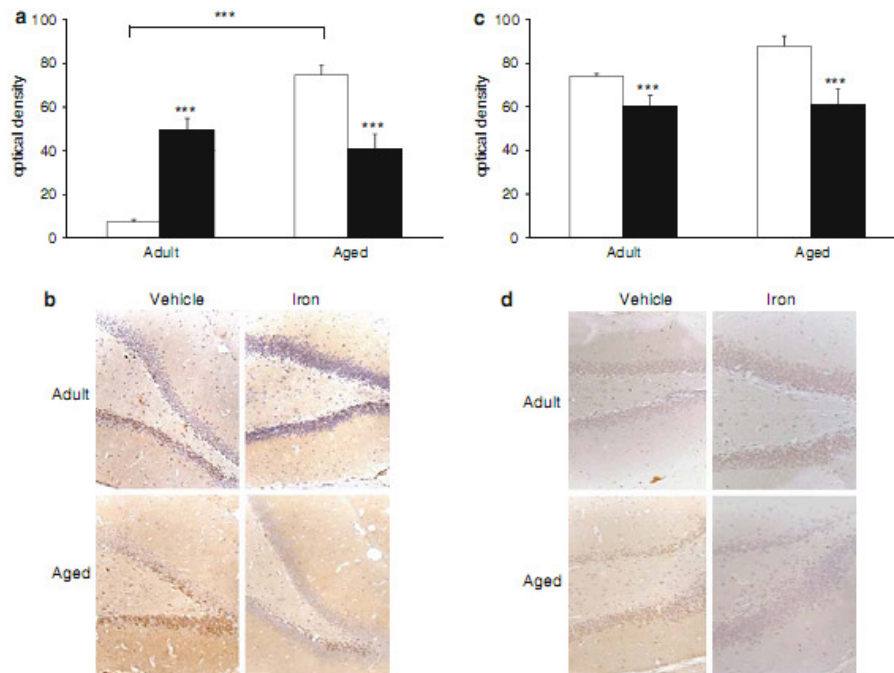


Fig. 3 Densitometric analysis of Par-4 (a) and caspase-3 (c) immunoreactivities in DG area. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons among groups were performed using ANOVA followed by Tukey post hoc test. *** Indicates

$P < 0.001$. Representative histological sections of Par-4 (b) and caspase-3 (d) immunohistochemistry of DG of adult and aged rats treated with vehicle (open bars) or iron (filled bars) in the neonatal period. Magnification: 10 \times

241 Finally, when Par-4 and caspase-3 were studied in the
242 striatum of adult and aged animals, no significant effect of
243 the neonatal iron treatment was observed (Fig. 5).

244 Our data also demonstrates a generalized increase in
245 Par-4 and caspase-3 immunoreactivity in hippocampal
246 CA1 (Fig. 1) and CA3 (Fig. 2) areas and cortex (Fig. 4)
247 associated to normal aging in untreated animals when adult
248 and aged control animals are compared. Par-4 immunore-
249 activity was significantly increased in DG, and, despite a
250 clear tendency, this effect was not statistically significant
251 for caspase-3 (Fig. 3) ($P = 0.072$). This profile was also
252 observed in the striatum, where no significant changes were
253 found in Par-4 ($P = 0.079$) and caspase-3 ($P = 0.053$)
254 immunoreactivity when adult and aged controls were
255 compared (Fig. 5).

256 Discussion

257 The present findings show that iron, given to rats in the
258 neonatal period, induces increased levels of apoptotic
259 markers, Par-4 and caspase-3 in hippocampal subregions

and cortex of adult rats. The increased Par-4 and caspase-3
260 levels observed in adult iron-treated animals were compa-
261 rable to the levels of both markers in aged control indi-
262 viduals, suggesting that iron overload accelerates the
263 apoptotic cell death rate that normally increases with
264 age (Lynch and Lynch 2001). Further studies evaluating
265 apoptotic DNA fragmentation and quantification of apop-
266 totic-related protein levels could be performed in order
267 to better characterize iron-induced apoptotic mechanisms
268 and refine the present findings. The premature apoptosis
269 observed in iron-treated adults might be related to previous
270 findings from our group showing cognitive deficits in adult
271 animals that had received iron supplementation in the
272 neonatal period at levels comparable to those typically
273 observed in aged individuals (de Lima et al. 2005a, b, c;
274 2008). The hippocampal formation is known to be critically
275 involved in cognition, participating in memory acquisition
276 and consolidation for a myriad of tasks (Eichenbaum 2004)
277 and our findings of iron-induced increase in Par-4 and
278 caspase-3 levels in hippocampal and cortical areas could
279 explain these animals' memory deficits (de Lima et al.
280 2005a, b, 2007, 2008).
281

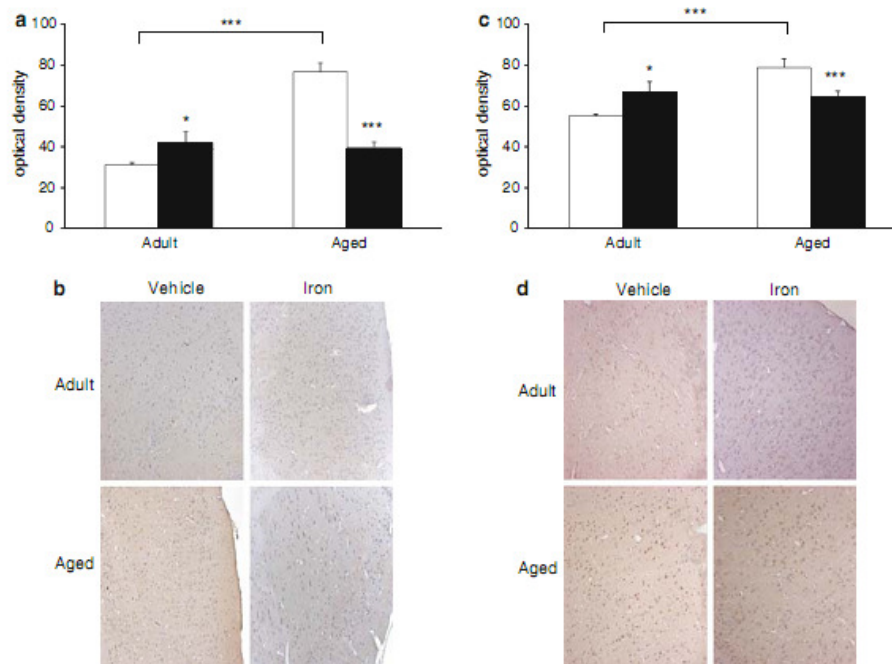


Fig. 4 Densitometric analysis of Par-4 (a) and caspase-3 (c) immunoreactivities in cortex area. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons among groups were performed using ANOVA followed by Tukey post hoc test.

* Indicates $P < 0.05$ and *** indicates $P < 0.001$. Representative histological sections of Par-4 (b) and caspase-3 (d) immunohistochemistry of cortex of adult and aged rats treated with vehicle (open bars) or iron (filled bars) in the neonatal period. Magnification: $10\times$

Author Proof

282 Interestingly, no significant differences were found in
 283 Par-4 and caspase-3 levels in the striatum of iron-treated
 284 rats compared to their age-matching controls. We have
 285 previously described that iron supplementation in the
 286 neonatal period does not alter the level of protein carbonylation, an index of oxidative protein damage, and superoxide dismutase (SOD) activity in striatum of adult rats (de Lima et al. 2005a; Dal-Pizzol et al. 2001), in contrast to iron-induced alterations found in the *substantia nigra*, hippocampus, and cortex in those studies. Taking together these findings suggest that the striatum might be more resistant to oxidative stress and apoptotic activation than hippocampal and cortical areas.

295 Neuronal apoptosis can be initiated by signals including
 296 growth-factor deprivation, excessive excitatory glutamatergic neurotransmission and oxidative stress that activate intracellular cascades of events that can include production of Par-4 and procaspase-3 cleavage and caspase-3 activation [reviewed in Mattson 2000] Our study quantified protein levels of Par-4 and caspase-3 using immunohistochemistry as it reflects the active form of both apoptotic markers as protein levels have been previously shown to

rise due to increased messenger RNA translation in response to various apoptotic stimuli (Mattson et al. 1999; El-Guendy and Rangnekar 2003).

307 Aging occurs naturally throughout life and is associated with a significant intensification of apoptosis under physiological conditions and/or susceptibility to cell death after challenges in different tissues (Lacelle et al. 2002; Barja 2004). Our findings substantiate this concept, showing increased levels of proteins involved in apoptosis activation and execution in control aged animals when compared to adults, in accordance to previous reports (Adams et al. 1996; Tagliatela et al. 1996; Anglade et al. 1997; Dorszewska et al. 2004; Mansour et al. 2008).

317 Apoptosis has also been extensively related to neurodegenerative disorders (reviewed in 22]. Iron accumulation, that naturally occurs during aging (Zecca et al. 2001; Polla et al. 2003; Schipper 2004; Zecca et al. 2004), shown to be exacerbated in patients of PD, AD, HD, and NBIA (Dexter et al. 1991; Kienzl et al. 1995). Iron-induced apoptosis has been previously demonstrated using in vitro cellular models of neurotoxic injury (Kooncumchoo et al. 2006; Zhang et al. 2009). To our knowledge, this is the first

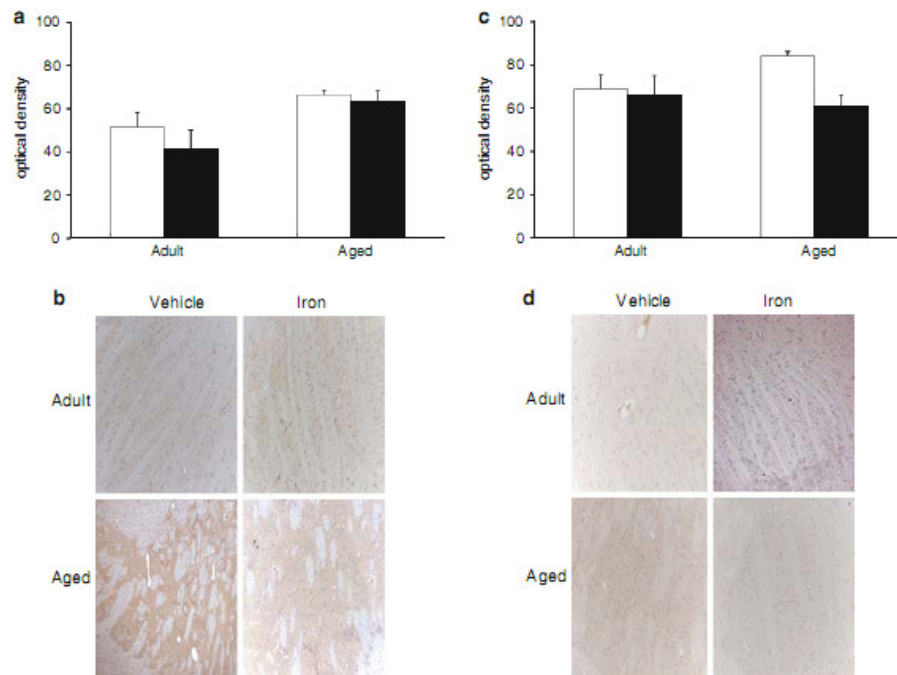


Fig. 5 Densitometric analysis of Par-4 (a) and caspase-3 (c) immunoreactivities in striatum area. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons among groups were performed using ANOVA followed by Tukey post hoc test. No

significant changes in striatum. Representative histological sections of Par-4 (b) and caspase-3 (d) immunohistochemistry of striatum of adult and aged rats treated with vehicle (open bars) or iron (filled bars) in the neonatal period. Magnification: 10 \times

326 demonstration that iron supplementation in vivo induces
327 apoptosis in cerebral tissue in adult rats.

328 Iron overload is believed to contribute to the develop-
329 ment of neurodegeneration and exacerbation of normal
330 apoptotic rates largely due to its participation in the Fenton
331 reaction and production of reactive oxygen species (ROS)
332 which result in cell damage (Dexter et al. 1991; Kienzl
333 et al. 1995; Reichmann et al. 1995; Swaiman 1991; You-
334 dim et al. 1993; Lee et al. 2006). Accordingly, we have
335 previously shown that adult iron-treated rats show
336 increased oxidative damage in the hippocampus and cortex
337 (de Lima et al. 2005a; Dal-Pizzol et al. 2001), areas in
338 which we now observe increased apoptosis at the same life
339 period. We have also shown in prior studies that at this
340 period iron-treated animals have increased GFAP-immu-
341 noreactivity in equivalent brain areas (Fernandez et al.
342 2009), suggesting an active gliosis that we may speculate
343 are taking over spaces left by neuronal death.

344 Taken together our findings showing higher Par-4 and
345 caspase-3 levels in control aged animals when compared to
346 iron-treated groups of the same age may be explained by

the precocious damage caused by iron overload and inte-
grated to previous findings may contribute to a better
understanding of the damaging potential of iron accumu-
lation to brain function and the resulting increased sus-
ceptibility to neurodegeneration. Iron supplementation at
very early stages of development results in brain accumu-
lation and subsequent toxicity, increasing oxidative damage
up to a level that natural defenses fail and neuronal apop-
totic rates are exacerbated during adulthood, resulting in
memory deficits. The mitotic responsiveness and more
resistant nature of astrocytes may allow their proliferation
in areas previously occupied by neurons at this early stage,
resulting in lower levels of apoptotic proteins in iron-treated
aged individuals. These findings may have implications for
the understanding of iron's role in the pathogenesis of
neurodegenerative disorders.

Acknowledgments This research was partially funded by CNPq
grant 476316/2006-5 and FAPERGS PROADE3 0521807 to Monica
Vianna. Monica Vianna is supported by CNPq 312137/2006-0 fel-
lowship, Nadja Schröder is supported by 301368/2006-6 fellowship,
and Clivia Miwa is supported by CAPES-MEC fellowship.

368 References

- 369 Adams JD, Mukherjee SK, Klaidman LK, Chang ML, Yasharel R
370 (1996) Apoptosis and oxidative stress in the aging brain. *Ann N*
371 *Y Acad Sci* 786:135–151
- 372 Anglade P, Vyas S, Hirsch EC, Agid Y (1997) Apoptosis in
373 dopaminergic neurons of the human substantia nigra during
374 normal aging. *Histol Histopathol* 12(3):603–610
- 375 Barja G (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 10:595–600
- 376 Chan SL, Tammariello SP, Estus S, Mattson MP (1999) Prostate
377 apoptosis response-4 mediates trophic factor withdrawal-induced
378 apoptosis of hippocampal neurons: actions prior to mitochondrial
379 dysfunction and caspase activation. *J Neurochem* 73(2):502–512
- 380 Connor JR, Pavlick G, Karli D, Menzies SL, Palmer C (1995) A
381 histochemical study of iron-positive cells in the developing rat
382 brain. *J Comp Neurol* 355(1):111–123
- 383 Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota ML Jr, Andrades ME, Caregnato FF,
384 Vianna MM et al (2001) Neonatal iron exposure induces
385 oxidative stress in adult Wistar rat. *Brain Res Dev Brain Res*
386 130(1):109–114
- 387 de Lima MN, Polydoro M, Laranja DC, Bonatto F, Bromberg E,
388 Moreira JC, Dal-Pizzol F, Schröder N (2005a) Recognition
389 memory impairment and brain oxidative stress by postnatal iron
390 administration. *Eur J Neurosci* 21:2521–2528
- 391 de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Graziotin MM, Garcia VA,
392 Dal-Pizzol F, Bromberg E, Schröder N (2005b) Selegiline
393 protects against recognition memory impairments induced by
394 neonatal iron treatment. *Exp Neurol* 196:177–183
- 395 de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R,
396 Schröder N (2005c) Reversal of age-related deficits in object
397 recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol*
398 40:506–511
- 399 de Lima MN, Presti-Torres J, Caldana F, Graziotin MM, Scalco FS,
400 Guimarães MR et al (2007) Desferoxamine reverses neonatal
401 iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur J*
402 *Pharmacol* 570:111–114
- 403 de Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimarães MR, Scalco FS,
404 Roesler R, Schröder N (2008) Amelioration of recognition
405 memory impairment associated with iron loading or aging by the
406 type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology* 55:788–792
- 407 Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE
408 et al (1991) Alterations in the levels of iron, ferritin and other
409 trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative
410 diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 114(Pt4):1953–1975
- 411 Dorszewska J, Adamczewska-Goncerzewicz Z, Szczech J (2004)
412 Apoptotic proteins in the course of aging of central nervous
413 system in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 139(2):145–155
- 414 Duan W, Rangnekar VM, Mattson MP (1999) Par-4 production in
415 synaptic compartments following apoptotic and excitotoxic
416 insults: evidence for a pivotal role in mitochondrial dysfunction
417 and neuronal degeneration. *J Neurochem* 72(6):2312–2322
- 418 Dwork AJ, Lawler G, Zybert PA, Durkin M, Osman M, Willson N et al
419 (1990) An autoradiographic study of the uptake and distribution
420 of iron by the brain of the young rat. *Brain Res* 518(1–2):31–39
- 421 Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian
422 caspases: structure, activation, substrates, and functions during
423 apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383–424
- 424 Eichenbaum H (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural
425 representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44:
426 109–120
- 427 El-Guendy N, Rangnekar VM (2003) Apoptosis by Par-4 in cancer
428 and neurodegenerative diseases. *Exp Cell Res* 283(1):51–66
- 429 Fernandez LL, Carmona M, Pontero-Otin M, Naudi A, Pamplona R,
430 Schröder N et al (2009) Effects of increased iron intake during
431 the neonatal period on the brain of adult AbetaPP/PS1 transgenic
432 mice. *J Alzheimers Dis* 19:1069–1080
- 433 Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T (1999)
434 Neonatal iron exposure induces neurobehavioural in adult mice.
435 *Toxicol Appl Pharmacol* 159(1):25–30
- 436 Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T (2000)
437 Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced
438 by iron exposure during a critical postnatal period. *Brain Res*
439 *Dev Brain Res* 119(1):65–74
- 440 Friedlander RM (2003) Apoptosis and caspases in neurodegenerative
441 diseases. *N Engl J Med* 348:1365–1375
- 442 Guo Q, Fu W, Xie J, Luo H, Sells SF, Geddes JW et al (1998) Par-4 is
443 a mediator of neuronal degeneration associated with the
444 pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat Med* 4(8):957–962
- 445 Guo Q, Xie J, Chang X, Zhang X, Du H (2001) Par-4 is a synaptic
446 protein that regulates neurite outgrowth by altering calcium
447 homeostasis and transcription factor AP-1 activation. *Brain Res*
448 903(1–2):13–25
- 449 Hasegawa M, Ogihara T, Tamai H, Hiroi M (2009) Hypothermic
450 inhibition of apoptotic pathways for combined neurotoxicity of
451 iron and ascorbic acid in differentiated PC12 cells: reduction of
452 oxidative stress and maintenance of the glutathione redox state.
453 *Brain Res* 1283:1–13
- 454 Kienzl E, Puchinger L, Jellinger KA, Linert W, Stachelberger H, Jameson
455 RF (1995) The role of transition metals in the pathogenesis of
456 Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 134:69–78
- 457 Kobayashi H, Oikawa S, Umemura S, Hirotsawa I, Kawanishi S
458 (2008) Mechanism of metal-mediated DNA damage and apop-
459 tosis induced by 6-hydroxydopamine in neuroblastoma SH-
460 SY5Y cells. *Free Radic Res* 42(7):651–660
- 461 Koocumchoo P, Sharma S, Porter J, Govitrapong P, Ebadi M (2006)
462 Coenzyme Q(10) provides neuroprotection in iron-induced
463 apoptosis in dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci* 28(2):125–
464 141
- 465 Lacelle C, Xu S, Wang E (2002) Identification of high caspase-3
466 mRNA expression as a unique signature profile for extremely old
467 individuals. *Mech Ageing Dev* 123(8):1133–1144
- 468 Lee DW, Andersen JK, Kaur D (2006) Iron dysregulation and
469 neurodegeneration: the molecular connection. *Mol Interv*
470 6(2):89–97
- 471 Lynch AM, Lynch MA (2001) The age-related increase in IL-1 type I
472 receptor in rat hippocampus is coupled with an increase in
473 caspase-3 activation. *Eur J Neurosci* 15(11):1779–1788
- 474 Mansour H, Chamberlain CG, Weible MW II, Hughes S, Chu Y,
475 Chan-Ling T (2008) Aging-related changes in astrocytes in the
476 rat retina: imbalance between cell proliferation and cell death
477 reduces astrocyte availability. *Aging Cell* 7(4):526–540
- 478 Mattson MP (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat*
479 *Rev Mol Cell Biol* 1(2):120–129
- 480 Mattson MP, Kroemer G (2003) Mitochondria in cell death: novel
481 targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol*
482 *Med* 9(5):196–205
- 483 Mattson MP, Duan W, Chan SL, Camandola S (1999) Par-4: an
484 emerging pivotal player in neuronal apoptosis and neurodegen-
485 erative disorders. *J Mol Neurosci* 13(1–2):17–30
- 486 McKay SE, Purcell AL, Carew TJ (1999) Regulation of synaptic
487 function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates:
488 implications for development and learning. *Learn Mem* 6(3):
489 193–215
- 490 Morrison JH, Hof PR (1997) Life and death of neurons in the aging
491 brain. *Science* 278(5337):412–419
- 492 Paxinos G, Watson C (2005) The rat brain: in stereotaxic coordinates,
493 6th edn. Academic Press, San Diego
- 494 Polla AS, Polla LL, Polla BS (2003) Iron as the malignant spirit in
495 successful ageing. *Ageing Res Rev* 2(1):25–37
- 496

- 497 Reichmann H, Janetzky B, Riederer P (1995) Iron-dependent enzymes
498 in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 46:157–164
- 499 Rohn TT (2008) Caspase-cleaved TAR DNA-binding protein-43 is a
500 major pathological finding in Alzheimer's disease. *Brain Res*
501 1228:189–198
- 502 Salvesen GS (2002) Caspases: opening the boxes and interpreting the
503 arrows. *Cell Death Differ* 9(1):3–5
- 504 Schipper HM (2004) Brain iron deposition and the free radical-
505 mitochondrial theory of ageing. *Ageing Res Rev* 3(3):265–301
- 506 Schröder N, Fredriksson A, Vianna MRM, Roesler R, Izquierdo I,
507 Archer T (2001) Memory deficits in adult rats following post
508 natal iron administration. *Behav Brain Res* 124:77–85
- 509 Sells SF, Wood DP Jr, Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ,
510 Crist SA et al (1994) Commonality of the gene programs
511 induced by effectors of apoptosis in androgen dependent and
512 independent prostate cells. *Cell Growth Differ* 5(4):457–466
- 513 Shimohama S, Tanino H, Fujimoto S (1999) Changes in caspase
514 expression in Alzheimer's disease: comparison with develop-
515 ment and aging. *Biochem Biophys Res Commun* 256(2):381–
516 384
- 517 Stefanis L (2005) Caspase-dependent and -independent neuronal
518 death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist*
519 11(1):50–62
- 520 Swaiman KF (1991) Hallervorden-Spatz syndrome and brain iron
521 metabolism. *Arch Neurol* 48(12):1285–1293
- 522 Tagliatalata G, Gegg M, Perez-Polo JR, Williams LR, Rose GM
523 (1996) Evidence for DNA fragmentation in the CNS of aged
524 Fischer-344 rats. *Neuroreport* 7(5):977–980
- Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N (2003) 525
Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degrada- 526
tion. *Ann. Neurol* 53(Suppl 3): S61–S72 527
- Taylor EM, Morgan EH (1990) Developmental changes in transferrin 528
and iron uptake by the brain in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 529
55(1):35–42 530
- Taylor EM, Crowe A, Morgan EH (1991) Transferrin and iron uptake 531
by the brain: effects of altered iron status. *J Neurochem* 57:
1584–1592 532
- Troy CM, Salvesen GS (2002) Caspases on the brain. *J Neurosci Res* 534
69(2):145–150 535
- Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P (1993) The possible role of 536
iron in the etiopathology of Parkinson's disease. *Mov Disord*
8(1):1–12 537
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 539
407(6805):802–809 540
- Zecca L, Gallorini M, Schunemann V, Trautwein AX, Gerlach M,
541 Riederer P et al (2001) Iron, neuromelanin and ferritin content
542 in the substantia nigra of normal subjects at different ages:
543 consequences for iron storage and neurodegenerative processes.
544 *J Neurochem* 76(6):1766–1773 545
- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) 546
Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev*
547 *Neurosci* 5(11):863–873 548
- Zhang S, Wang J, Song N, Xie J, Jiang H (2009) Up-regulation of 549
divalent metal transporter 1 is involved in 1-methyl-4-phenyl-
550 pyridinium (MPP(+))-induced apoptosis in MES23.5 cells.
551 *Neurobiol Aging* 30(9):1466–1476 552
553

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O envelhecimento é um processo que ocorre naturalmente por toda a vida e está associado com significativo aumento da apoptose em condições fisiológicas e/ou suscetibilidade a morte celular após injúrias (Barja, 2004). A perda de neurônios resulta em prejuízos funcionais tais como demência e deficiência neuro-motora (Higami & Shimokawa, 2000).

O ferro é um metal essencial para o SNC (Zhang *et al.*, 2005). Muitos processos no desenvolvimento normal do SNC, incluindo respiração oxidativa, mielinização dos axônios e síntese de neurotransmissores necessitam de ferro (van Gelder *et al.*, 1998; Hentze *et al.*, 2004). Atualmente, tem sido sugerida relação entre disfunções nas vias de homeostase do ferro e a patogênese de doenças neurodegenerativas (Martin *et al.*, 1998).

O modelo apresentado de sobrecarga de ferro no período neonatal é bem conhecido por induzir acúmulo de ferro em regiões do cérebro, especificamente nos gânglios da base, região associada com déficits na memória de longa duração em camundongos adultos (Fredriksson *et al.*, 1999; Fredriksson *et al.*, 2000) e ratos (Schröder *et al.*, 2001; de Lima *et al.*, 2005a; de Lima *et al.*, 2005b; de Lima *et al.*, 2007; de Lima *et al.*, 2008) e pelo aumento do estresse oxidativo que medeia a morte celular e o prejuízo cognitivo associado ao envelhecimento (Dexter *et al.*, 1989; Butterfield *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Mattson, 2004; Mecocci *et al.*, 2004; de Lima *et al.*, 2005).

O trabalho desenvolvido e cuja síntese está apresentada no Capítulo 2 teve como objetivo avaliar alterações nas proteínas pró-apoptóticas Par-4 e caspase-3 em diferentes regiões do cérebro de ratos adultos e idosos que receberam sobrecarga de ferro no período neonatal e seus respectivos controles. Os resultados demonstram um aumento da imunorreatividade de ambas proteínas nas regiões CA1, CA3 e córtex ao longo do envelhecimento normal. O significativo aumento de Par-4 e caspase-3 nos animais idosos não tratados sugere aumento proeminente e consistente na taxa de apoptose associada ao envelhecimento.

As regiões estudadas do hipocampo indicaram similares perfis de imunorreatividade para ambas proteínas analisadas. CA1 e CA3 mostraram significativo aumento de imunorreatividade de Par-4 e caspase-3 nos animais adultos tratados com ferro quando comparados com seus respectivos controles. Quando os animais idosos dos grupos controle e experimental foram comparados, foi observado significativa diminuição de ambas proteínas nas mesmas áreas. O giro dentado não apresentou diferença significativa nos níveis de caspase-3 e teve aumento de Par-4 nos animais adultos experimentais quando comparados com seus controles e apresentou-se

diminuído quando grupos equivalentes de idosos foram comparados. O estriado não apresentou mudanças significativas para as proteínas estudadas.

Durante o processo de envelhecimento, há aumento do conteúdo normal de ferro nas diferentes regiões do cérebro. O acúmulo deste metal é encontrado em pacientes com DP, DA e DH sendo marcadas pelo aumento da apoptose. (Mattson, 2000).

Estudos *in vitro* (Kooncumchoo *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2008; Hasegawa *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009) tem demonstrado a morte neuronal devido a toxicidade do ferro.

O presente trabalho é a primeira demonstração *in vivo* de que a sobrecarga de ferro induz apoptose no tecido cerebral de ratos adultos.

Os resultados sugerem que há aumento prematuro da apoptose pela suplementação de ferro no período neonatal, já que os níveis de Par-4 e caspase-3 nos animais adultos tratados assemelham-se aos observados nos animais idosos do grupo controle. Estas observações reforçam a idéia de que o acúmulo de ferro acelera a taxa de morte celular, que normalmente aumenta com a idade, e é apoiada por descobertas de aumento de gliose nos animais tratados com ferro já na idade adulta (Fernandez *et al.*, 2009). A suplementação de ferro nos estágios iniciais do desenvolvimento resulta no seu acúmulo no cérebro e toxicidade, aumentando o dano oxidativo. As elevadas taxas de apoptose neuronal na idade adulta resultam nos déficits de memória já descritos nesta fase (Schröder *et al.*, 2001; de Lima *et al.*, 2005a; 2005b). Estes resultados fornecem melhor entendimento do papel do ferro na patogênese de desordens neurodegenerativas e auxiliam para estudos complementares que avaliem os mecanismos apoptóticos envolvidos nestas desordens que são cruciais para estabelecer a real contribuição deste metal e seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

- Andrews NC. Metal transporters and disease. *Curr Opin Chem Biol.* 2002;6: 181-186.
- Arking R. *Biology of aging: observations and principles.* 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Associates Publishers; 1998.
- Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglestein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors α and β protect neurons against amyloid β -peptide toxicity: evidence for involvement of a kB-binding factor and attenuation of peroxide and Ca^{2+} accumulation. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92:9328–9332.
- Barja G. Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences.* 2004;10:595-600.
- Bartus RT. Drugs to treat age-related neurodegenerative problems. The final frontier of medical science. *J Am Geriatr Soc.* 1990;38:680-695.
- Bartzokis G, Cummings J, Perlman S, Hance DB, Mintz J. Increased basal ganglia iron levels in Huntington disease. *Arch Neurol.* 1999;56:569-574.
- Benkovic SA, Connor JR. Ferritin, transferrin and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J Comp Neurol.* 1993;338:97-113.
- Bliss VT, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973;232(2):331-356.
- Boghaert ER, Sells SF, Walid AJ, Malone P, Williams NM, Weinstein MH, Strange R, Rangnekar VM. Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues. *Cell Growth Differ.* 1997;8(8):881-90.
- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. Evidence that amyloid β -peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging.* 2002;23:655-664.
- Camandola S, Mattson MP. Pro-apoptotic action of PAR-4 involves inhibition of NF-kappaB activity and suppression of BCL-2 expression. *J Neurosci Res.* 2000;61(2):134-139.
- Casadesus G, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Qualitative versus quantitative caloric intake: are they equivalent paths to successful aging. *Neurobiol Aging.* 2002;23:747–769.
- Chan SL, Mattson MP. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res.* 1999;58:167-190.

Chan S. L., Tammariello S. P., Estus S., and Mattson M. P. Par-4 mediates trophic factor withdrawal-induced apoptosis of hippocampal neurons: actions prior to mitochondrial dysfunction and caspase activation. *J. Neurochem.* 1999;73:502–512.

Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science.* 1997;278:1966-1968.

Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, *et al.* Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:554-559.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos para o uso de animais de laboratório. [código de ética on-line].1991 [capturado 2008 Jul 22]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>

Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology.* 1998;51:2-17.

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

de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Grazziotin MM, Garcia VA, Dal-Pizzol F, Bromberg E, Schröder N. Selegiline protects against recognition memory impairments induced by neonatal iron treatment. *Exp Neurol.*2005b;196:177-183.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, *et al.* IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J.* 1998;17:2215-23.

Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1989; 52(2):381-9.

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

Díaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell.* 1996;86(5):777-86.

Duan W., Rangnekar V., and Mattson M. P. Par-4 production in synaptic compartments following apoptotic and excitotoxic insults: evidence for a pivotal role in mitochondrial dysfunction and neuronal degeneration. *J. Neurochem.* 1999a;72:2312–2322.

Duan W., Zhang Z., Gash D. M., and Mattson M. P. Participation of Par-4 in degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1999b;6(4):587-597.

Dubey A, Forster MJ, Lal H, Sohal RS. Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 333:189–197.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424.

Eastwood M A. Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease. *Q J Med.* 1999;92:527–530.

Ebaldi M, Srinivasan SK, Baxi MD. Oxidative stress and oxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 1996;48:1-19.

El-Guendy N, Rangnekar VM. Apoptosis by par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. *Exp Cell Res.* 2003;283(1):51-66.

Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia.* 2000;14(8):1514-25.

Falangola MF, Lee S, Nixon RA, Duff K, Helpert JA. Histological Co-localization of iron in A β plaques of PS/APP transgenic mice. *Neurochem Res.* 2005;30(2):201-205.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2005;37:719-727.

Fan TJ, Xia L, Han YR. Mitochondrion and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2001;33:7-12.

Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(17):11025-30.

Fernandez LL, Carmona M, Portero-Otin M, Naudi A, Pamplona R, Schröder N, et al. Effects of Increased Iron Intake During the Neonatal Period on the Brain of Adult AbetaPP/PS1 Transgenic Mice. *J Alzheimers Dis.* 2009. Epub ahead of print.

Fomon SJ, Nelson SE, Ziegler EE. Retention of iron by infants. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:273-90

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

Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T. Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000;119(1):65-74.

- Fredriksson A, Archer T. Postnatal iron overload destroys NA-DA functional interactions. *J Neural Transm.* 2007;114:195-203.
- Frutos S, Moscat J, Diaz-Meco MT. Cleavage of zetaPKC but not lambda/iotaPKC by caspase-3 during UV-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274(16):10765-70.
- Gilman CP, Mattson MP. Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility. *Neuromolec. Med.* 2002;2(2):197-214.
- Greenlund LJ, Korsmeyer SJ, Johnson EM. Role of BCL-2 in the survival and function of developing and mature sympathetic neurons. *Neuron.* 1995;15(3):649–661.
- Greenwood CE, Winocur G. Decline in cognitive function with aging: impact of diet. *Mature Med.* 1999;2:205–209.
- Griffiths PD, Dobson BR, Jones GR, Clark DT. Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease. An in vivo study using extended x-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy. *Brain.* 1999;122(4):667-676.
- Gulyaeva NV, Kudryashov IE, Kudryashova IV. Caspase activity is essential for long-term potentiation. *J Neurosci Res.* 2003;73:853-864.
- Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM, Mattson MP. Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid β -peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci.* 1997;17:4212-22.
- Guo Q, Fu W, Xie J, Luo H, Sells SF, Geddes JW, Bondada V, Rangnekar VM, Mattson MP. Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat Med.* 1998;4(8):957-962.
- Harper A. E. Nutrition, aging and longevity. *Am J Clin Nutr.* 1982;36:737-749.
- Haug H. History of neuromorphometry. *J Neurosci. Methods.* 1986;18:1-17.
- Haus-Wegrzyniak B, Vannucchi MG, Wenk GL. Behavioral and ultrastructural changes induced by chronic neuroinflammation in young rats. *Brain Res.* 2000;859:157-166.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2004;117:285–297.
- Higami Y, Shimokawa I. Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res* (2000) 301:125–132.
- Hill JM, Switzer RC. The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience.* 1984;11:595-603.
- Hirsch EC. Why are nigral catecholaminergic neurons more vulnerable than other cells in Parkinson's disease? *Ann Neurol.* 1992;32:88-93.

Hortelano S, Dallaporta B, Zamzami N, Hisch T, Susin SA, Marzo I, Bosca L, Kroemer G. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 1997; 410:373-377.

Jellinger K, Kienzl E, Rumpelmair G, Paulus W, Riederer P, Sofic E, et al. Iron and ferritin in substantia nigra in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 1993;60:267-272.

Jenner P, Olanow CW. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1998;44: 72-84.

Joseph JA, Bartus RT, Clody D, Morgan D, Finch C; Beer B, Sesack S. Psychomotor performance in the senescent rodent: reduction of deficits via striatal dopamine receptor up-regulation. *Neurobiol Aging.* 1983;4:313-319.

Joseph JA, Denisova NA, Bielinski D, Fisher DR, Shukitt-Hale B. Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications. *Mech Ageing Dev.* 2000;116:141-153.

Kienzl E, Puchinger L, Jellinger K, Linert W, Stachelberger H, Jameson RF. The role of transition metals in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 1995;134:69-78.

Kluger A, Gianutsos JG, Golomb J, Ferris SH, George AE, Franssen E, Reisberg B. Patterns of motor impairment in normal aging, mild cognitive decline, and early Alzheimer's disease. *J Gerontol.* 1997;52:28-39.

Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 1997;17:5089-5100.

Kruman I., Pang Z., Geddes J. W., and Mattson M. P. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.* 1999a;72:529-540.

Kudryashov IE, Onufriev MV, Kudryashova I.V, Gulyaeva NV. Periods of postnatal maturation of hippocampus: synaptic modifications and neuronal disconnection. *Dev Brain Res.* 2001; 132(2):113-120.

Kudryashov IE, Yakovlev AA, Kudryashova IV, Gulyaeva NV. Footshock stress alters early postnatal development of electrophysiological responses and caspase-3 activity in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 2002;332:95-98.

Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene.* 2005;24:5137-48.

Lee RD. The demographic transition: three centuries of fundamental change. *J Econ Perspect.* 2003;17:167-190.

- Leist M, Volbracht C, Kuhnle S, Fava E, Ferrando-May E, Nicotera P. Caspase-mediated apoptosis in neuronal excitotoxicity triggered by nitric oxide. *Mol Med.* 1997;3:750-764.
- Liu R, Liu IY, Bi X, Thompson RF, Doctrow SR, Malfroy B, Baudry M. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8526-31.
- Los M, Stroh C, Jänicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K. Caspases: more than just killers? *Trends Immunol.* 2001;22:31-34.
- Lynch T, Cherny R, Bush AL. Oxidative processes in Alzheimer's disease: the role of abeta-metal interactions. *Exp Gerontol.* 2000;35:445-451.
- Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* 2001;32:367-381.
- Martin WR, Frank QY, Peter SA. Increasing striatal iron content associated with normal aging. *Mov Disord.* 1998;13(2):281-286.
- Masoro EJ. Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol.* 2000;35:299 –305.
- Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K. Activation of NF-kB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of Mn-SOD and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res.* 1997;49(6):681– 697.
- Mattson MP, Duan W, Chan SL, Camandola S. Par-4: an emerging pivotal player in neuronal apoptosis and neurodegenerative disorders. *J Mol Neurosci.* 1999;13(2):17-30.
- Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:120-129.
- Mattson, MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004;430:631-639.
- Mecocci P, Mariani E, Cornacchiola V, Polidori MC. Antioxidants for the treatment of mild cognitive impairment. *Neurol Res.* 2004;26:598–602.
- Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1997; 20:245-267.
- NRC (National Research Council) 1996 Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press, Washington
- Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1991;14:453-501.

Pedersen WA, Luo H, Kruman I, Kasarskis E, Mattson MP. The prostate apoptosis response-4 protein participates in motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J*. 2000;14(7):913-924.

Perfettini JL, Kroemer G. Caspase activation is not death. *Nat Immunol*. 2003;4:308-310.

Pettmann B, Henderson CE. Neuronal Cell death. *Neuron*. 1998;20:633-647.

Rao R, Georgieff MK. Iron in fetal and neonatal nutrition. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2007;12(1):54-63.

Ricklefs RE, Finch CE. *Aging: a natural history*. New York: Scientific American Library; 1995.

Robertson JD, Zhivotovsky B. New methodology is a key to progress. *Cell Cycle*. 2002;1(2):119-121.

Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspase. *EMBO J*. 1997;16:6914-25.

Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ*. 2002;9:3-5.

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

Sells SF, Wood DPJr, Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ, Crist SA, Humphreys S, Rangnekar VM. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen dependent and independent prostate cells. *Cell Growth Differ*. 1994;5:457-466.

Sells SF, Han SS, Muthukumar S, Maddiwar N, Johnstone R, Boghaert E, Gillis D, Liu G, Nair P, Monnig S, Collini P, Mattson MP, Sukhatme VP, Zimmer SG, Wood DP Jr, McRoberts JW, Shi Y, Rangnekar VM. Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1997;17(7):3823-32.

Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*. 1991;67:879-888.

Shimohama S, Tanino H, Fujimoto S. Differential expression of rat brain caspase family proteins during development and aging. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;289(5):1063-66.

Shimohama S, Tanino H, Fujimoto S. Differential subcellular localization of caspase family proteins in the adult rat brain. *Neurosci. Lett*. 2001;315:125-128.

Shukitt-Hale B, Mouzakis G, Joseph JA. Psychomotor and spatial memory performance in aging male Fischer 344 rats. *Exp Gerontol*. 1998;33:615-624.

- Shukitt-Hale B. The effects of aging and oxidative stress on psychomotor and cognitive behavior. *Age*. 1999;22:9-17.
- Sobotka TJ, Whittaker P, Sobotka JM, Brodie RE et al. Neurobehavioral dysfunctions associated with dietary iron overload. *Physiol Behav*. 1996;59(2):213-9.
- Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1387:17-31.
- Tagliatalata G, Robinson R, Perez-Polo JR. Inhibition of nuclear factor κ B (NF κ B) activity induces nerve growth factor-resistant apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res*. 1997;47(2):155-162.
- Taylor EM, Crowe A, Morgan EH. Transferrin and iron uptake by the brain: effects of altered iron status. *J Neurochem*. 1991;57:1584-92.
- Taylor EM, Morgan EH. Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat. *Dev Brain Res*. 1990;55:35-42.
- Tomimatsu Y, Idemoto S, Moriguchi S, Watanabe S, Nakanishi H. Proteases involved in long-term potentiation. *Life Sci*. 2002;72:355-361.
- Troy CM, Salvesen GS. Caspases on the brain. *J Neurosci*. 2002;69:145-150.
- Van Gelder W, Huijskes-Heins MIE, Cleton-Soeteman MI, et al. Iron uptake in blood-brain barrier endothelial cells cultured in iron-depleted and iron-enriched media. *J Neurochem*. 1998;71:1134-1140.
- West MJ, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*. 1990;296:1-22.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*. 1994;344:769-772.
- Wickelgren I. For the cortex, neuron loss may be less than thought. *Science*. 1996;273:48-50.
- Wickelgren I. Is hippocampal cell death a myth? *Science*. 1996;271:1229-30.
- Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem*. 1999;274:20049-52.
- Wyllie, AH. Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol*. 1997;73:189-197.
- Yan XX, Najbauer J, Woo CC, Dashtipour K, Ribak CE, Leon M. Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. *J Comp Neurol*. 2001;433:4-22.
- Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000;407:802-809.

Zecca L, Gallorini M, Schunemann V, Trautwein AX, Gerlach M, Riederer P, et al. Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J Neurochem.* 2001;76:1766-73.

Zhang P, Land W, Lee S et al. Electron tomography of degenerating neurons in mice with abnormal regulation of iron metabolism. *J Struct Biol.* 2005; 150:144–153

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)