

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

***Déficits de Memória Associados ao
Envelhecimento e ao Acúmulo de Ferro Cerebral:
Uso de Rosuvastatina na Estratégia de Neuroproteção***

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
como requisito para a obtenção do grau de Doutor

Autor

Rafael Luiz Rech

Orientador

Professora Doutora Nadja Schröder

Porto Alegre, RS

Agosto, 2010.

Dedicatória

*À minha esposa Cristine com
quem estou construindo uma família*

*À meus pais Mauro e Cléa e
meus irmãos Maurício, Marcus e Gustavo,
por eu ser quem sou*

Agradecimento:

*À Doutora Nadja Schröder e
toda equipe do Laboratório de Neurobiologia
e Biologia do Desenvolvimento
da Faculdade de Biociências, da PUC-RS*

*À Doutor Euler Manenti
Diretor do Instituto de Medicina Vascular
do Hospital Mãe de Deus
e demais colegas da área assistencial
e da pesquisa clínica*

Sumário

RESUMO / p vi

ABSTRACT / p vii

Capítulo 1

1.1- INTRODUÇÃO / 03

1.1.1 – Doenças neurodegenerativas / 03

1.1.2 - Neurodegeneração e a concentração de íon Fe^{+2} no sistema nervoso central / p 05

1.1.3 - Neurodegeneração e colesterol / p 07

1.1.4 - Estatinas / p 09

1.1.4.1 - Rosuvastatina / p 10

1.1.5 - Neurodegeneração e estatinas / p 11

1.2 - OBJETIVOS / p 14

1.2.1 - Objetivo Geral / p 14

1.2.2 - Objetivos Específicos / p 14

Capítulo 2

ARTIGO CIENTÍFICO / p 15

Capítulo 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS / p 22

Referências bibliográficas / p 28

RESUMO

Ao longo dos anos tem sido relatado o aumento dos níveis de ferro em regiões encefálicas de pacientes acometidos por doenças neurodegenerativas, assim como no envelhecimento normal. Em estudos prévios realizados em nosso laboratório foi demonstrado que a sobrecarga de ferro no período neonatal induz disfunção cognitiva em ratos adultos. No presente trabalho, nós avaliamos os efeitos do tratamento com ferro no período neonatal sobre a cognição em ratos idosos. Também investigamos os efeitos de um tratamento subcrônico tardio com rosuvastatina em ratos com déficits cognitivos induzidos por ferro e pelo envelhecimento. Ratos Wistar machos receberam veículo ou 10,0 mg/kg de Fe^{+2} por via oral do 12º ao 14º dia de vida pós-natal. Quando OS animais atingiram a idade de 23 meses, eles receberam injeções intraperitoneais de solução salina ou de rosuvastatina (0,2 ou 2,0 mg/kg) por 21 dias. Vinte e quatro horas depois da última injeção, eles foram submetidos ao treino na tarefa de reconhecimento do objeto novo. As sessões de teste de retenção foram realizadas 1,5 e 24 h após a sessão de treino, a fim de avaliar a memória de curta duração e longa duração, respectivamente.

Os resultados indicaram que os animais envelhecidos que receberam ferro no período neonatal apresentaram déficits de memória mais pronunciados do que os tratados com veículo, sugerindo que o ferro potencializa os prejuízos da memória associada ao envelhecimento. Nos grupos da rosuvastatina os déficits na memória de reconhecimento associados ao tratamento com ferro e ao envelhecimento melhoraram, fornecendo evidências de que as estatinas podem ser consideradas para o tratamento do declínio cognitivo associado ao envelhecimento.

ABSTRACT

Increased levels of iron in brain regions have been reported in neurodegenerative disorders as well as in normal brain aging. We have previously demonstrated that neonatal iron loading induces cognitive impairment in adult rats. Here, we evaluate the effects of neonatal iron treatment on cognition in aged rats. We also investigated the effects of a late subchronic rosuvastatin treatment on iron- and age-induced cognitive deficits. Rats received vehicle or 10.0 mg/kg Fe^{2+} orally at postnatal days 12–14. When animals reached the age of 23 months, they received daily intraperitoneal injections of saline or rosuvastatin (0.2 or 2.0 mg/kg) for 21 days. Twenty-four hours after the last injection, they were submitted to novel object recognition training. Retention test sessions were performed 1.5 and 24 h after training, in order to assess short-term and long-term memory, respectively. Results indicated that aged animals that received iron in the neonatal period showed more severe memory deficits than vehicle-treated ones, suggesting that iron potentiates age-associated memory impairments. Rosuvastatin improved recognition memory deficits associated with iron loading and aging, providing evidence that statins may be considered for the treatment of age-associated cognitive decline.

Capítulo 1

Introdução

e

Objetivos

1. 1. INTRODUÇÃO

1.1.1. Doenças neurodegenerativas

Os mecanismos celulares e moleculares subjacentes à patogênese de várias formas de demência foram descritos na última década. Embora existam muitas semelhanças, também há diferenças importantes. Assim, há uma necessidade de estudos que definam mecanismos de ação e expressão destes, objetivando a busca de tratamentos mais efetivos, que modifiquem o impacto social e econômico negativo resultante do mau prognóstico das demências. Exemplos claros deste impacto são as doenças de Alzheimer e Parkinson (Braak et al 1998).

A Doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência em adultos (Haag, 2009). Caracteriza-se principalmente pela deposição patológica de placas senis compostas de peptídeo β -amilóide ($p\beta a$) no Sistema Nervoso Central (SNC) (Blennow et al., 2006). A deposição de $p\beta a$ está diretamente relacionada a patogênese da Doença de Alzheimer, por preceder outras características patológicas da mesma, tais como o acúmulo de aglomerados de neurofibrilas e proteína Tau hiperfosforilada, evoluindo com morte neuronal cerebral. O $p\beta a$ é derivado da proteína precursora de amilóide (APP). A APP é sintetizada no retículo endoplasmático e transportado para o complexo de Golgi, após a glicosilação pós-transcricional. Durante o processo intracelular, a APP é sujeita a 2 tipos de divisões proteolíticas (Blennow et al., 2006). A doença de Alzheimer é uma doença familiar autossômica dominante. As mutações em três genes da proteína APP do gene no cromossomo 21, a presenilina 1 (PS1) no cromossomo 14, e a presenilina 2 (PS2) no cromossomo 1, resultam em uma forma

autossômica dominante que induz a expressão da doença tão cedo quanto a terceira década de vida (Tanzi et al, 1996). A existência de mais de 50 mutações diferentes no PS1 sugere que a mutação neste gene seja a principal para expressão familiar precoce da doença de Alzheimer (Borchelt et al 1996).

As causas da Doença de Parkinson (DP) são ainda desconhecidas. Estudos visam encontrar respostas em fatores genéticos, toxinas exógenas e endógenas, ou por estresse oxidativo (Hughes et al,1992). O excesso de radicais livres e espécies reativas do oxigênio, nitrogênio ou cloro podem induzir a falência mitocondrial e, conseqüentemente, uma intensa liberação de radicais livres que está associada à injúria isquêmica do miocárdio e ao envelhecimento celular (Lucas 1998), bem como DP e DA, ambas associadas a um decréscimo do conteúdo citoplasmático de glutathiona (GSH) e ao aumento da apoptose neuronal (Merad-Boudia 1998). O estresse oxidativo causa abertura dos canais iônicos na membrana da mitocôndria (poros de transição) e liberação da proteína citocromo c. Este proceso provoca a ativação das caspases que são enzimas executoras da morte celular apoptótica (Ferrari et al, 2002a).

Crescentes evidências indicam que a ativação das caspases e a apoptose estão associadas com uma variedade de doenças neurodegenerativas (Zhang et al, 2008). Neste sentido, sabe-se que o citocromo c liberado, forma um complexo com a proteína ativadora da apoptose (Apaf-1) que cliva as caspases, enzimas ricas em cisteína, que clivam o ácido aspártico e outros aminoácidos, ativando-os para a degradação do DNA e a morte celular. (Ferrari et al,2002b).

Um dos problemas com novos tratamentos propostos para doenças neurodegenerativas como a DP e DA, é que muitos dos benefícios sintomáticos das intervenções, observados nos estudos, são confundidos com neuroproteção.

Porém estes tratamentos não foram antecipadamente programados para ter um efeito sintomático e sim para bloquear a evolução ou induzir neuro regeneração (Schapira & Olanow 2004).

1.1.2. Neurodegeneração e a concentração de íon ferro (Fe^{+2}) no sistema nervoso central (SNC)

Evidências sugerem a existência de uma relação entre as disfunções nas vias de manutenção da homeostasia do Fe^{+2} e a patogênese de doenças neurodegenerativas (Martin et al., 1998). Além disso, demonstram a elevação da concentração de Fe^{+2} na substância negra (SN) de portadores da DP, que é a região cerebral mais afetada pela perda neuronal nessa patologia (Hirsch & Faucheux, 1998). Acredita-se que o Fe^{+2} esteja particularmente envolvido no mecanismo de morte celular na DP, pois a maioria das reações de formação de radicais hidroxil, induzidas pelo metabolismo da dopamina, envolve a presença de Fe^{+2} . Depósitos de Fe^{+2} , também tem sido encontrados no globo pálido e SN de pacientes com a doença de Hallervorden-Spatz (Galvin et al., 2000), no núcleo caudado de indivíduos com doença de Huntington (Bartzokis et al., 1999) e circundando das placas senis de pacientes com a doença de Alzheimer (Lynch et al., 2000). Os efeitos patológicos do Fe^{+2} parecem estar envolvidos com a ataxia de Friedrich, com a epilepsia e a Esclerose Lateral Amiotrófica (Lieu et al., 2001). Além disso, estudos revelaram que há aumento do conteúdo de Fe^{+2} tanto em cérebros de ratos velhos como em humanos idosos quando comparados com indivíduos jovens, indicando que o processo de envelhecimento por si só já envolve um desequilíbrio no metabolismo desse metal (Benkovic & Connor, 1993; Zecca et al., 2001).

O envolvimento de disfunções no metabolismo em diversas doenças relacionadas ao SNC tem estimulado pesquisadores a tentar entender os mecanismos envolvidos no aporte, distribuição e no compartimentar desse elemento no encéfalo. À medida que estes estudos avançaram, ficou evidente o impacto do conteúdo de Fe^{+2} da dieta alimentar sobre o metabolismo desse metal no SNC. Como o período neonatal é crítico para o estabelecimento do conteúdo de Fe^{+2} cerebral nos adultos, torna-se importante estudar os possíveis efeitos tóxicos da sobrecarga desse metal nessa fase (Taylor & Morgan, 1990).

De fato, em um estudo anterior (Fredriksson et al., 1999), utilizando camundongos, descrevemos pela primeira vez, que o tratamento sistêmico com Fe^{+2} durante o período de rápido desenvolvimento cerebral (em humanos este período tem duração do último trimestre da gestação até 1 ano de vida extra uterina) produz acúmulo seletivo de Fe^{+2} nos gânglios da base, além de causar disfunções neuro comportamentais. Nossos resultados mostraram ainda que camundongos (Fredriksson et al., 2000) e ratos (Schröder et al., 2001) tratados com Fe^{+2} do 10º ao 12º dia de vida pós-natal apresentam hipo atividade motora, bem como déficits no aprendizado e memória em duas tarefas comportamentais, o labirinto radial de oito braços e a esquivia inibitória. Em estudo realizado por Kaur e colaboradores (2007), a administração de Fe^{+2} em ratos, em período equivalente ao primeiro ano de vida em humanos e dose equivalente à encontrada em suplementos alimentares para crianças neste período, induziu tardiamente o desenvolvimento de parkinsonismo nestas cobaias.

Recentemente, verificamos que ratos tratados com Fe^{+2} no período neonatal apresentam déficits de memória de reconhecimento quando adultos (de Lima et al, 2007). Verificamos também que a administração de Fe^{+2} no período neonatal induz um aumento significativo na peroxidação lipídica na SN, no córtex

e no hipocampo, bem como um aumento de danos oxidativos a proteínas nestas mesmas regiões cerebrais de ratos adultos. A análise aponta, ainda, a diminuição da atividade da superóxido dismutase (enzima antioxidante) na SN, no córtex e no hipocampo. Esses resultados sugerem que o Fe^{+2} possa estar exercendo seus efeitos deletérios sobre a cognição através da indução do aumento do estresse oxidativo cerebral (de Lima et al., 2005)

1.1.3. Neurodegeneração e colesterol

O colesterol é um componente importante de todas as membranas celulares com função estrutural e como modulador de fluxo. O colesterol é sintetizado no fígado e também obtido pela dieta de produtos derivados animais. No sangue, é encontrado na forma de lipoproteínas, as quais podem ser divididas em quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e lipoproteínas de alta densidade (HDL). A síntese de colesterol é iniciada com Acetil CoA. Três moléculas de acetato são condensadas para formar a 3-hidroxi-d-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), que é então convertida em ácido mevalônico pela HMG-CoA redutase (Nissen et al, 2006). Por uma série de reações, o ácido mevalônico é convertido em colesterol (Liau et al., 2004; Randomized 4S Trial 1994; Collins et al., 2002). O colesterol não pode ser eliminado por catabolismo, deve ser excretado como colesterol livre na bÍlis ou convertido em ácidos biliaree sendo secretado no intestino. Aproximadamente 50% do colesterol secretado no intestino é reabsorvido e redirecionado para o fígado. O remanescente é eliminado nas fezes. Quase todos os ácidos biliaree

secretados (97%) são reabsorvidos do intestino e transportados para o fígado e redistribuídos sistematicamente (Liau et al., 2004).

O nível sérico de colesterol total evolui com uma elevação contínua entre os 20 e 65 anos em ambos os sexos (Sjögren et al., 2005). Depois de 65 anos de idade, os níveis começam a diminuir em homens (Ettinger et al., 1992). Na menopausa existe uma tendência a aumento dos níveis de colesterol total e LDL em mulheres (Brown et al., 1993; Tremollieres et al., 1999).

Níveis de colesterol no sangue são controlados principalmente através da lipoproteína de baixa densidade (LDL) via receptor de LDL, como é chamado (Brown et al 1986). Este receptor está presente na superfície de todas as células do corpo, incluindo os hepatócitos, e tem a capacidade de mediar a captação de lipoproteínas ricas em colesterol, por exemplo a LDL. Algumas das lipoproteínas (apo B100 e apo-E) interagem com o receptor de LDL e facilitam a internalização desta, pelas células. O número de receptores LDL na superfície das células é fortemente regulado (Brown et al 1986). Se o teor de colesterol de uma célula é elevado, menos receptores são sintetizados (ou seja, a expressão do receptor é regulada). Por outro lado, se uma célula requer colesterol, a expressão de receptores de LDL aumenta a síntese de receptores (up regulation). Este sistema mantém a concentração de colesterol intracelular e impede o excessivo e constante acúmulo de LDL, que tem potencial tóxico (Pape et al, 1995).

Estudo publicado por Saczynski et al (2007) nos sugere uma relação entre os genótipos Apo1 e ApoE e riscos diferenciados quanto ao desenvolvimento de demência. O estudo sugere que o genótipo isolado de ApoA1 pode ser fator independente de proteção para demência, magnitude esta, não observada quando associado ao genótipo de ApoE. He et al (2006) sugerem em seu estudo que a permeabilidade cerebral das estatinas pode ser neuroprotetora por limitar

os níveis de oxisterol nas áreas cerebrais em evolução degenerativa. Sugere também associação entre níveis séricos de colesterol, permeabilidade do mesmo no SNC e conseqüente evolução e progressão da neurodegeneração.

Existe interesse crescente na relação potencial dos níveis de colesterol sérico e a patogênese da DA (Li et al, 2010). Realmente, esta contribuição pode ser considerada da perspectiva de duas importantes questões. A primeira é se a modificação na homeostase do colesterol é um fator causal de doenças neurodegenerativas como a DA. A segunda se a homeostase do colesterol é um objetivo a ser alcançado em indivíduos portadores de DA, por exemplo (Gibson et al., 2003). Dados de estudos clínicos em colesterol e DA indicam que aqueles pacientes em tratamento para hipercolesterolemia, com estatinas, têm um risco mais baixo de desenvolver DA quando comparados com indivíduos que não utilizam (Wolozin et al., 2000; Jick et al., 2000).

1.1.4. Estatinas

Os inibidores da HMG-CoA redutase, conhecidos como estatinas, são o grupo de fármacos mais potentes e eficazes para reduzir o colesterol LDL. Desde que foram aprovadas para uso no tratamento da hipercolesterolemia pelo FDA em 1987, diversos estudos clínicos vêm demonstrando que esses medicamentos são capazes de reduzir eventos cardiovasculares, quer na prevenção primária quer na prevenção secundária da doença arterial coronariana (DAC) (Almuti et al., 2006).

Existem evidências crescentes sugerindo que os benefícios das estatinas não são limitados para efeitos em colesterol sérico (Liau et al., 2004). Pacientes tratados têm risco significativamente mais baixo de desenvolver doença vascular cerebral (DVC) e infarto agudo do miocárdio (IAM) quando comparados a pacientes utilizando outros agentes hipolipemiantes, apesar dos níveis de

colesterol alcançados semelhantes (Liau et al., 2004; Randomized 4S 1994; Collins et al., 2002; et al., 2005).

Tem sido sugerido que os efeitos das estatinas, não dependentes da redução dos níveis de colesterol, incluem uma redução do estresse oxidativo e redução da presença de marcadores inflamatórios sistêmicos, realçadas no equilíbrio da função endotelial, e na maior estabilidade de placas ateroscleróticas (Liao et al, 2002; Mason et al., 2003; Massy et al., 2001). Estudos epidemiológicos retrospectivos observaram que aqueles pacientes tratados com estatinas tiveram redução na incidência de DA ou demência, o que não foi observado com outras categorias de hipolipemiantes (Wolozin et al., 2000; Jick et al., 2000; Rockwood et al., 2002.; Kumar et al., 2005). Entre as estatinas mais utilizadas até o momento, nas suas principais indicações, temos a Sinvastatina, Pravastatina, Lovastatina, Fluvastatina, Atorvastatina e Rosuvastatina (Laufs et al, 2002).

1.1.4.1. Rosuvastatina

A Rosuvastatina é a mais potente estatina quanto a sua eficácia na redução do LDL colesterol. Uma dose de 10 mg diariamente produz, em humanos, uma redução média de 43-49% no LDL. A Rosuvastatina não é um substrato para o citocromo P450 3A4 (CYP 3A4), portanto, não interage com potentes inibidores do CYP 3A4 (Nissen et al. 2006). A Rosuvastatina é distribuída predominantemente no plasma ligada a proteínas (aproximadamente 90%), principalmente a albumina. Estudos “in vitro” demonstram que o metabolismo da Rosuvastatina em hepatócitos é mínimo, e ocorre principalmente pelo Citocromo P450 2C9 e com menor contribuição feita pelo Citocromo P450 2C19. O maior metabólito formado pelo Citocromo P450 2C9 é o N-desmetil rosuvastatina, que possui cerca de 50% da atividade inibitória do componente

ativo. Há pouco ou nenhum metabolismo via Citocromo P450 3A4, indicando reduzido potencial para interações com substâncias metabolizadas por esta enzima (Chong et al., 2002).

A Rosuvastatina é predominantemente excretada como composto primário nas fezes, com aproximadamente 90% da dose oral de fármaco excretada de forma inalterada. O remanescente é excretado pela urina (Chong et al., 2002).

Até o presente momento não existem estudos na literatura investigando uma possível atividade neuroprotetora da rosuvastatina.

1.1.5. Neurodegeneração e estatinas

Estudos demonstraram que as estatinas não só regulam a produção de amilóide como também as respostas inflamatórias mediadas pela microglia em placas que contém p β a (Lynch et al., 2000). Na DA encontramos uma intensa resposta inflamatória nas placas de p β a mediada pela microglia (Lee et al, 2010), que acredita-se exacerbe o processo primário da doença. As estatinas causam alterações do citoesqueleto e mudanças morfológicas da micróglia (Cordle & Landreth, 2005). Estes efeitos podem ser revertidos por suplementação exógena de mevalonato, mas não por colesterol. Deste modo, as ações antiinflamatórias das estatinas são independentes da atividade redutora de colesterol. Além disso, as estatinas inibem a reação, levando a supressão da fagocitose p β a microglial e desempenhando possivelmente um papel protetor central no desenvolvimento da DA (Cordle et al., 2005). Li e colaboradores (2010) observaram que a terapia com estatina em idade precoce, mas não em idade tardia, pode ser associada a um menor risco de DA. A relação entre o uso de estatina e DA foi consistente em todos os genótipos da APO E.

A redução de colesterol com estatinas melhora a memória em alguns

casos. Porém, há controvérsia sobre o uso da estatina para reduzir os problemas de memória na DA. Correlações entre os níveis de colesterol e a função cognitiva são ainda inconclusivas (Zandi et al, 2005). Estudos de associação encontraram alguns polimorfismos genéticos que estão relacionados com a função cognitiva, mas outros não, mantendo importantes questionamentos baseados em uma série de resultados aparentemente contraditórios e muitas complexidades (Zani et al, 2004). No entanto, os efeitos do colesterol sobre a aprendizagem e a memória são muito importantes para serem ignorados (Schreurs et al, 2010). Ghribi et al (2006) em seu estudo utilizando coelhos, administrando dieta rica em colesterol, observaram um maior acúmulo de Fe^{+2} cerebral e de beta-amilóide, sugerindo uma relação entre o desequilíbrio dos níveis de colesterol e ou lipídios e os níveis de Fe^{+2} , aumentando o risco do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Em nosso estudo, o modelo de administração de Fe^{+2} no período neonatal (descrito no capítulo 3) foi utilizado como um modelo animal para o estudo de doença neurodegenerativa — a disfunção cognitiva foi utilizada como marcador biológico de dano ou proteção induzidos pelo Fe^{+2} , e pela utilização terapêutica de rosuvastatina. Embora existam alguns estudos na literatura investigando os efeitos das estatinas sobre os déficits de memória induzidos pela demência vascular (Koladiya et al., 2008); lesão cerebral traumática (Wu et al., 2008; Lu et al., 2007) e injeção de beta-amilóide (Kurinami et al., 2008), bem como em modelos de DA em camundongos transgênicos (Li et al., 2006), os efeitos da rosuvastatina sobre o declínio da memória associado à idade não foram investigados. Um estudo prévio mostrou que a rosuvastatina, nas doses de 0,2 e 2,0 mg/kg, exibe efeitos neuroprotetores em ratos (Laufs et al., 2002) sem reduzir os níveis de colesterol. Os efeitos neuroprotetores de 2,0 mg/kg de rosuvastatina

foram equivalentes aos de 0,2 mg/kg. Nesse contexto, propusemos o estudo “Déficits de Memória Associados ao Envelhecimento e ao Acúmulo de Ferro Cerebral: Uso de Rosuvastatina na Estratégia de Neuroproteção” a fim de analisarmos o possível efeito neuroprotetor da Rosuvastatina sobre os déficits de memória induzidos pelo tratamento neonatal com Fe^{+2} e pelo envelhecimento.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor do tratamento com rosuvastatina sobre os déficits de memória induzidos pelo tratamento neonatal com Fe^{+2} e pelo envelhecimento.

1.2.2 Objetivos Específicos

1.2.2.1 Avaliar os efeitos do tratamento neonatal com ferro sobre o prejuízo de memória de reconhecimento associado ao envelhecimento.

1.2.2.2 Avaliar os efeitos do tratamento com rosuvastatina sobre os déficits de memória de reconhecimento induzidos Fe^{+2} no período neonatal.

1.2.2.3 Avaliar os efeitos do tratamento com rosuvastatina sobre os déficits de memória de reconhecimento induzidos pelo envelhecimento.

Capítulo 2

Artigo Científico



Reversal of age-associated memory impairment by rosuvastatin in rats

Rafael Luiz Rech ^{a,1}, Maria Noêmia Martins de Lima ^{a,b,1}, Arethuzia Dornelles ^a, Vanessa Athaíde Garcia ^a, Luisa Azambuja Alcalde ^a, Gustavo Vedana ^a, Nadja Schröder ^{a,b,*}

^aNeurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^bNational Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2009

Received in revised form 31 January 2010

Accepted 2 February 2010

Available online 6 February 2010

Keywords:

Iron

Aging

Recognition memory

Statins

Rosuvastatin

Neurodegeneration

Rats

ABSTRACT

Increased levels of iron in brain regions have been reported in neurodegenerative disorders as well as in normal brain aging. We have previously demonstrated that neonatal iron loading induces cognitive impairment in adult rats. Here, we evaluate the effects of neonatal iron treatment on cognition in aged rats. We also investigated the effects of a late subchronic rosuvastatin treatment on iron- and age-induced cognitive deficits. Rats received vehicle or 10.0 mg/kg Fe²⁺ orally at postnatal days 12–14. When animals reached the age of 23 months, they received daily intraperitoneal injections of saline or rosuvastatin (0.2 or 2.0 mg/kg) for 21 days. Twenty-four hours after the last injection, they were submitted to novel object recognition training. Retention test sessions were performed 1.5 and 24 h after training, in order to assess short-term and long-term memory, respectively. Results indicated that aged animals that received iron in the neonatal period showed more severe memory deficits than vehicle-treated ones, suggesting that iron potentiates age-associated memory impairments. Rosuvastatin improved recognition memory deficits associated with iron loading and aging, providing evidence that statins may be considered for the treatment of age-associated cognitive decline.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Neuroimaging techniques and pathological studies have demonstrated that iron accumulates in the brain during the aging process (Benkovic and Connor, 1993; Xu et al., 2008), having implications for age-related cognitive decline (House et al., 2006; Dröge and Schipper, 2007). However, despite years of investigation, it is still not known why iron levels are abnormally high in some brain regions in neurodegenerative disorders. Also, it is unclear whether iron accumulation in the brain is an initial event that causes neuronal death or a consequence of the disease process.

Although iron plays a central role in neural development as an essential component of oxidative metabolism and a co-factor for numerous enzymes involved in myelin synthesis and neurotransmitters metabolism (Andrews, 1999; Zecca et al., 2004; Youdim, 2008), it has been suggested that excessive iron in brain regions might be associated to neurotoxicity via free radical formation (Thomas and Jankovic, 2004; Berg and Youdim, 2006; Ke and Qian, 2007). In fact, it has been reported that iron levels are increased in the substantia nigra of patients suffering from Parkinson's disease

(PD) (Kienzl et al., 1995; Ebaldi et al., 1996; Griffiths et al., 1999; Gerlach et al., 2006; Kosta et al., 2006; Wallis et al., 2008). In Alzheimer's disease (AD), iron accumulation has been shown to occur in brain regions vulnerable to AD, including the hippocampal formation and association cerebral cortices (Smith et al., 1997). At the microscopic level, it has been demonstrated that iron accumulates in senile plaques (Lovell et al., 1998).

It is now well documented that the neonatal period is critical for the establishment of iron content in the adult brain, and iron uptake by the brain is maximal during the neonatal period (Moos, 2002). Thus, we developed an animal model that enabled us to demonstrate that neonatal deposition of iron in the brain produces cognitive dysfunction in adult life, assessed by different learning and memory paradigms (Fredriksson et al., 1999, 2000; Schröder et al., 2001; de Lima et al., 2005a) and that this cognitive dysfunction was possibly related with increased levels of oxidative stress (Dal-Pizzol et al., 2001; de Lima et al., 2005a). Previous studies have also demonstrated that iron exposure increases the vulnerability to neurotoxic injury in adult life (Fredriksson et al., 2001). Over the years, our research group has evaluated the effects of different pharmacological strategies to protect and/or reverse iron-induced recognition memory deficits in this animal model. For instance, we showed that selegiline (a MAO inhibitor with antioxidant properties) and rolipram (a type 4-specific phosphodiesterase inhibitor) reversed the iron-induced recognition memory deficits (de Lima et al., 2005b, 2008b). Interestingly, we showed

* Corresponding author. Address: Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12D, Sala 340, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203545; fax: +55 51 33203612.

E-mail address: nadja.schröder@pucrs.br (N. Schröder).

¹ These authors contributed equally to this work.

that aged rats presented impairments in long-term recognition memory when compared to young adult animals and the same treatments restored recognition memory in aged animals (de Lima et al., 2005c, 2008b). Here, we analyzed for the first time the effects of neonatal iron treatment on recognition memory in aged rats (24 months old), aiming to evaluate whether iron overload would potentiate age-induced memory impairment.

The class of drugs known as statins [3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors], which reduce cholesterol synthesis are beginning to show benefits in a wide range of neurologic conditions, including AD and PD (Zipp and Aktas, 2006; Orr, 2008; McGuinness et al., 2009). Observational studies have indicated that statin therapy may reduce the risk of dementia and AD. However, no randomized controlled clinical trials have been conducted (Middleton and Yaffe, 2009). Although there are a few studies in the literature investigating the effects of statins on memory impairments induced by vascular dementia (Koladiya et al., 2008); traumatic brain injury (Wu et al., 2008; Lu et al., 2007); and amyloid beta injection (Kurinami et al., 2008); as well as in transgenic mouse model of AD (Li et al., 2006), the effects of rosuvastatin on age-associated memory decline has not been investigated. A previous study has shown that rosuvastatin at the doses of 0.2 and 2.0 mg/kg displays neuroprotective effects in rats (Laufs et al., 2002) without lowering cholesterol levels. The neuroprotective effects of 2.0 mg/kg rosuvastatin was equivalent to that of 20.0 mg/kg (a cholesterol-lowering dose). Thus, we hypothesized that rosuvastatin could be beneficial and that protective effects of rosuvastatin on brain function could be observed at doses lower than those required to reduce cholesterol. Results have shown that iron loading in the neonatal period potentiates age-induced memory deficits, which were reversed by rosuvastatin.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Pregnant Wistar rats were obtained from Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde, Porto Alegre, Brazil. After birth, each litter was adjusted within 48 h to contain eight rat pups. Each pup was maintained together with its respective mother in a plastic cage with sawdust bedding in a room at a temperature of 22 ± 1 °C and a 12 h light/dark cycle. At the age of 4 weeks the pups were weaned and the males were selected and raised in groups of four rats. At postnatal treatment, the animals were supplied with standardized pellet food and tap water *ad libitum*. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the care and Use of Laboratory Animals, and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care. The protocol for this research was approved by the Institutional Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

2.2. Neonatal iron treatment

The neonatal iron treatment has been described in detail elsewhere (Fredriksson et al., 1999, 2000, 2001; Schröder et al., 2001; de Lima et al., 2005a,c, 2007, 2008a). Briefly, 12-day-old rats pups received a single oral daily dose (10.0 ml/kg solution volume) of vehicle (veh; 5% sorbitol in water) (control group) or 10.0 mg/kg of body weight of Fe^{2+} (Ferromyn®, AB Hässle, Göterborg, Sweden; iron concentration in the solution was 1.0 mg/ml) via a metallic gastric tube, for 3 consecutive days (postnatal days 12–14), resulting in a total dose of 30 mg/kg (10 mg/kg daily \times 3).

2.3. Rosuvastatin treatment

At the age of 23 months, rats received a single daily intraperitoneal injection of saline or rosuvastatin (Crestor®, AstraZeneca) diluted in saline solution (at the doses of 0.2 and 2.0 mg/kg) for 21 days. The doses were chosen based on pilot experiments performed in our laboratory.

2.4. Open-field behavior

Behavior during exploration of an open field was performed as previously described (de Lima et al., 2005c, 2008a; Pietá Dias et al., 2007). Open-field behavior was assessed 24 h after the last rosuvastatin administration. The open field was a $40 \times 45 \times 60$ cm arena surrounded by 50 cm high walls, made of plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. Animals were placed in the rear left corner and left to explore the field freely for 5 min. Latency to start locomotion, line crossings, rearings and the number of fecal pellets produced were counted.

2.5. Novel object recognition task

Twenty-four hours after open field exploration, animals were trained and tested in a novel object recognition task. The novel object recognition task was chosen based on previous studies performed in our laboratory indicating that this type of memory is consistently affected by iron neonatal treatment (de Lima et al., 2005a,c, 2007, 2008a) and aging (de Lima et al., 2005b, 2008b; Pietá Dias et al., 2007). The same open-field apparatus used to access open-field behavior was used to perform the novel object recognition task, except that the arena floor was covered with sawdust during the recognition memory task training and test trials. On the first day, rats were given one training trial in which they were exposed to two identical objects: A1 and A2 (Duplo Lego toys). The objects were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. The rats were allowed to freely explore the objects until they had accumulated 30 s of total inspection time or for a maximum of 20 min. On the short-term memory (STM) testing trial (1.5 h after the training session), rats were allowed to explore the open field for 5 min in the presence of two objects: the familiar object A and a novel object B. On the long-term memory (LTM) testing trial (24 h after the training session), rats were allowed to explore the open field for 5 min in the presence of two objects: the familiar object A and a third novel object C. These were placed in the same locations as in the training session. All objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. Between trials the objects were washed with 10% ethanol solution. Object exploration was measured using two stopwatches to record the time spent exploring the objects during the experimental sessions. Exploration was defined as follows: sniffing or touching the object with the nose. Sitting on the object was not considered as exploration. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $T_N/(T_F + T_N)$ [T_F = time spent exploring the familiar object; T_N = time spent exploring the novel object].

2.6. Statistical analysis

Data of open-field behavior were expressed as mean \pm S.E.M. Comparisons among groups were performed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post hoc tests. Data of novel object recognition task were expressed as median (interquartile ranges). Comparisons among groups were performed using a Kruskal–Wallis analysis of variance and Mann–Whitney *U*-tests. Comparisons between training and retention tests recognition indexes within each individual group were performed by Wilcoxon tests. *p* Values

of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. Open-field behavior

The effects of rosuvastatin on open-field behavior in aged rats treated neonatally with iron are shown in Table 1. Aged iron-treated rats that received rosuvastatin (at both doses) showed a decreased number of crossings when compared to the iron + saline group ($p = 0.027$ and $p = 0.007$, respectively), but not when compared to the veh + saline group ($p = 0.381$ and $p = 0.183$, respectively) (Table 1). There were no statistically significant differences among groups regarding the other parameters evaluated (data not shown).

3.2. Novel object recognition task

The effects of rosuvastatin on recognition memory in aged rats treated neonatally with iron are shown in Fig. 1. In order to exclude

the possibility that the effects of iron, aging or rosuvastatin would alter general behavioral parameters that could interfere with the memory acquisition process, we used a training protocol in which rats had to accumulate 30 s of total exploration of both objects. Statistical comparison of latency to reach the criterion of 30 s exploring both objects during the object recognition training session was used as an index of motor and exploratory activity. Kruskal–Wallis analysis of variance revealed no significant differences in the latency to reach criterion among groups ($H = 2.784$, $df = 5$, $p = 0.733$), Table 2.

Our previous results demonstrated that aged rats presented long-term recognition memory deficits when compared to young animals, although they presented normal short-term recognition memory (de Lima et al., 2005c, 2008a,b). Here, we replicated these findings, since Wilcoxon comparisons showed that the aged rats that received vehicle in the neonatal period presented significant preference towards the novel object in the STM retention test ($p = 0.005$), while they did not in the LTM retention test ($p = 0.445$).

Interestingly, Mann–Whitney comparisons demonstrated that aged rats that received iron in the neonatal period and saline in the adulthood showed a poorer performance in the STM retention test when compared to rats that received vehicle in the neonatal period and saline in the adulthood ($p = 0.019$), in addition to the already expected impairment in LTM retention test, suggesting that iron loading potentiates the naturally occurring age-associated memory impairment.

Aged rats that received vehicle in the neonatal period and rosuvastatin (0.2 mg/kg) presented a better performance in the LTM retention test than animals given saline, as Mann–Whitney comparisons showed that their recognition indexes were higher than the veh + sal group ($p = 0.043$). The higher dose of rosuvastatin (2.0 mg/kg) had not the same beneficial effect, since Mann–Whitney comparisons showed that the recognition indexes of this group were not significantly different from aged rats that received vehicle in the neonatal period and saline in the adulthood ($p = 0.315$ for LTM retention test).

Aged rats that received iron in the neonatal period and rosuvastatin (0.2 mg/kg) in the adulthood presented a better

Table 1
Number of crossings in the open field in neonatal iron and rosuvastatin-treated aged rats.

Group	N	Mean \pm S.E.M.
Vehicle (oral) + saline ip	07	36.9 \pm 6.4
Vehicle (oral) + ros 0.2 mg/kg ip	08	35.7 \pm 3.4
Vehicle (oral) + ros 2.0 mg/kg ip	10	26.2 \pm 4.4
Iron 10.0 mg/kg (oral) + saline ip	10	45.2 \pm 5.1
Iron 10.0 mg/kg (oral) + ros 0.2 mg/kg ip	09	23.9 \pm 3.5*
Iron 10.0 mg/kg (oral) + ros 2.0 mg/kg ip	10	21.5 \pm 3.7**
Total	54	31.5 \pm 2.1

Open-field behavior was evaluated 24 h after the last injection of rosuvastatin in aged rats (24 months old). Data are expressed as mean \pm S.E.M. Differences in the number of crossings between iron plus saline group from other groups are indicated as: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (Tukey HSD post hoc tests).

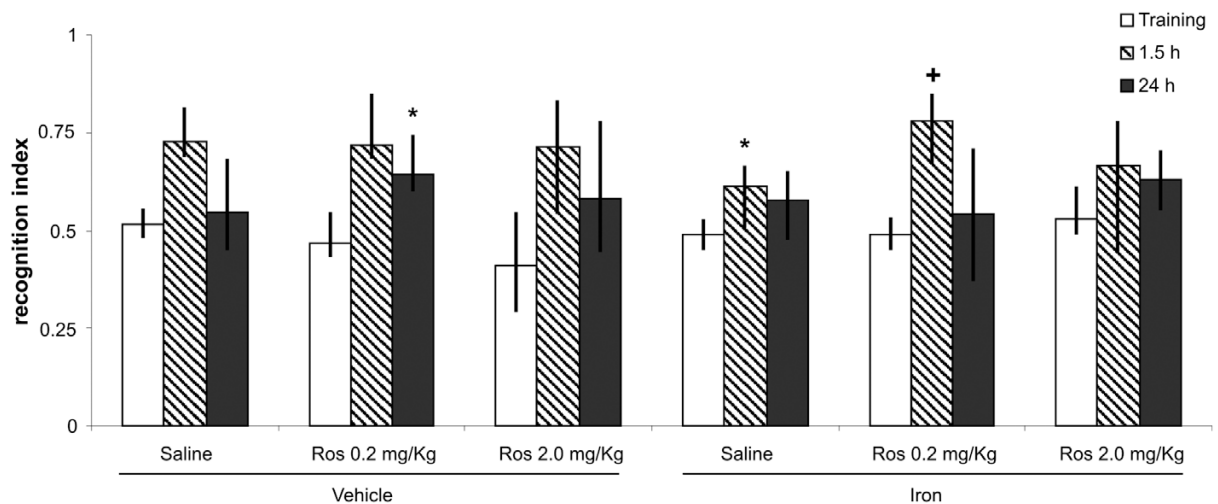


Fig. 1. Effects of neonatal iron and rosuvastatin treatment on recognition memory in aged rats. Behavioral testing was carried out when animals were 24 months old. The recognition memory task was performed 24 h after the open-field behavior evaluation. Short-term memory retention test was performed 1.5 h after training and long-term memory retention test 24 h after training. The proportion of the total exploration time that the animal spent investigating the novel object was the "Recognition Index" expressed by the ratio $T_N/(T_F + T_N)$, T_F = time spent exploring the familiar object and T_N = time spent exploring the novel object. Data expressed as median [interquartile ranges], $N = 7$ –10 per group. Differences between vehicle + saline vs other groups are indicated as: * $p < 0.05$ (Mann–Whitney U -test); and between iron + saline vs other groups as: + $p < 0.05$ (Mann–Whitney U -test).

Table 2

Latency to reach the criterion of 30 s exploring both objects during the object recognition training session in aged rats submitted to neonatal iron and rosuvastatin treatment in old age.

Group	N	Mean \pm S.E.M.
Vehicle (oral) + saline ip	07	339.0 \pm 40.4
Vehicle (oral) + ros 0.2 mg/kg ip	08	346.4 \pm 35.8
Vehicle (oral) + ros 2.0 mg/kg ip	10	350.7 \pm 35.4
Iron 10.0 mg/kg (oral) + saline ip	10	356.3 \pm 35.0
Iron 10.0 mg/kg (oral) + ros 0.2 mg/kg ip	09	345.2 \pm 45.6
Iron 10.0 mg/kg (oral) + ros 2.0 mg/kg ip	10	425.2 \pm 43.1
Total	54	362.4 \pm 15.9

Novel object recognition training session was performed 24 h after the open-field behavior evaluation in aged rats (24 months old). Statistical comparison of latency to reach the criterion of 30 s exploring both objects during the object recognition training session showed no statistically significant differences among experimental groups. Data are expressed as mean \pm S.E.M (s).

performance in STM retention test than animals given iron and vehicle, as Mann–Whitney comparisons showed that their recognition indexes were higher than the iron + veh group ($p = 0.028$). The higher dose of rosuvastatin (2.0 mg/kg) was also ineffective in the group that received iron in the neonatal period ($p = 0.247$ for STM retention test and $p = 165$ for LTM retention test in comparison to vehicle + saline; $p = 0.529$ for STM retention test and $p = 0.631$ for LTM retention test in comparison to iron + saline). Taken together, these results indicate that rosuvastatin ameliorates memory impairments induced by aging and iron loading.

4. Discussion

We have previously shown that neonatal iron exposure induces long-term recognition memory deficits in adult life (de Lima et al., 2005a,b, 2007, 2008b) and that aged rats naturally present recognition memory deficits (de Lima et al., 2005c, 2008a; Pietá Dias et al., 2007). Previous studies determined that a 3-day iron administration regimen dose-dependently produces iron accumulation in the substantia nigra of adult rats (Schröder et al., 2001) and basal ganglia of adult mice (Fredriksson et al., 1999, 2000). Although in the present study we have not measured iron levels in brain regions, we used the same dose and time schedule of administration, known to induce iron accumulation in the brain. Object recognition memory is known to rely on the integrity of the striatum (Schröder et al., 2003). Also, evidence has indicated that the hippocampus plays a key role in object recognition memory formation (Rampon et al., 2000; de Lima et al., 2006). Accordingly, recent studies from our laboratory have indicated that neonatal iron treatment increases apoptotic markers and induces gliosis in the hippocampus of adult rats (submitted manuscript), which might be related to iron-induced memory deficits.

Here, we extended these findings by demonstrating for the first time that aged animals that received iron in the neonatal period presented more severe memory deficits. These findings are in agreement with the idea that the age-related cognitive decline could be related to the increased levels of iron reported in healthy elderly subjects (Dröge and Schipper, 2007; House et al., 2006) and in elderly subjects affected by neurodegenerative diseases, in which there is more pronounced brain iron accumulation accompanied by more severe cognitive decline (Kienzl et al., 1995; Ebaldi et al., 1996; Griffiths et al., 1999; Lynch et al., 2000; Pratico et al., 2002; Ong and Farooqui, 2005; Kosta et al., 2006; Quintana et al., 2006; Gerlach et al., 2006; Wallis et al., 2008; Ding et al., 2009). It is also noteworthy that rosuvastatin was not able to rescue long-term memory in aged animals treated with iron, supporting the concept that iron administration worsened age-associated recognition memory impairment.

The training protocol used in the present study, in which animals are trained to meet the criterion of 30 s exploring objects was chosen in order to overcome the possible motor and motivational/exploratory effects induced by aging or pharmacological treatments. Although we found a significantly decreased number of crossings in groups treated with iron plus rosuvastatin compared to iron–saline group, it is unlikely that this alteration influenced the animals' capacity to explore the objects, since there was no difference among groups in the time required to reach criterion. Moreover, the number of crossings performed by rats given iron plus rosuvastatin and the control group treated with vehicle plus saline did not differ, and the number of rearings, another parameter related to motor and exploratory activity, was not altered.

Over the years, our research group has evaluated the effects of different pharmacological strategies to protect and/or reverse iron-induced recognition memory deficits in our animal model based on neonatal iron loading. Thus, we showed that selegiline (a MAO inhibitor with antioxidants properties), and rolipram (a type 4-specific phosphodiesterase inhibitor) treatments were able to reverse the iron-induced recognition memory deficits (de Lima et al., 2005b, 2008b). Interestingly, we showed that aged rats presented impairments in the long-term recognition memory when compared to young animals and that selegiline and rolipram treatments also restored recognition memory in aged animals (de Lima et al., 2005c, 2008b).

Here we show that rosuvastatin reversed the age-associated long-term memory impairment as well as the short-term memory impairment produced by the combination of neonatal iron treatment and aging. Statins are known to reduce cholesterol levels by inhibiting HMG-CoA reductase, a key enzyme in cholesterol biosynthesis. It has been suggested that the beneficial effects of statins on neurodegeneration may not be only due to their cholesterol-lowering effects, but also, to their cholesterol-independent or pleiotropic effects, such as improving blood-flow, reducing coagulation, modulating the immune system, reducing oxidative damage (Zipp and Aktas, 2006; Stefani and Liguri, 2009; van der Most et al., 2009). Although we have not measured cholesterol levels, the pre-clinical pharmacology of rosuvastatin indicates that the dose required to completely inhibit hepatic synthesis of cholesterol in rats is much higher (12 mg/kg) than the doses used in the present study (McTaggart et al., 2001). Thus, we believe that the effects found in the present study may be, at least in part, unrelated to cholesterol-lowering effects.

Accordingly, increasing evidence has shown that statins are able to protect against oxidative damage by inhibiting different steps of the free radical generation pathways and enhancing the expression of antioxidant defense enzymes (Koladiya et al., 2008; Kumagai et al., 2004; Bösel et al., 2005; Hayashi et al., 2005). Rosuvastatin have also been shown to possess anti-oxidative effects in *in vitro* and *in vivo* models (Otto et al., 2006; Ajith et al., 2008; Schupp et al., 2008). In addition, statins can stimulate neurogenesis and neuronal survival via other mechanisms that do not necessarily depend on lowering cholesterol, including up-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), activation of protein kinase pathways, and increased phosphorylation of cAMP-binding response element (CREB) (Wu et al., 2008).

Although the role of cholesterol synthesis inhibitors as neuro-protective agents is still controversial, a few clinical studies have indicated that they could exert beneficial effects in the treatment of the age-related cognitive decline (Bernick et al., 2005; Cramer et al., 2008; Sparks, 2009) and the cognitive decline associated with neurodegenerative diseases (Wolozin et al., 2007; Wahner et al., 2008; Arvanitakis et al., 2008; Haag et al., 2009). Here we show that rosuvastatin improved recognition memory deficits associated with iron loading and aging. We hypothesized that

one possible mechanism by which rosuvastatin promoted the cognitive improvement seen in our study may be associated with its anti-oxidative properties. In previous studies we have demonstrated that neonatal iron treatment is associated with increased oxidative stress in brain regions related to memory formation (de Lima et al., 2005a), and that reduction of oxidative damage to proteins in the cortex and hippocampus in aged rats was associated with amelioration of age-induced memory impairment (Pietá Dias et al., 2007). While further studies will be required in order to precisely understand the mechanisms by which rosuvastatin ameliorated iron-induced memory deficits, we do not know why the lowest dose used in the present study was effective and the highest was not. However, a number of studies examining the effects of injections of both memory-enhancing (McGaugh, 1989) and memory-impairing drugs show that many treatments produce an inverted-U dose–response curve where specific doses are optimal whereas both lower and higher doses are ineffective.

In summary, the present study supports the view that cognitive deficits associated with aging and neurodegenerative disorders might be related to the deleterious effects of iron accumulation in the brain and provides the first evidence that statins ameliorate age-associated memory dysfunction.

Acknowledgement

This research was supported by CNPq-MCT grants 474739/2007-4 and 301368/2006-6 to N.S.

References

- Ajith, T.A., Riji, T., Anu, V., 2008. In vitro anti-oxidant and DNA protective effects of the novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor rosuvastatin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35 (5–6), 625–629.
- Andrews, N.C., 1999. Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 341 (26), 1989–1995.
- Arvanitakis, Z., Schneider, J.A., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Kelly, J.F., Evans, D.A., Bennett, D.A., 2008. Statins, incident Alzheimer disease, change in cognitive function, and neuropathology. *Neurology* 70 (19 Pt 2), 1795–1802.
- Benkovic, S.A., Connor, J.R., 1993. Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.* 338, 97–113.
- Berg, D., Youdim, M.B., 2006. Role of iron in neurodegenerative disorders. *Top. Magn. Reson. Imaging* 17 (1), 5–17.
- Bernick, C., Katz, R., Smith, N.L., Rapp, S., Bhadelia, R., Carlson, M., Kuller, L., Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group, 2005. Statins and cognitive function in the elderly: the cardiovascular health study. *Neurology* 65 (9), 1388–1394.
- Bösel, J., Gandor, F., Harms, C., Synowitz, M., Harms, U., Djoufack, P.C., Megow, D., Dirnagl, U., Hörtnagl, H., Fink, K.B., Endres, M., 2005. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J. Neurochem.* 92 (6), 1386–1398.
- Cramer, C., Haan, M.N., Galea, S., Langa, K.M., Kalbfleisch, J.D., 2008. Use of statins and incidence of dementia and cognitive impairment without dementia in a cohort study. *Neurology* 71 (5), 344–350.
- Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Frota Jr., M.L.C., Andradas, M.E., Caregnato, F.F., Vianna, M.R.M., Schröder, N., Quevedo, J., Izquierdo, I., Archer, T., Moreira, J.C.F., 2001. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rats. *Dev. Brain Res.* 130, 109–114.
- de Lima, M.N., Dias, C.P., Torres, J.P., Dornelles, A., Garcia, V.A., Scalco, F.S., Guimarães, M.R., Petry, R.C., Bromberg, E., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., Schröder, N., 2008a. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol. Aging* 29 (7), 1052–1059.
- de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Garcia, V.A., Guimarães, M.R., Scalco, F.S., Roesler, R., Schröder, N., 2008b. Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology* 55 (5), 788–792.
- de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Caldana, F., Grazziotin, M.M., Scalco, F.S., Guimarães, M.R., Bromberg, E., Franke, S.I., Henriques, J.A., Schröder, N., 2007. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 570 (1–3), 111–114.
- de Lima, M.N., Luft, T., Roesler, R., Schröder, N., 2006. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci. Lett.* 405, 142–146.
- de Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D.C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Schroder, N., 2005a. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur. J. Neurosci.* 21 (9), 2521–2528.
- de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Grazziotin, M.M., Garcia, V.A., Dal-Pizzol, F., Bromberg, E., Schroder, N., 2005b. Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp. Neurol.* 196 (1), 177–183.
- de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R., Schroder, N., 2005c. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with L-deprenyl. *Exp. Gerontol.* 40 (6), 506–511.
- Ding, B., Chen, K.M., Ling, H.W., Sun, F., Li, X., Wan, T., Chai, W.M., Zhang, H., Zhan, Y., Guan, Y.J., 2009. Correlation of iron in the hippocampus with MMSE in patients with Alzheimer's disease. *J. Magn. Reson. Imaging* 29 (4), 793–798.
- Dröge, W., Schipper, H.M., 2007. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 6 (3), 361–370.
- Ebaldi, M., Srinivasan, S.K., Baxi, M.D., 1996. Oxidative stress and oxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 48, 1–19.
- Fredriksson, A., Schröder, N., Eriksson, P., Izquierdo, I., Archer, T., 2001. Neonatal iron potentiates adult MPTP-induced neurodegenerative and functional deficits. *Parkinsonism Relat. Disord.* 7 (2), 97–105.
- Fredriksson, A., Schröder, N., Eriksson, P., Izquierdo, I., Archer, T., 2000. Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period. *Dev. Brain Res.* 119, 65–74.
- Fredriksson, A., Schröder, N., Eriksson, P., Izquierdo, I., Archer, T., 1999. Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159, 25–30.
- Gerlach, M., Double, K.L., Youdim, M.B., Riederer, P., 2006. Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients. *J. Neural. Transm.* 70, 133–142.
- Griffiths, P.D., Dobson, B.R., Jones, G.R., Clarke, D.T., 1999. Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease. An in vivo study using extended X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy. *Brain* 122 (4), 667–673.
- Haag, M.D., Hofman, A., Koudstaal, P.J., Stricker, B.H., Breteler, M.M., 2009. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80 (1), 13–17.
- Hayashi, T., Hamakawa, K., Nagotani, S., Jin, G., Li, F., Deguchi, K., Sehara, Y., Zhang, H., Nagano, I., Shoji, M., Abe, K., 2005. HMG CoA reductase inhibitors reduce ischemic brain injury of Wistar rats through decreasing oxidative stress on neurons. *Brain Res.* 1037 (1–2), 52–58.
- House, M.J., St. Pierre, T.G., Foster, J.K., Martins, R.N., Clarnette, R., 2006. Quantitative MR imaging R2 relaxometry in elderly participants reporting memory loss. *A. J. N. R.* 27, 430–439.
- Ke, Y., Qian, Z.M., 2007. Brain iron metabolism: neurobiology and neurochemistry. *Prog. Neurobiol.* 83 (3), 149–173.
- Kienzl, E., Puchinger, L., Jellinger, K., Linert, W., Stachelberger, H., Jameson, R.F., 1995. The role of transition metals in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 134, 69–78.
- Koladiya, R.U., Jaggi, A.S., Singh, N., Sharma, B.K., 2008. Ameliorative role of atorvastatin and pitavastatin in L-Methionine induced vascular dementia in rats. *BMC Pharmacol.* 8, 14.
- Kosta, P., Argyropoulou, M.I., Markoula, S., Konitsiotis, S., 2006. MRI evaluation of the basal ganglia size and iron content in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol.* 253 (1), 26–32.
- Kumagai, R., Oki, C., Muramatsu, Y., Kurosaki, R., Kato, H., Araki, T., 2004. Pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, reduces hippocampal damage after transient cerebral ischemia in gerbils. *J. Neural. Transm.* 111 (9), 1103–1120.
- Kurinami, H., Sato, N., Shinohara, M., Takeuchi, D., Takeda, S., Shimamura, M., Ogihara, T., Morishita, R., 2008. Prevention of amyloid beta-induced memory impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid beta accumulation and oxidative stress in amyloid beta injection mouse model. *Int. J. Mol. Med.* 21 (5), 531–537.
- Laufs, U., Gertz, K., Dirnagl, U., Böhm, M., Nickenig, G., Endres, M., 2002. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res.* 942 (1–2), 23–30.
- Li, L., Cao, D., Kim, H., Lester, R., Fukuchi, K., 2006. Simvastatin enhances learning and memory independent of amyloid load in mice. *Ann. Neurol.* 60 (6), 729–739.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., Markesbery, W.R., 1998. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* 158, 47–52.
- Lu, D., Qu, C., Goussev, A., Jiang, H., Lu, C., Schallert, T., Mahmood, A., Chen, J., Li, Y., Chopp, M., 2007. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 24 (7), 1132–1146.
- Lynch, T., Cherny, R., Bush, A.I., 2000. Oxidative processes in Alzheimer's disease: the role of Abeta-metal interactions. *Exp. Gerontol.* 35, 445–451.
- McGaugh, J.L., 1989. Dissociating learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Res. Bull.* 23 (4–5), 339–345.
- McGuinness, B., Craig, D., Bullock, R., Passmore, P., 2009. Statins for the prevention of dementia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 15 (2), CD003160.
- McTaggart, F., Buckett, L., Davidson, R., Holdgate, G., McCormick, A., Schneck, D., Smith, G., Warwick, M., 2001. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am. J. Cardiol.* 87, 288–32B.
- Middleton, L.E., Yaffe, K., 2009. Promising strategies for the prevention of dementia. *Arch. Neurol.* 66 (10), 1210–1215.

- Moos, T., 2002. Brain iron homeostasis. *Dan. Med. Bull.* 49 (4), 279–301.
- Ong, W.Y., Farooqui, A.A., 2005. Iron, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 8 (2), 183–200.
- Orr, J.D., 2008. Statins in the spectrum of neurologic disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* 10 (1), 11–18.
- Otto, A., Fontaine, J., Tschirhart, E., Fontaine, D., Berkenboom, G., 2006. Rosuvastatin treatment protects against nitrate-induced oxidative stress in eNOS knockout mice: implication of the NAD(P)H oxidase pathway. *Br. J. Pharmacol.* 148 (4), 544–552.
- Pietá Dias, C., de Lima, M.N.M., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Garcia, V.A., Scalco, F.S., Guimarães, M.R., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., Schröder, N., 2007. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience* 146 (4), 1719–1725.
- Pratico, D., Clark, C.M., Liun, F., Rokach, J., Lee, V.Y., Trojanowski, J.Q., 2002. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59 (6), 972–976.
- Quintana, C., Bellefqih, S., Laval, J.Y., Guerquin-Kern, J.L., Wu, T.D., Avila, J., Ferrer, I., Arranz, R., Patino, C., 2006. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *J. Struct. Biol.* 153 (1), 42–54.
- Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kiyin, M., Tsien, J.Z., 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* 3, 238–244.
- Schröder, N., O'Dell, S.J., Marshall, J.F., 2003. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49, 89–96.
- Schröder, N., Fredriksson, A., Vianna, M.R.M., Roesler, R., Izquierdo, I., Archer, T., 2001. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav. Brain Res.* 124, 77–85.
- Schupp, N., Schmid, U., Heidland, A., Stopper, H., 2008. Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. *Atherosclerosis* 199 (2), 278–287.
- Smith, M.A., Harris, P.L., Sayre, L.M., Perry, G., 1997. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9866–9866.
- Sparks, L., 2009. Statins and cognitive function. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80 (1), 1–2.
- Stefani, M., Liguri, G., 2009. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. *Curr. Alzheimer Res.* 6 (1), 15–29.
- Thomas, M., Jankovic, J., 2004. Neurodegenerative disease and iron storage in the brain. *Curr. Opin. Neurol.* 17 (4), 437–442.
- Wahner, A.D., Bronstein, J.M., Bordelon, Y.M., Ritz, B., 2008. Statin use and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 70 (16 Pt 2), 1418–1422.
- Wallis, L.L., Paley, M.N., Graham, J.M., Grünwald, R.A., Wignall, E.L., Joy, H.M., Griffiths, P.D., 2008. MRI assessment of basal ganglia iron deposition in Parkinson's disease. *J. Magn. Reson. Imaging* 28 (5), 1061–1067.
- Wolozin, B., Wang, S.W., Li, N.C., Lee, A., Lee, T.A., Kazis, L.E., 2007. Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *BMC Med.* 5, 20.
- Wu, H., Lu, D., Jiang, H., Xiong, Y., Qu, C., Li, B., Mahmood, A., Zhou, D., Chopp, M., 2008. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 25 (2), 130–139.
- van der Most, P.J., Dolga, A.M., Nijholt, I.M., Luiten, P.G., Eisel, U.L., 2009. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 88 (1), 64–75.
- Xu, X., Wang, Q., Zhang, M., 2008. Age, gender, and hemispheric differences in iron deposition in the human brain: an in vivo MRI study. *Neuroimage* 40 (1), 35–42.
- Youdim, M.B., 2008. Brain iron deficiency and excess; cognitive impairment and neurodegeneration with involvement of striatum and hippocampus. *Neurotox. Res.* 14 (1), 45–56.
- Zecca, L., Youdim, M.B., Riederer, P., Connor, J.R., Crichton, R.R., 2004. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (11), 863–873.
- Zipp, F., Aktas, O., 2006. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 29 (9), 518–527.

Capítulo 3

Considerações Finais

Considerações Finais

Mostramos previamente que a exposição neonatal ao ferro induz déficits de memória de reconhecimento a longo prazo na vida adulta (de Lima et al., 2005a,b, 2007, 2008b) e que os ratos velhos apresentam naturalmente déficits de memória de reconhecimento (de Lima et al., 2005c, 2008a; Pietá Dias et al., 2007). Estudos prévios determinaram que um regime de administração de ferro por três dias produz acúmulo de ferro de maneira dose-dependente na SN de ratos adultos (Schröder et al., 2001) e nos gânglios da base de camundongos adultos (Fredriksson et al., 1999, 2000). Embora no presente estudo não tenhamos medido os níveis de ferro nas regiões do cérebro, usamos a mesma dose e regime de administração que sabidamente induzem acúmulo de ferro no cérebro. Sabe-se que a memória de reconhecimento de objetos depende da integridade do estriado (Schröder et al., 2003). Além disso, evidências indicam que o hipocampo desempenha um papel chave na formação da memória de reconhecimento de objetos (Rampon et al., 2000; de Lima et al., 2006). Da mesma forma, estudos recentes de nosso laboratório indicaram que o tratamento neonatal com ferro aumenta os marcadores de apoptose e induz gliose no hipocampo de ratos adultos (Miwa et al., 2010; Fernandez et al., 2010) que poderiam estar relacionados a déficits de memória induzidos pelo ferro. Aqui, ampliamos estes achados demonstrando pela primeira vez que os animais velhos que receberam ferro no período neonatal apresentaram déficits de memória mais severos. Estes achados estão em concordância com a idéia de que o declínio cognitivo relacionado à idade poderia estar relacionado aos níveis aumentados de ferro relatados em indivíduos idosos saudáveis (Dröge e Schipper, 2007; House et al., 2006) e em pessoas idosas afetadas por doenças neurodegenerativas, em que há

um acúmulo mais pronunciado de ferro no cérebro, acompanhado por um declínio cognitivo mais severo (Kienzl et al., 1995; Ebaldi et al., 1996; Griffiths et al., 1999; Lynch et al., 2000; Pratico et al., 2002; Ong e Farooqui, 2005; Kosta et al., 2006; Quintana et al., 2006; Gerlach et al., 2006; Wallis et al., 2008; Ding et al., 2009). Também deve-se notar que a rosuvastatina não foi capaz de recuperar a memória de longo prazo em animais velhos tratados com ferro, suportando o conceito de que a administração de ferro pioraria a deficiência de memória de reconhecimento associada à idade

No decorrer dos anos, nosso grupo de pesquisa avaliou os efeitos de diferentes estratégias farmacológicas para proteger e/ou reverter os déficits de memória de reconhecimento induzidos pelo ferro em nosso modelo animal, baseado na carga de ferro neonatal (de Lima et al, 2008b). Assim, mostramos que os tratamentos com selegilina (um inibidor da MAO com propriedades antioxidantes) e roliprame (um inibidor específico da fosfodiesterase tipo 4) foram capazes de reverter os déficits de memória de reconhecimento induzidos pelo tratamento com ferro neonatal em roedores (de Lima et al., 2005b, 2008b). Demonstramos que os ratos velhos apresentaram deficiências na memória de reconhecimento de longa duração quando comparados aos animais jovens, e que os tratamentos com selegilina e roliprame também restauraram a memória de reconhecimento nos animais velhos (de Lima et al., 2005c, 2008b).

Aqui, mostramos que a rosuvastatina reverteu o déficit de memória de reconhecimento de longa duração associado à idade, bem como o déficit de memória de curta duração produzido pela combinação do tratamento neonatal com ferro e do envelhecimento.

Sabe-se que as estatinas reduzem os níveis de colesterol pela inibição da HMG-CoA redutase, uma enzima chave na biossíntese de colesterol. Foi sugerido

que os efeitos benéficos das estatinas sobre a neurodegeneração podem não ser resultantes somente de seus efeitos redutores de colesterol, mas também de seus efeitos colesterol-independentes ou pleiotrópicos, como a melhora do fluxo sanguíneo, redução da coagulação, modulação do sistema imune, redução da lesão oxidativa (Zipp e Aktas, 2006; Stefani e Liguri, 2009; van der Most et al., 2009). Embora não tenhamos medido os níveis de colesterol, a farmacologia pré-clínica da rosuvastatina indica que a dose requerida para inibir completamente a síntese hepática do colesterol em ratos (12 mg/kg) é muito maior que as doses usadas no presente estudo (McTaggart et al., 2001). Assim, acreditamos que os efeitos encontrados no presente estudo podem ser, ao menos em parte, independentes dos efeitos redutores do colesterol.

Da mesma forma, evidências crescentes têm demonstrado que as estatinas são capazes de proteger contra danos oxidativos, inibindo diferentes etapas das vias de geração de radicais livres e aumentando a expressão de enzimas de defesa antioxidantes (Koladiya et al., 2008; Kumagai et al., 2004; Bösel et al., 2005; Hayashi et al., 2005). Porém, estudos recentes, realizados com simvastatina, não demonstraram melhora quanto a memória de pacientes com déficit cognitivo e memória (Serrano-Pozo 2010, Benito-León 2010). A rosuvastatina também mostrou possuir efeitos anti-oxidativos em modelos *in vitro* e *in vivo* (Otto et al., 2006; Ajith et al., 2008; Schupp et al., 2008). Além disso, as estatinas podem estimular a neurogênese e sobrevivência neuronal por outros mecanismos que não dependem necessariamente da redução do colesterol, incluindo a regulação positiva do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), vias de ativação da proteína quinase e fosforilação aumentada do elemento de resposta à ligação do AMPc (CREB) (Wu et al., 2008). Embora o papel dos inibidores da síntese do colesterol como agentes neuroprotetores ainda seja

controverso, alguns estudos clínicos indicam que eles poderiam exercer efeitos benéficos no tratamento do declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento (Bernick et al., 2005; Cramer et al., 2008; Sparks, 2009) e do declínio cognitivo associado a doenças neurodegenerativas (Wolozin et al., 2007; Wahner et al., 2008; Arvanitakis et al., 2008; Haag et al., 2009). Aqui, mostramos que a rosuvastatina melhorou os déficits de memória de reconhecimento associados à sobre carga de ferro e ao envelhecimento. Propomos a hipótese de que um mecanismo possível pelo qual a rosuvastatina promoveria a melhora cognitiva observada em nosso estudo poderia estar associado a suas propriedades antioxidativas. Em estudos prévios, demonstramos que o tratamento neonatal com ferro está associado ao estresse oxidativo aumentado em regiões do cérebro relacionadas à formação da memória (de Lima et al., 2005a), e que a redução dos danos oxidativos às proteínas no córtex e hipocampo em ratos velhos foi associada a uma melhora do prejuízo de memória induzida pela idade (Pietá Dias et al., 2007).

Uma das preocupações quanto ao uso de estatinas em pacientes com DA é a sugestão de possíveis efeitos cognitivos deletérios associados a redução do colesterol (Stépien et al, 2005). Estudo randomizado, comparando a lovastatina e placebo em adultos saudáveis com níveis de colesterol LDL elevados demonstrou um efeito negativo pequeno, mas significativo, sobre as medidas de velocidade psicomotora e atenção nos pacientes que receberam lovastatina (Muldoon et al, 2000). Outro ensaio envolvendo redução do colesterol através da modificação da dieta mostrou um efeito negativo sobre uma única medida da função cognitiva em pacientes com a maior declínio nos níveis de colesterol mostrando um maior prejuízo cognitivo (Wardle et al, 2000). Estudos epidemiológicos de diferentes modelos e populações de pacientes mostraram uma redução de 40-70% do risco

de DA, associada à ingestão de estatinas (Jick et al, 2000; Rockwood et al, 2002; Wolozin et al, 2000). Apesar das limitações inerentes a esses dados para atribuir uma relação causal entre o uso de estatina e uma diminuição risco de DA, a magnitude e a consistência dos efeitos observados são notáveis. Outros dois estudos randomizados recentes, placebo controlados, não mostraram um benefício da terapia com estatina em declínio cognitivo associado ao envelhecimento. A crítica a estes resultados foi o curto período de seguimento de 3 anos e 5 anos, respectivamente (Heeschen et al, 2002; Shepherd et al, 2002).

Em 2004, Zamrini et al relataram uma redução de 39% em o risco de Alzheimer em usuárias de estatinas em comparação com os não-usuários (RC = 0,61; 95% IC:0,42-0,87). Dados da coorte do Cache County Study demonstraram não houve redução significativa no risco de DA com uso de estatina, mas permitiu observar que alguns benefícios poderão ser concedidos com uso de estatinas a por longo prazo. Em contraste, o estudo das Três Cidades, com 9294 indivíduos identificados na França, mostrou uma redução significativa no risco da doença de Alzheimer com o uso de estatina (RC = 0,61;95% IC, 0,41-0,91) (Zandi et al, 2005).

Em suma, baseado nos resultados obtidos, nosso estudo suporta a idéia de que os déficits cognitivos associados ao envelhecimento e às doenças neurodegenerativas podem estar relacionados aos efeitos deletérios do acúmulo de ferro no cérebro, e fornece a primeira evidência de que as estatinas melhoram a disfunção de memória associada à idade.

Ajith, T.A., Riji, T., Anu, V. In vitro anti-oxidant and DNA protective effects of the novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor rosuvastatin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 2008; 35: 625–629.

Almuti K., Rimawi R., Spevack D., Ostfeld R.J. Effects of statins beyond lipid lowering: Potential for clinical benefits. *Int. J. Cardiol* 2006; 109: 7–15.

Arvanitakis, Z, Schneider, J.A., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Kelly, J.F., Evans, D.A., Bennett, D.A. Statins, incident Alzheimer disease, change in cognitive function, and neuropathology. *Neurology* 2008; 70: 1795–1802.

Bartzokis G, Cumminigs J, Perlman S, hance D.B., Mintz J. Increased basal ganglia iron levels in Huntington disease. *Arch.Neurol.*, 1999; 56: 569-574.

[Benito-León J](#), [Louis E.D.](#), [Vega S](#), [Bermejo-Pareja F](#). Statins and Cognitive Functioning in the Elderly: A Population-Based Study. *J Alzheimers Dis*. 2010 Apr 22. [Epub ahead of print]

Benkovic, S.A., Connor, J.R., Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1993; 338: 97–113.

Bernick, C., Katz, R., Smith, N.L., Rapp, S., Bhadelia, R., Carlson, M., Kuller, L. Statins and cognitive function in the elderly: the cardiovascular health study. *Neurology* 2005; 65 (9): 1388–1394.

Borchelt D.R., Thinakaran G, Eckman C.B. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996;17:1005–1013

Bösel, J., Gandor, F., Harms, C., Synowitz, M., Harms, U., Djoufack, P.C., Megow, D., Dirnagl, U., Hörtnagl, H., Fink, K.B., Endres, M., Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J. Neurochem.*2005; 92 (6): 1386–1398.

Braak H., de Vos R.A., Jansen E.N., Bratzke H., Braak E., Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Progr Brain Res* 1998;117:267–285

Brown S.A., Hutchinson R., Morrisett J., Boerwinkle E., Davis C.E., Gotto Jr A.M., Patsch W. Plasma lipid, lipoprotein cholesterol, and apoprotein distributions in selected US communities. The Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb.*1993; 13:1139-1158.

Chong T., Naples M., Federico L. Effect of rosuvastatin on hepatic production of apolipoprotein B containing lipoproteins in an animal model of insulin resistance and metabolic dyslipidemia. *Atherosclerosis* 2006;185: 21-31.

Cramer, C., Haan, M.N., Galea, S., Langa, K.M., Kalbfleisch, J.D., Use of statins and incidence of dementia and cognitive impairment without dementia in a cohort study. *Neurology* 2008;71: 344–350.

de Lima, M.N., Dias, C.P., Torres, J.P., Dornelles, A., Garcia, V.A., Scalco, F.S., Guimarães, M.R., Petry, R.C., Bromberg, E., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., Schröder, N. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol. Aging* 2008, 29: 1052–1059.

de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Garcia, V.A., Guimarães, M.R., Scalco, F.S., Roesler, R., Schröder, N., Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacol* 2008b; 55 (5): 788–792.

de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Caldana, F., Grazziotin, M.M., Scalco, F.S., Guimarães, M.R., Bromberg, E., Franke, S.I., Henriques, J.A., Schröder, N., Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;570 (1–3): 111–114.

de Lima, M.N., Luft, T., Roesler, R., Schröder, N., Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci. Lett.* 2006. 405: 142–146.

de Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D.C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Schroder, N., Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur. J. Neurosci.* 2005a; 21 (9): 2521–2528.

de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Grazziotin, M.M., Garcia, V.A., Dal-Pizzol, F., Bromberg, E., Schroder, N., Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp. Neurol.* 2005b; 196 (1): 177–183.

de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R., Schroder, N., Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp. Gerontol.* 2005c; 40 (6): 506–511.

Ding, B., Chen, K.M., Ling, H.W., Sun, F., Li, X., Wan, T., Chai, W.M., Zhang, H., Zhan, Y., Guan, Y.J. Correlation of iron in the hippocampus with MMSE in patients with Alzheimer's disease. *J. Magn. Reson. Imaging* 2009; 29 (4): 793–798.

Dröge, W., Schipper, H.M., Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 2007; 6 (3): 361–370.

Ebaldi, M., Srinivasan, S.K., Baxi, M.D. Oxidative stress and oxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 1996; 48: 1–19.

Ettinger W.H., Wahl P.W., Kuller L.H., Bush T.L., Tracy R.P., Manolio T.A., Borhani N.O., Wong N.D., O'Leary D.H. Lipoprotein lipids in older people: Results from the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 1992; 86: 858-869.

Fernandez LL, Carmona M, Portero-Otin M, Naudi A, Pamplona R, Schröder N, Ferrer I. Effects of increased iron intake during the neonatal period on the brain of adult AbetaPP/PS1 transgenic mice. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(3):1069-80

Ferrari C.K.B. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. *Biologia* 2000a; 55: 581-90.

Ferrari C.K.B. Apoptose: A importância da maquinaria de morte celular no controle e na patogênese das doenças. *Rev Ciênc Med* 2000b; 9: 21-31

Fredriksson, A., Schröder, N., Eriksson, P., Izquierdo, I., Archer, T. Neonatal iron potentiates adult MPTP-induced neurodegenerative and functional deficits. *Parkinsonism. Relat. Disord.* 2001; 7 (2): 97–105.

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

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

Galvin J.E., Giasson B., Hurtig H.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1 is characterized by alpha beta and gama-synuclein neuropathology. *Am. J. Pathol* 2000; 157:361-368.

Gibson W.W., Eckert G.B., Igbavboa U., Müller W.E., Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003;1610: 281-290

Gerlach, M., Double, K.L., Youdim, M.B., Riederer, P. Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients. *J. Neural. Transm.* 2006; 70: 133–142.

Griffiths, P.D., Dobson, B.R., Jones, G.R., Clarke, D.T.,. Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease. An in vivo study using extended X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy. *Brain* 1999; 122 (4): 667–673.

Haag, M.D., Hofman, A., Koudstaal, P.J., Stricker, B.H., Breteler, M.M. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2009; 80 (1): 13–17.

Hayashi, T., Hamakawa, K., Nagotani, S., Jin, G., Li, F., Deguchi, K., Sehara, Y., Zhang, H., Nagano, I., Shoji, M., Abe, K. HMG CoA reductase inhibitors reduce ischemic brain injury of Wistar rats through decreasing oxidative stress on neurons. *Brain Res.* 2005; 1037 (1–2): 52–58.

He X., Jenner A.M., Ong W.Y., Farooqui A.A., Patel S.C. Lovastatin modulates increased cholesterol and oxysterol levels and has a neuroprotective effect on rat hippocampal neurons after kainite. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006; 65(7):652-63

Heeschen C, Hamm C.W., Laufs U., Snapinn S., Bohm M., White H.D. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Investigators: withdrawal of statins increases event rates in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 105: 1446–1452.

Hirsch E.C., Faucheux B.A., () Iron metabolism and Parkinson's disease. *Movement Disorders* 1998; 13:39-45

House, M.J., St. Pierre, T.G., Foster, J.K., Martins, R.N., Clarnette, R.,. Quantitative MR imaging R2 relaxometry in elderly participants reporting memory loss. *A. J. N. R.* 2006; 27: 430–439.

Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease—a clinicopathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55:181–184

Jick H., Zornberg G.L., Jick S.S., Seshadri S., Drachman D.A. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 2000; 356: 1627–1631.

Kaur D, Peng J, Chinta SJ, Rajagopalan S, Di Monte DA, Cherny RA, Andersen JK.

Increased murine neonatal iron intake results in Parkinson-like neurodegeneration with age. *Neurobiol Aging* 2007; 28(6): 907-13.

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

Koladiya, R.U., Jaggi, A.S., Singh, N., Sharma, B.K.,. Ameliorative role of atorvastatin and pitavastatin in L-Methionine induced vascular dementia in rats. *BMC Pharmacol.* 2008. 8: 14.

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

Kumagai, R., Oki, C., Muramatsu, Y., Kurosaki, R., Kato, H., Araki, T.,. Pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, reduces hippocampal damage after transient cerebral ischemia in gerbils. *J. Neural. Transm.* 2004; 111 (9): 1103–1120.

Kumar A.P., Reynolds W.F. Statins downregulate myeloperoxidase gene expression in macrophages. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 2005; 331: 442-451

Laufs, U., Gertz, K., Dirnagl, U., Böhm, M., Nickenig, G., Endres, M. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res.* 2002; 942:23–30.

[Lee C.L.](#), [Kuo T.F.](#), [Wu C.L.](#), [Wang J.J.](#), [Pan T.M.](#) Red mold rice promotes neuroprotective sAPP alpha secretion instead of Alzheimer's risk factors and amyloid beta expression in hyperlipidemic A beta 40-infused rats. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(4): 2230-2238.

[Li G.](#), [Shofer J.B.](#), [Rhew I.C.](#), [Kukull W.A.](#), [Peskind E.R.](#), [McCormick W.](#), [Bowen J.D.](#), [Schellenberg G.D.](#), [Crane P.K.](#), [Breitner J.C.](#), [Larson E.B.](#) Age-Varying Association Between Statin Use and Incident Alzheimer's Disease. *J Am Geriatr Soc.* 2010. Jun 1. [Epub ahead of print]

Liao J.K. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 285-288.

Liao J.K., Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 45; 89-118.

Lieu P.T., Heiskala M., Peterson P.A., Yang Y. The roles of iron in health and disease. *Mol. A. of Med.* 2001; 22: 1-87

Lucas DT, Szweda LI. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 510-4.

Lynch, T., Cherny, R., Bush, A.I. Oxidative processes in Alzheimer's disease: the role of Abeta-metal interactions. *Exp. Gerontol.* 2000; 35: 445-451.

Martin W.R., Ye F.Q., Allen P.S. Increasing striatal iron content associated with normal aging. *Movement Disorders* 2004;13:281-286.

Mason J.C. Statins and their role in vascular protection. *Clin. Sci* 2003; 105:251-266

Massy Z.A., Guijarro C. Statins: effects beyond cholesterol lowering. *Nephrol. Dial. Transplant* 2001; 16: 1738-1741.

McGaugh, J.L. Dissociating learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Res. Bull.* 1989; 23 (4-5): 339-345.

McTaggart, F., Buckett, L., Davidson, R., Holdgate, G., McCormick, A., Schneck, D., Smith, G., Warwick, M. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am. J. Cardiol.* 2001; 87: 28B-32B.

Merad-Boudia M, Nicole A, Santiard-Baron D, Saillé C, Ceballos-Picot I. Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 645-55.

Miwa C.P., de Lima M.N., Scalco F., Vedana G., Mattos R., Fernandez L.L., Hilbig A., Schröder N., Vianna M.R. Neonatal Iron Treatment Increases Apoptotic Markers in Hippocampal and Cortical Areas of Adult Rats. *Neurotox Res.* 2010 [Epub ahead of print].

- Muldoon M.F., Barger S.D., Ryan C.M., Flory J.D., Lehoczky J.P., Matthews K.A., Manuck S.B. Effects of lovastatin on cognitive function and psychological well-being. *Am J Med.* 2000;108:538–546.
- Nissen S. E., Nicholls S.J., Sipahi I., Libby P., Raichlen J.S., Ballantyne C.M., Davignon J., Erbel R., Fruchart J.C., Tardif J.C., Schoenhagen P., Crowe T., Cain V., Wolski K., Goormastic M., Tuzcu E.M. The ASTEROID Study, *JAMA.* 2006; 295: 1556-1565
- Ong, W.Y., Farooqui, A.A., Iron, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2005. 8 (2), 183–200.
- Otto, A., Fontaine, J., Tschirhart, E., Fontaine, D., Berkenboom, G. Rosuvastatin treatment protects against nitrate-induced oxidative stress in eNOS knockout mice: implication of the NAD(P)H oxidase pathway. *Br. J. Pharmacol.* 2006; 148 (4): 544–552.
- Pape M.E., Schultz P.A., Rea T.J. Tissue specific changes in acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) mRNA levels in rabbits. *J. Lipid. Res.* 1995; 36:823-838.
- Pietá Dias, C., de Lima, M.N.M., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Garcia, V.A., Scalco, F.S., Guimarães, M.R., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., Schröder, N., Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience* 2007;146 (4): 1719–1725.
- Pratico, D., Clark, C.M., Liun, F., Rokach, J., Lee, V.Y., Trojanowski, J.Q. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 2002; 59 (6): 972–976.
- Quintana, C., Bellefqih, S., Laval, J.Y., Guerquin-Kern, J.L., Wu, T.D., Avila, J., Ferrer, I., Arranz, R., Patino, C.,. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *J. Struct. Biol.* 2006; 153 (1): 42–54.
- Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyn, M., Tsien, J.Z.,. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosc.* 2000; 3: 238–244.
- Rockwood K., Kirkland S., Hogan D.B., Macknight C., Merry H., Verreault R., Wolfson C., McDowell I. use of lipidlowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch. Neurol.* 2002; 59: 223-227.
- Saczynski J.S., White L., Peila R.L., Rodriguez B.L., Launer L.J. The relation between apolipoprotein A-I and Dementia: The Honolulu-Asia Aging Study. *Am.J. Epidemiol.* 2007; 33(3): 273-94
- Schapira A. H. V., Olanow C.W. Neuroprotection in Parkinson Disease, Mysteries, Myths, and Misconceptions *JAMA* 2004; 291: 358-364

Shepherd J., Blauw G.J., Murphy M.B., Bollen E.L., Buckley B.M., Cobbe S.M., Ford I. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomized controlled trial. *Lancet*, 2002; 360: 1623–1630.

[Schreurs B.G.](#) The effects of cholesterol on learning and memory. [Neurosci Biobehav Rev.](#) 2010 May 12 [Epub ahead of print]

Schröder, N., O'Dell, S.J., Marshall, J.F. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 2003; 49: 89–96.

Schröder, N., Fredriksson, A., Vianna, M.R.M., Roesler, R., Izquierdo, I., Archer, T. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav. Brain Res.* 2001. 124: 77–85.

Schupp, N., Schmid, U., Heidland, A., Stopper, H. Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. *Atherosclerosis* 2008; 199 (2): 278–287.

[Serrano-Pozo A](#), [Vega G.L.](#), [Lütjohann D](#), [Locascio J.J.](#), [Tennis M.K.](#), [Deng A](#), [Atri A](#), [Hyman B.T.](#), [Irizarry M.C.](#), [Growdon J.H.](#) Effects of Simvastatin on Cholesterol Metabolism and Alzheimer Disease Biomarkers. [Alzheimer Dis Assoc Disord.](#) 2010 May 13. [Epub ahead of print]

Sjögren M. et al. Mechanisms of ageing and development. *Neuroscience* 2006; 127:138-147

Sparks, L. Statins and cognitive function. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2009; 80 (1): 1–2.

Stefani, M., Liguri, G. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. *Curr. Alzheimer Res.* 2009; 6 (1): 15–29.

Stêpień K., Tomaszewski M., Czuczwar S. J., Neuroprotective properties of statins *Pharmacol. Reports* 2005; 57: 561-569

Tanzi R.E., Kovacs D.M., Kim T.W., Moir R.D., Guenette S.Y., Wasco W. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiology Dis* 1996; 3: 159–168

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

Tremollieres F.A., Pouilles J.M., cauneille C., Ribot C. Coronary heart disease risk factors and menopause: a study in 1684 French women. *Atherosclerosis* 1999; 142:415-423.

Wahner, A.D., Bronstein, J.M., Bordelon, Y.M., Ritz, B. Statin use and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 2008; 70 (16): 1418–1422.

Wallis, L.I., Paley, M.N., Graham, J.M., Grünewald, R.A., Wignall, E.L., Joy, H.M., Griffiths, P.D., MRI assessment of basal ganglia iron deposition in Parkinson's disease. *J. Magn. Reson. Imaging* 2008; 28 (5): 1061–1067.

Wardle J., Rogers P., Judd P., Taylor M.A., Rapoport L., Green M., Nicholson P.K. Randomized trial of the effects of cholesterol-lowering dietary treatment on psychological function. *Am J Med*, 2000;108: 547–553.

Wolozin B., Kellman W., Ruosseau P., Celesia G.G., Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer's disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol*, 2000, 57, 1439–1443.

Wolozin, B., Wang, S.W., Li, N.C., Lee, A., Lee, T.A., Kazis, L.E., Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *B.M.C. Med.* 2007. 5: 20.

Wu, H., Lu, D., Jiang, H., Xiong, Y., Qu, C., Li, B., Mahmood, A., Zhou, D., Chopp, M. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 2008; 25 (2): 130–139.

van der Most, P.J., Dolga, A.M., Nijholt, I.M., Luiten, P.G., Eisel, U.L. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 2009; 88 (1): 64–75.

Zamrini E, McGwin G, Roseman JM. Association between statin use and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 2004; 23: 94–98.

Zandi PP, Sparks DL, Khachaturian AS, et al. Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cachê County Study. *Arch Gen Psychiatry* 2005; 62:217–224.

Zecca L., Gallorini M., Schünemann V., Trautwein A.T., Gerlach M., Rieder P. Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J. Neuroch.* 2001; 76: 1766-1773

Zecca, L., Youdim, M.B., Riederer, P., Connor, J.R., Crichton, R.R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosc.* 2004; 5 (11): 863–873.

Zhang G, Dong Y, Zhang B, Ichinose F, Wu X, Culley D.J, Crosby G, Tanzi R.E, Xie Z. Isoflurane-Induced Caspase-3 Activation Is Dependent on Cytosolic Calcium and Can Be Attenuated by Memantine *J. Neurosci.* 2008; 28: 4551 – 4560

Zipp, F., Aktas, O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosc.* 2006; 29 (9): 518–527.