

Adriano Emanuel Machado

**A HIPERCOLESTEROLEMIA, INDUZIDA POR DIETA OU  
GENÓTIPO, IMPACTA NEGATIVAMENTE NA FORMAÇÃO  
DE MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS EM  
CAMUNDONGOS.**

Dissertação submetido(a) ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira.

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Machado, Adriano

A HIPERCOLESTEROLEMIA, INDUZIDA POR DIETA OU  
GENÓTIPO, IMPACTA NEGATIVAMENTE NA FORMAÇÃO DE  
MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS EM CAMUNDONGOS. /  
Adriano Machado ; orientador, Eduardo Luiz Gasnhar  
Moreira , 2017.  
79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,  
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Neurociências. 3.  
Camundongo. 4. Colesterol. 5. Memória. I. , Eduardo  
Luiz Gasnhar Moreira. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências. III. Título.

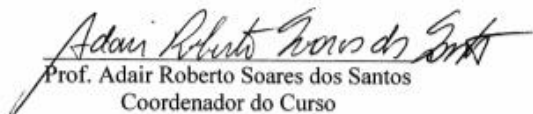
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**ADRIANO EMANUEL MACHADO**

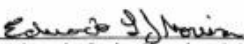
**“A HIPERCOLESTEROLEMIA, INDUZIDA POR DIETA  
OU POR GENÓTIPO, IMPACTA NEGATIVAMENTE NA  
FORMAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS  
CONTEXTUAIS EM CAMUNDONGOS”**

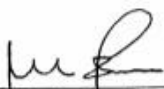
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 19 de outubro de 2017.

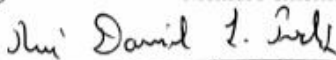
  
Prof. Adair Roberto Soares dos Santos  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

  
Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira  
Orientador – UFSC

  
Prof. Moacir Serralvo Faria  
Membro – UFSC

  
Profa. Róli Rodrigues Simões  
Membro externo

  
Prof. Rui Daniel Schröder Prediger  
Membro – UFSC



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha companheira Mariana Machado Freitas, que divide sua vida comigo há anos. Agradeço pela parceria e amor que sempre me compartilhou e, principalmente, pela paciência e carinho que sempre demonstrou mesmo nos momentos mais tortuosos dessa caminhada.

Agradeço a meus pais Djanira da Silva Cruz e João Izair Porto Machado, pela carga genética herdada, pelo amor incondicional e pelos incentivos constantes que me proporcionam.

Sou extremamente grato a meu sogro Valci Freitas e minha sogra Márcia Goulart, por todo apoio, suporte e incentivo que sempre me ofereceram.

Ao professor Eduardo, meu orientador e amigo, sou deveras grato por todo o suporte e ajuda que me oferece e por ter sabiamente identificado meu perfil como aluno e adotado uma postura profissional e motivadora durante todo meu mestrado.

Ao grande irmão que a vida me deu, Gianni Mancini, sou grato por todas as conversas, cursos e trabalhos que realizamos juntos. Que nossa parceria se perpetue durante nossa carreira como cientistas.

Agradeço também ao Raul, Letícia, Ana, Guilherme e Giovana que, além de colegas de laboratório, foram grandes amigos e amigas durante a realização de meu mestrado, sempre dispostos a conversas e discussões científicas que muito contribuíram na confecção deste trabalho.

Aos amigos e amigas do LANDI: Fernanda, Fernando, Carol, Holly, entre muitos outros, minha sincera gratidão pelo apoio e incentivo que sempre encontrei ao bater na porta deste laboratório.

Agradeço aos professores, servidores e alunos do PPG Neurociências que prestaram suporte intelectual e material na confecção deste trabalho. Em especial ao professor José Marino, o qual me despertou curiosidade acerca de outras perspectivas no estudo do comportamento animal.

Agradeço as instituições de fomento CAPES e CNPq pela ajuda no custeio durante o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Evidências acumuladas ao longo das últimas décadas sugerem que a perturbação do metabolismo do colesterol pode ser prejudicial aos processos fisiológicos de aprendizagem e memória. Em especial, evidências epidemiológicas e clínicas têm indicado que indivíduos com hipercolesterolemia durante a vida adulta apresentam um risco aumentando de desenvolvimento de doença de Alzheimer décadas após. Neste sentido, a manipulação dos níveis de colesterol plasmático em roedores é um instrumento experimental importante ao entendimento da possível ligação entre colesterol e memória. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da hipercolesterolemia em resposta a estímulos aversivos condicionados e incondicionados em camundongos. Em um primeiro protocolo experimental, camundongos fêmeas C57Bl/6, jovens (3 meses de idade) e idosas (24 meses de idade), foram alimentadas diariamente, durante quatro semanas, com uma dieta padrão (DP) para roedores ou dieta enriquecida com colesterol (1,5%; DEC) e, então, submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado e condicionamento aversivo ao contexto. Ademais, camundongos fêmeas C57Bl/6 jovens foram tratados com a DP ou DEC, submetidos ao teste do condicionamento aversivo e, imediatamente após a sessão de treino, receberam veículo ou escopolamina (0,37 mg/kg; i.p.). Em outro protocolo experimental, camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem ou nocautes para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>), com 12 meses de idade, foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado e ao condicionamento aversivo contextual. Ainda, os animais foram submetidos ao teste do condicionamento aversivo e, imediatamente após

a sessão de treino, receberam veículo ou donepezil (3 mg/kg; i.p.). Especificamente foi demonstrado que (i) a DEC aumentou a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, tanto em camundongos jovens quanto idosos; (ii) a DEC especificamente prejudicou a formação da memória aversiva contextual em camundongos idosos; (iii) uma dose não efetiva de escopolamina prejudicou a consolidação da memória aversiva contextual em camundongos jovens expostos à DEC; (iv) camundongos rLDL<sup>-/-</sup> apresentaram um tempo de exploração dos braços abertos do labirinto significativamente maior que camundongos do tipo selvagem; (v) camundongos rLDL<sup>-/-</sup> apresentaram um prejuízo na formação da memória aversiva contextual; (vi) uma única administração do fármaco donepezil, inibidor da enzima acetilcolinesterase, na janela de consolidação da memória, foi capaz de mitigar o prejuízo de formação da memória aversiva contextual em camundongos rLDL<sup>-/-</sup>. Os achados do presente estudo sugerem que elevados níveis de colesterol plasmático, induzidos pela administração de dieta enriquecida com colesterol ou do genótipo, produzem um prejuízo na formação de uma memória aversiva contextual, evento que parece envolver o sistema de transmissão colinérgico.

**Palavras-chave:** hipercolesterolemia; camundongo; condicionamento aversivo contextual; ansiedade.



## ABSTRACT

Accumulating evidence argues that cholesterol dyshomeostasis might be detrimental to human learning and memory. Researches of the last two decades have shown that people with high serum cholesterol concentration in midlife have a significantly higher risk of Alzheimer's disease (AD) in later life. In this regard, manipulations of cholesterol levels in rodents have shed some light on the relationship between cholesterol and memory. Herein we sought to evaluate the effects of hypercholesterolemia in response to unconditioned and conditioned aversive stimuli in mice. In one experimental set, young (3-months old) and aged (24-months-old) female C57Bl/6 mice were fed daily during 4 weeks with standard rodent diet (SD) or enriched cholesterol diet (ECD), and then submitted to the elevated plus maze test and to contextual aversive conditioning test. Moreover, 3-months-old C57Bl/6 female mice, fed daily during 4 weeks with SD or ECD, were submitted to the contextual aversive conditioning test and, immediately after training session, received vehicle or scopolamine (0.37 mg/kg; i.p.). In another experimental set, 12-months-old C57Bl/6 and LDLr<sup>-/-</sup> female mice were submitted to the elevated plus maze test and to contextual aversive conditioning test. Also, they were submitted to the contextual aversive conditioning test and, immediately after training session, received vehicle or donepezil (3.0 mg/kg; i.p.). Specifically, we found that (i) ECD increased open-arms exploratory behavior, both in young and aged mice; (ii) ECD specifically impaired contextual aversive memory retrieval in aged mice; (iii) an ineffective dose of scopolamine impaired aversive memory

consolidation in young mice exposed to ECD; (iv) LDLr<sup>-/-</sup> mice spent significantly more time in the open arms of the elevated plus maze in comparison with wildtype mice; (v) LDLr<sup>-/-</sup> mice presented impaired contextual aversive memory retrieval; (vi) boosting cholinergic neurotransmission, by a single donepezil administration on consolidation window, lead to improvement of aversive memory consolidation in LDLr<sup>-/-</sup> mice. Our findings suggest that high levels of cholesterol induced by either cholesterol-enriched diet or genetic deletion of LDLr, produces a decrease on freezing behavior in the contextual aversive conditioning test, which seems to involve a cholinergic dysfunction.

**Keywords:** hypercholesterolemia; mice; contextual aversive memory; anxiety.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão Geral do Colesterol.....	20
Figura 2. Metabolismo hepático do colesterol. ....	22
Figura 3. Absorção de LDL e rLDL.....	23
Figura 4. Metabolismo encefálico do colesterol.....	26
Figura 5. Hipercolesterolemia e dano vascular. ....	28
Figura 6. Teste do Labirinto em Cruz Elevado. ....	41
Figura 7. Condicionamento Aversivo ao Contexto. ....	42
Figura 8. Delineamento Experimental I. ....	43
Figura 9. Delineamento Experimental II. ....	44
Figura 10. Delineamento Experimental III.....	45
Figura 11. Delineamento Experimental IV. ....	46
Figura 12. Delineamento Experimental V.....	47
Figura 13. Avaliação dos parâmetros comportamentais de camundongos fêmeas, jovens e idosas, expostas à dieta enriquecida com colesterol (DEC), frente a um estímulo aversivo incondicionado, i.e., exposição ao LCE.....	50
Figura 14. Avaliação dos efeitos de uma dieta enriquecida com colesterol (DEC) na formação de uma memória aversiva contextual. ....	51
Figura 15. Curva dose-resposta do efeito da escopolamina via i.p. durante a fase de consolidação de uma memória aversiva contextual em camundongos fêmeas.....	53
Figura 16. Avaliação do efeito sinérgico da DEC e de administração aguda de escopolamina durante a consolidação da memória aversiva contextual em camundongos fêmeas jovens.....	54
Figura 17. Avaliação dos parâmetros comportamentais de camundongos fêmeas, C56Bl/6 do tipo selvagem e nocaute para o rLDL, frente a um estímulo aversivo incondicionado, i.e., exposição ao LCE.....	55

Figura 18. Avaliação dos efeitos da deleção gênica do receptor de LDL na formação de uma memória aversiva contextual em camundongos. ....	56
Figura 19. Avaliação do efeito da administração aguda de donepezil durante a consolidação da memória aversiva contextual em camundongos fêmeas C57Bl/6 do tipo selvagem e nocaute para o receptor de LDL (rLDL <sup>-/-</sup> ). ....	57

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Comparação entre o metabolismo do colesterol em humanos e camundongos.....	30
Tabela 2. Comparação entre a dieta padrão de roedores com a dieta enriquecida em colesterol utilizada neste trabalho (Minatti et al., 2012).....	40



## **LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS**

24-OH – 24-hidroxicolesterol

27-OH – 27-hidroxicolesterol

AChE – acetilcolinesterase

ANOVA – Análise de variância

apoE – Apolipoproteína E

CAC – condicionamento aversivo ao contexto

DA – doença de Alzheimer

DP – dieta padrão

DEC – dieta enriquecida com colesterol

HDL – lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA

i.p. – Intraperitoneal

LCE – labirinto em cruz elevado

LDL – lipoproteína de baixa densidade

rLDL – receptor da lipoproteína de baixa densidade

SNC – sistema nervoso central





# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
METABOLISMO DO COLESTEROL .....	20
COLESTEROL E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	24
HIPERCOLESTEROLEMIA.....	26
HIPERCOLESTEROLEMIA E PREJUÍZOS COGNITIVOS.....	28
HIPERCOLESTEROLEMIA EM MODELOS ANIMAIS .....	30
EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA NO COMPORTAMENTO DE ROEDORES .....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
OBJETIVO GERAL.....	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
ANIMAIS .....	39
MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERCOLESTEROLEMIA .....	39
PARADIGMAS COMPORTAMENTAIS .....	40
<i>Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</i> .....	40
<i>Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC)</i> .....	41
DESENHOS EXPERIMENTAIS .....	43
<i>Delineamento Experimental 1: Avaliação dos efeitos da hipercolesterolemia, induzida por alterações na dieta, sobre a emocionalidade e formação de uma memória aversiva de longa duração em camundongos fêmeas, da linhagem C57Bl/6, jovens e idosos</i> .....	43
<i>Delineamento Experimental 2: Determinação de uma dose de escopolamina sem efeito na consolidação de uma memória aversiva contextual</i> .....	44
<i>Delineamento Experimental 3: Avaliação dos possíveis efeitos sinérgicos de uma dieta enriquecida em colesterol e uma dose não efetiva de escopolamina na consolidação de um memória aversiva em camundongos fêmeas jovens</i> .	44
<i>Delineamento Experimental 4: Avaliação dos efeitos da hipercolesterolemia, induzida por alterações no genótipo, sobre a emocionalidade e formação de uma memória aversiva de longa duração em camundongos fêmeas, da linhagem C57Bl/6 e nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>)</i> .....	45
<i>Delineamento Experimental 5: Avaliação dos efeitos da administração de donepezil, inibidor da enzima acetilcolinesterase, durante a fase de consolidação de uma memória aversiva contextual camundongos fêmeas rLDL<sup>-/-</sup></i> .....	46
QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL PLASMÁTICO.....	47
ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
EXPERIMENTO I: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA, INDUZIDA POR ALTERAÇÕES NA DIETA, SOBRE A EMOCIONALIDADE E FORMAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA DE LONGA DURAÇÃO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS, DA LINHAGEM C57Bl/6, JOVENS E IDOSOS. ....	49
EXPERIMENTO 2: DETERMINAÇÃO DE UMA DOSE DE ESCOPOLAMINA SEM EFEITO NA CONSOLIDAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL. ....	52
EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS SINÉRGICOS DE UMA DIETA ENRIQUECIDA EM COLESTEROL E UMA DOSE NÃO EFETIVA DE ESCOPOLAMINA NA CONSOLIDAÇÃO DE UM MEMÓRIA AVERSIVA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS JOVENS. .	53
EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA, INDUZIDA POR ALTERAÇÕES NO GENÓTIPO, SOBRE A EMOCIONALIDADE E FORMAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA DE LONGA DURAÇÃO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS, DA LINHAGEM C57Bl/6 E NOCAUTE PARA O RECEPTOR DE LDL (rLDL <sup>-/-</sup> ). ....	54
EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DONEPEZIL, INIBIDOR DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE, DURANTE A FASE DE CONSOLIDAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL CAMUNDONGOS FÊMEAS rLDL <sup>(-/-)</sup> . ....	56
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>

## INTRODUÇÃO

A palavra colesterol tem sua epistemologia derivada do grego *chole* que significa bile e *stereos* que significa sólido. A descoberta desta molécula lipídica remonta ao ano de 1815, quando o alquimista francês Michel Chevreul isolou este lipídio do líquido produzido pelo fígado e o nomeou *cholesterine*. Porém, sua estrutura química só veio a ser plenamente conhecida em 1927, por meio do trabalho dos químicos Heinrich Wieland e Alfred Windaus, agraciados com o prêmio Nobel. Ressalta-se que a extensa pesquisa acerca do metabolismo do colesterol acarretou em nada menos do que treze prêmios Nobel, sendo a molécula cujo estudo laureou mais pesquisadores em toda a história. Devido à complexidade de sua síntese e metabolismo, apenas no século XXI, com advento de técnicas avançadas em bioquímica e biologia molecular, foi possível para ciência aprofundar-se sobre suas características mais intrínsecas e, ainda hoje, tenta-se desbravar a gigantesca gama de interações desta molécula (Vance et al., 2000).

O colesterol é membro da família de compostos chamada esteroide. Praticamente todos os domínios da vida sintetizam compostos desta família, sendo que mais de mil formas naturais já foram encontradas e classificadas. Porém, o colesterol é especificamente sintetizado no reino *Animalia*. Contudo, outros reinos também apresentam esteroides provenientes da via biosintética do mevalonato, como diversos fitoesteróis (*Plantae*) e ergosteróis (*Fungi*) conhecidos (Nes, 2011). Nas células animais, o colesterol participa da composição química da membrana plasmática, determinando sua fluidez (Cooper, 1978). Sua via de biossíntese também é precursora de importantes compostos endógenos, como os hormônios esteroides (Payne et al., 2004), ácidos biliares (Vlahcevic et al., 1999) e da vitamina D (Figura 1). A regulação metabólica do colesterol é bastante fina e requer controle sobre a quantidade disponível para os diferentes tipos celulares, assim, existem complexos sistemas moleculares envolvidos na sua síntese, absorção e transporte (Wulp et al., 2013). Alterações no sistema de controle do colesterol podem ocasionar graves situações patológicas, e.g., desenvolvimento da aterosclerose. Neste sentido, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em praticamente todas as sociedades, sendo as elevadas taxas de colesterol plasmático um dos principais fatores de risco. Assim, o estudo do metabolismo do colesterol é peça chave ao desenvolvimento de novas estratégias

terapêuticas e farmacológicas que permitam uma melhor qualidade de vida às pessoas, bem como, redução de custos aos sistemas públicos de saúde.

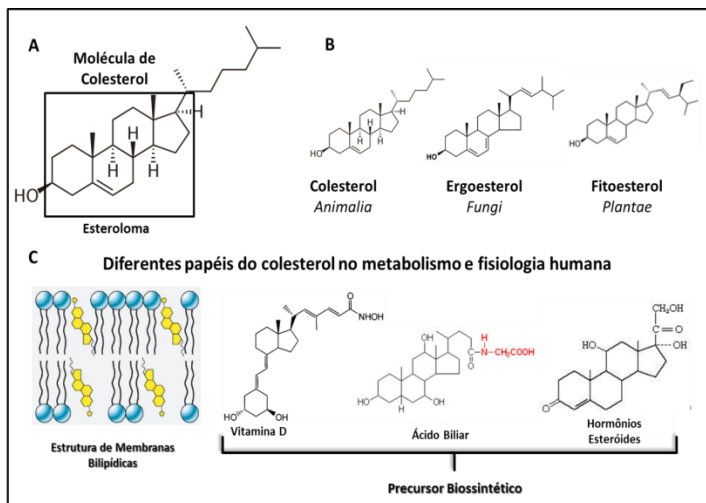


Figura 1. Visão Geral do Colesterol. A) Estrutura química da molécula do colesterol. B) Sutis diferenças entre os compostos esteroides derivados da via do mevalonato em diferentes reinos da vida. C) Exemplos de algumas das inúmeras funções do colesterol na fisiologia e metabolismo em humanos.

## Metabolismo do Colesterol

Grande parte do colesterol utilizado pelo corpo humano é endógeno e produzido a partir da via do mevalonato. A via do mevalonato, também chamada via dos isoprenoides, é a via precursora de diversas moléculas críticas ao metabolismo. Esta via inicia-se com a ligação de um acetoacil-CoA a uma acetil-CoA formando, por meio da reação catalisada pela enzima HMG-CoA sintase, uma molécula de HMG-CoA. Por meio da atividade da enzima HMG-CoA redutase, o HMG-CoA é reduzido a mevalonato. Esta fase da via é limitante de todas as reações subsequentes. As estatinas, estratégia farmacológica ao tratamento de condições hipercolesterolêmicas, atuam de forma a inibir a atividade desta enzima. O mevalonato, por sua vez, será convertido em colesterol através de uma série de reações de ciclização e isomerização.

Observando que existem rotas alternativas à via do mevalonato, é importante notar que a concentração celular de acetil-CoA e colesterol são os principais fatores reguladores desta via (Goldstein e Brown, 1990). São produzidos em torno de 800 mg/dia de colesterol em seres humanos saudáveis, o que equivale a 80% do colesterol total corporal. Os 20% restantes são oriundos da dieta. A síntese endógena acontece em praticamente todos os órgãos do corpo, porém o fígado, o intestino, o córtex da glândula adrenal, o sistema nervoso e as gônadas são responsáveis por maior parte de sua produção (Castelli et al., 1986). O colesterol pode ser encontrado no organismo em diferentes composições moleculares, as mais abundantes delas são sua forma livre e sua forma esterificada. A forma livre é principalmente encontrada nas membranas fosfolipídicas. Ao ser esterificada, a molécula de colesterol perde sua hidroxila polar e é ligada a um ácido graxo, o que torna a molécula resultante altamente hidrofóbica, além de altamente energética, servindo para reservas celulares (Wulp et al., 2013).

Por serem insolúveis em água, as moléculas de colesterol não podem ser transportadas diretamente pela corrente sanguínea ou pela linfa. Neste sentido, alguns tipos celulares, como os hepatócitos e os astrócitos, são capazes de produzir lipoproteínas, complexos vesiculares compostos por fosfolipídios, proteínas e colesterol livre, que permitem a circulação de colesterol em diferentes líquidos do corpo (Figura 2). As lipoproteínas armazenam triacilgliceróis e colesterol esterificado em diferentes proporções. Estes complexos diferem-se um dos outros pela sua densidade, esta diretamente relacionada ao volume lipídico e proteínas constituintes (apolipoproteínas) (Goldstein, 1977).

Neste sentido, os quilomícrons transportam o colesterol oriundo da dieta, através da linfa, ao fígado. As lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês *very low density lipoprotein* – vLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (do inglês *low density lipoprotein* – LDL) transportam os triacilgliceróis e colesterol do fígado aos outros tecidos, como o muscular e o adiposo. Por fim, as lipoproteínas de alta densidade (do inglês *high density lipoprotein* – HDL), por meio da interação com as outras lipoproteínas, auxiliam na absorção destas pelo fígado. O colesterol proveniente da dieta é absorvido por enterócitos no lúmen intestinal, na região do duodeno, sendo transportado em quilomícrons até o fígado. Os hepatócitos absorvem estas lipoproteínas, e o colesterol pode ser utilizado na composição do ácido biliar, ser esterificado para armazenamento via atividade da enzima colesterol acetiltransferase (ACAT), ou ser armazenado em VLDLs para distribuição aos tecidos extra-hepáticos. As VLDLs distribuem seu

conteúdo lipídico por meio da atividade de enzimas lipoproteína lipases, principalmente no tecido muscular e adiposo. Nesta reação, as VLDLs passam parte de seu conteúdo lipídico para as células do tecido, e perdem duas de suas apolipoproteínas (ApoA e ApoC), que são adicionadas às vesículas de HDL. Como consequência da diminuição de seu teor lipídico e da perda das apolipoproteínas estas VLDLs tornam-se LDLs (Wulp et al., 2013).

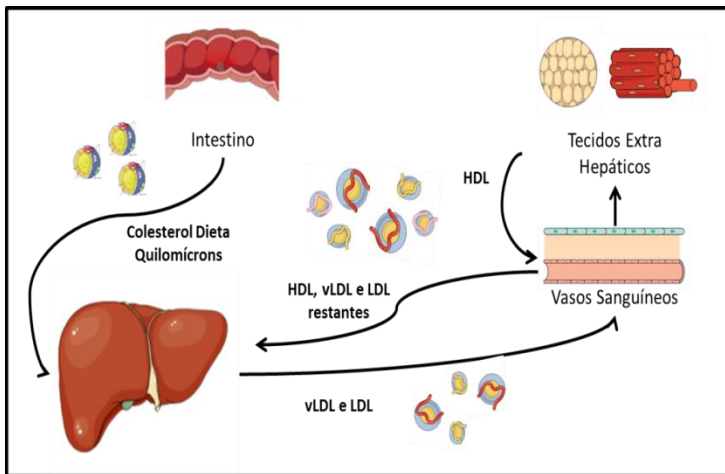


Figura 2. Metabolismo hepático do colesterol. O colesterol da dieta é transportado até o fígado via linfa por quilomícrons. A distribuição do colesterol proveniente do fígado é feita através de VLDLs e LDLs pela corrente sanguínea. O HDL auxilia na remoção do colesterol extra-hepático, assim como no metabolismo das lipoproteínas de baixa densidade.

As LDL são as principais carreadoras de colesterol no corpo, cerca de 70% de todo o colesterol encontra-se em lipoproteínas deste tipo. A principal forma de absorção destas lipoproteínas é através da interação entre a apolipoproteína B (ApoB) com o receptor de LDL (rLDL) nos hepatócitos. Este receptor é um complexo proteico de cinco domínios com 839 aminoácidos (Figura 3). Seu domínio de interação liga-se tanto a lipoproteínas contendo a ApoB100 como as que possuem uma forma ativa da apolipoproteína-E (ApoE). Uma importante proteína envolvida na absorção das LDLs é a pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo

9 (do inglês *proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9* - PCSK9). Tal enzima parece atuar de forma a diminuir os níveis do receptor de LDL nas membranas, sem alterar sua transcrição gênica. Após a ligação da lipoproteína ao receptor, inicia-se a endocitose da vesícula ligante. No interior da célula, a lipoproteína perde sua interação com rLDL no endossomo. Assim, o rLDL pode voltar para membrana e pode atuar na absorção de outras lipoproteínas. A LDL endocitada é então carregada aos lisossomos onde terá seu conteúdo de colesterol desesterificado e desviado para diferentes vias metabólicas (Figura 3) (Goldstein e Brown, 1977).

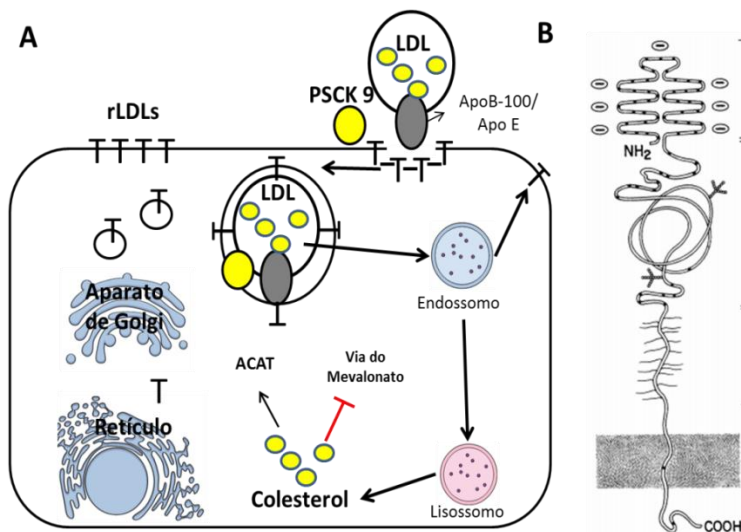


Figura 3. Absorção de LDL e rLDL. A) Mecanismo de absorção da LDL. Os receptores de LDL são sintetizados no retículo, vesiculados no aparato de Golgi, e por fim externalizados na membrana. Através da interação entre receptor e a ApoB100 ou ApoE inicia-se a endocitose da vesícula de LDL. A vesícula será transportada ao endossomo que reciclará os rLDL associados a ela à membrana. Através da formação de um lisossomo a vesícula será rompida e o colesterol liberado na célula, podendo ser alvo da enzima ACAT ou inibir a síntese endógena pela via do mevalonato. B) Estrutura do receptor de LDL.

Falhas nos processos moleculares associados à absorção do colesterol acarretam em acúmulo de LDL no sangue, podendo ocasionar

quadros de hipercolesterolemia e induzir danos vasculares. Em virtude de sua peculiaridade estrutural, o gene que codifica o rLDL é extenso e possui inúmeros exons e introns, o que torna os mecanismos de *splicing* associados a sua transcrição e tradução complexos. Não é estranho o fato de que inúmeras mutações e polimorfismos já foram observados e classificados para tal gene. Estas alterações genéticas estão envolvidas com a hipercolesterolemia familiar (HF), doença genética que acarreta em elevada concentração de colesterol LDL no sangue (Castelli et al., 1986; Vance et al., 2000).

## **Colesterol e o Sistema Nervoso Central**

O ambiente lipídico no SNC é vital ao seu funcionamento adequado. Embora a massa encefálica corresponda a cerca de 2% da massa total de um indivíduo adulto, em torno de 25% de todo o colesterol corporal encontra-se no encéfalo. Destes, 70% encontra-se nas bainhas de mielina e o restante disperso nas lipoproteínas gliais, nas membranas celulares e em ambientes intra e extracelulares do tecido nervoso. Esta produção endógena é crítica tendo em vista que as lipoproteínas plasmáticas não permeiam a barreira hemato encefálica (BHE), sendo assim, a maior parte do colesterol do SNC é produzida no próprio tecido. Grande parte do colesterol encefálico é sintetizado durante o desenvolvimento pelas células gliais e neuronais. Com a maturação do tecido nervoso, esta função passa a ser resguardada principalmente aos astrócitos (Björkhem et al., 2004). Estes, contam com o aparato enzimático necessário a síntese, vesiculação e transporte do colesterol. Mesmo assim, neurônios e outras células gliais continuam capazes de produzir colesterol, porém as diferenças funcionais destas origens biosintéticas encontram-se pouco esclarecidas (Björkhem et al., 2004).

Os astrócitos são capazes de produzir lipoproteínas ligadas à ApoE. Essas lipoproteínas são então lançadas no ambiente do líquido cefalorraquidiano por meio dos transportadores cassetes de ligação ao ATP C1 e G1 da família ABC. Os neurônios, por sua vez, captam este colesterol por ligação das lipoproteínas a receptores relacionados à LDL. Após a absorção, as LDL são endocitadas e o conteúdo de colesterol liberado no ambiente intracelular por meio da ação dos lisossomos neuronais (Thelen et al., 2006).

Os principais mecanismos moduladores da síntese astrocitária de colesterol se dão através da ativação dos receptores nucleares LXR.



Esses receptores são ativados por moléculas oxidadas de colesterol, os oxistéris, como o 24-hidroxicolesterol (24-OH) e o 27 hidroxicolesterol (27-OH). Essas moléculas podem permear a BHE, sendo considerados mecanismos chave na interação entre o colesterol periférico e o encefálico. O 24-OH é principalmente produzido no encéfalo por meio da atividade da enzima CYP46A1. Após sua produção, esta molécula pode atuar diretamente na síntese de elementos proteicos críticos ao colesterol nos astrócitos, assim como pode transpassar a BHE à corrente sanguínea e ser metabolizada no fígado (Russell et al., 2009). O 27-OH, por outro lado, sintetizado a partir da atividade da enzima CYP27A1, além de ser produzido no encéfalo, é principalmente produzido nos tecidos periféricos, com o aumento dos níveis plasmáticos de colesterol, e é capaz de permear a BHE ao tecido nervoso, sendo um dos possíveis mecanismos pelos quais os níveis periféricos de colesterol podem modular o colesterol encefálico (Heverin et al., 2014; Zhang et al., 2015).

O colesterol de membrana das células nervosas encontra-se disperso por toda a superfície celular. Além de sua função estrutural, que proporciona grande parte das características físicas da membrana, o colesterol pode modular a atividade de diferentes receptores e proteínas. Essa modulação deve-se, principalmente, pela formação de micro domínios lipídicos dinâmicos - balsas lipídicas - que podem alterar a localização, propriedades funcionais ou mesmo interiorização e exteriorização de proteínas periféricas e transmembrana. Essas propriedades tornam o colesterol crítico em eventos de sinalização e plasticidade sináptica que requerem alteração espacial e funcional de diferentes receptores (Segatto et al., 2012).

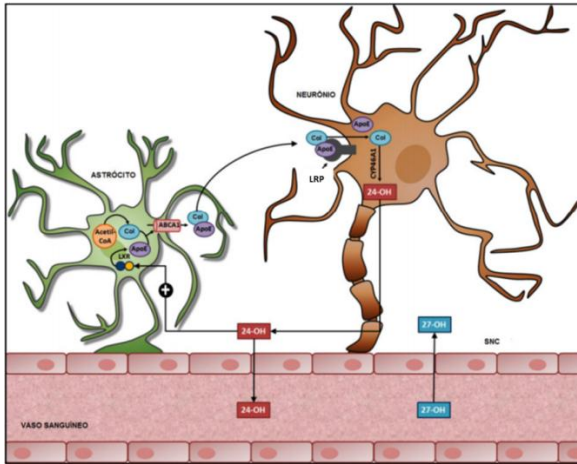


Figura 4. Metabolismo encefálico do colesterol.No SNC a produção do colesterol e lipoproteínas é principalmente feita pelos astrócitos. As lipoproteínas liberadas por estas células são absorvidas pelos neurônios através de receptores relacionados às lipoproteínas (do inglês *lipoprotein related protein* – LRP).

## Hipercolesterolemia

Segundo a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias, a hipercolesterolemia é uma condição de aumento dos níveis do colesterol plasmático, indicada por uma elevação isolada de LDL > 160 mg/dl. Tal condição é fator de risco ao desenvolvimento de diversas patologias cardiovasculares, e.g., aterosclerose, sendo que concentrações de colesterol plasmático > 240 mg/dl é considerado um dos principais fatores de risco de doenças cardiovasculares. A hipercolesterolemia pode desenvolver-se tanto por condições dietéticas inadequadas (e.g., consumo excessivo de alimentos hipercalóricos e ricos em colesterol) como por condições genéticas em que existam mutações deletérias em genes que codificam proteínas importantes no metabolismo do lipídeo, bem como pela sinergia destes fatores (Xavier et al., 2013). Devidos aos atuais hábitos alimentares, principalmente em países desenvolvidos, baseados principalmente no consumo de alimentos processados e hipercalóricos, vem desencadeando-se no mundo o que muitos autores

chamam de uma epidemia de obesidade. Por exemplo, segundo estimativas, em torno de 35% da população norte americana adulta, e entre 15 a 20% das crianças, são obesos (Mitchell et al., 2011). No Brasil, segundo estudo de 2016, a obesidade cresceu cerca de 60% em dez anos e, atualmente, 61% das pessoas entre 25 e 34 anos estão com excesso de peso, segundo dados publicados pelo Ministério da Saúde.

Além de fatores ambientais, fatores hereditários também podem influenciar no desenvolvimento de hipercolesterolemia. A HF é uma doença genética de herança codominante e que se caracteriza por níveis elevados de LDL na corrente sanguínea, presença de xantomas e risco elevado de doença cardiovascular prematura (Figura 5). Em geral, tal condição é associada a mutações deletérias no gene que codifica o rLDL. Conhece-se, atualmente, cerca de 1600 mutações neste gene capazes de ocasionar tal condição patológica. Tanto indivíduos heterozigotos como homozigotos, para tais mutações, apresentam HF, porém os casos de duas cópias do alelo mutado são mais graves. Cerca de uma em cada 500 pessoas apresentam a versão heterozigótica para a doença. O caso homozigótico é de cerca de um para cada milhão de indivíduos.

A hipercolesterolemia esta associada ao desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares, como a aterosclerose e as doenças arteriais coronarianas (Goldstein e Brown, 1977). Tal relação deve-se ao fato de que o acúmulo de LDL no sangue ocasiona lesões nos tecidos das artérias, conhecidas como estrias gordurosas. Mantendo as condições lipídicas elevadas, essas estrias podem, através da agregação de mais LDLs, desenvolverem-se em placas ateroscleróticas. Estas placas alteraram a estrutura do lúmen de diferentes artérias interrompendo, ou mesmo impedindo, o fluxo sanguíneo. Por consequência tal condição pode induzir doenças isquêmicas como derrames e enfartos.

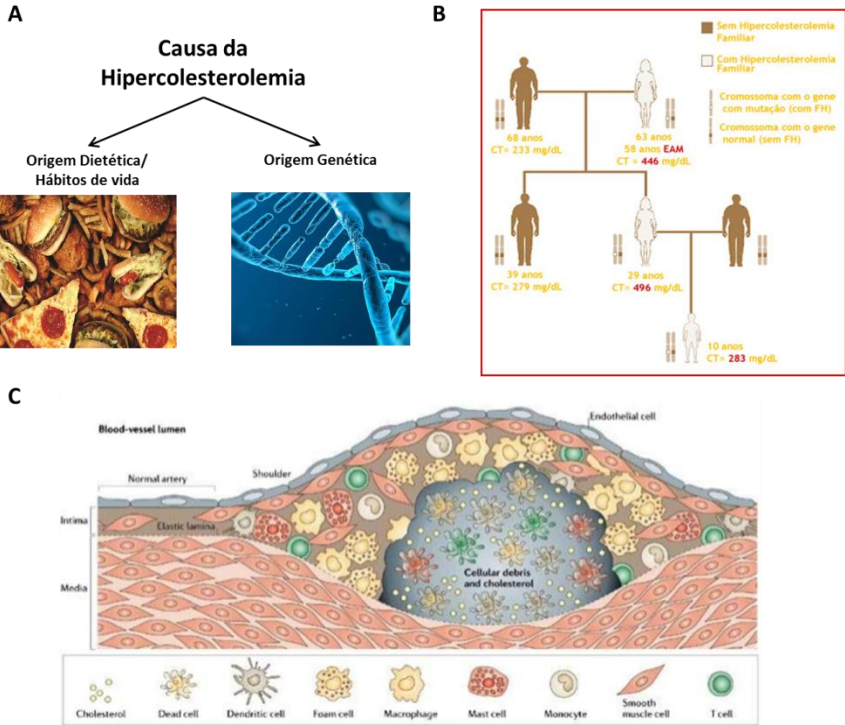


Figura 5. Hipercolesterolemia e dano vascular. A) Origem das causas de condições hipercolesterolêmicas. B) Heredograma exemplificando um caso heterozigoto do padrão de herança da hipercolesterolemia familiar (adaptado do site da sociedade portuguesa de cardiologia). C) Processo de formação de ateromas relacionado ao acúmulo de LDL nos vasos sanguíneos.

## Hipercolesterolemia e Prejuízos Cognitivos

Além de principal fator de risco ao desenvolvimento de aterosclerose e, conseqüentemente, doenças arteriais coronarianas, evidências mais atuais têm apontado condições hipercolesterolêmicas como fator de predisposição ao desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve e doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Kivipelto et al., 2006). Os estudos acerca de tal relação foram principalmente motivados pelo trabalho de Larry Sparks e colaboradores na década de 1990. Seu grupo de pesquisa demonstrou

que pacientes que vieram a óbito devido à doença arterial coronariana apresentavam significativamente mais deposição de placas amiloides em seus encéfalos quando comparados com indivíduos falecidos por outros motivos (Sparks et al., 1990). Em 1993, por meio de um amplo estudo de correlação genética, conduzido por Allen Roses e colaboradores, demonstrou que uma variante do alelo  $\epsilon 4$  do gene que codifica a APOE é um dos principais fatores de risco genético ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA) de início tardio (Schmechel et al., 1993).

Devido aos impactos de alterações nos níveis de colesterol plasmático ao sistema cardiovascular, e ao início de quadros de neuroinflamação em pacientes com doença de Alzheimer, surgiram hipóteses indicando uma possível relação entre doenças neurodegenerativas com danos neurovasculares, tendo em vista os conhecidos efeitos cardiovasculares de tal condição metabólica. Em um artigo bastante interessante publicado no periódico *Neurological Research*, Jack La Torre e colaboradores propuseram que o envelhecimento e fatores associados a danos cardiovasculares, como a hipercolesterolemia, poderiam acarretar em danos neurovasculares, que por sua vez seriam o gatilho para ao desenvolvimento da doença de Alzheimer esporádica. Desta forma, a soma de danos ocasionados por condições de risco ao sistema cardiovascular poderiam ser fatores ao desenvolvimento da doença de Alzheimer, estreitando a associação entre a hipercolesterolemia e danos no sistema nervoso (La Torre et al., 1999).

Prejuízos cognitivos não diretamente associados às doenças neurodegenerativas também parecem relacionar-se com o metabolismo do colesterol. Indivíduos com quadros de hipercolesterolemia, durante a idade adulta, demonstraram predisposição ao desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer em idades mais avançadas. Em um estudo de 2010, Zambon e colaboradores apresentaram dados demonstrando maior incidência de comprometimento cognitivo leve em pacientes com mais de 50 anos com HF, quando comparados a indivíduos saudáveis de mesma idade (Zambon et al., 2010). Uma recente meta-análise indica que indivíduos com HF apresentam prejuízos em funções executivas e memória, tendo maior predisposição ao desenvolvimento de demências em idades mais avançadas (Bagnasco, 2017).

## Hipercolesterolemia em Modelos Animais

Devido à proximidade filogenética, o baixo custo e a relativa facilidade de manutenção, roedores vêm sendo amplamente utilizados como modelo animal ao estudo dos efeitos da hipercolesterolemia e consequências no sistema cardiovascular (Getz e Reardon, 2016). Apesar do grande número de estudos utilizando roedores, é importante entender que o metabolismo lipídico de cada espécie é único e produto de sua evolução, logo, há significativas diferenças entre o metabolismo lipídico humano e destes animais (Lee et al., 2017). Em uma análise comparativa entre diversos modelos animais utilizados para indução de quadros de hipercolesterolemia, Wu Yin e colaboradores demonstraram que roedores possuem diferenças bastante acentuadas na distribuição de lipoproteínas (Yin et al., 2012). Tais diferenças, medidas no plasma sanguíneo de diferentes espécies, reforçam a necessidade de parcimônia quanto à translação envolvida nos resultados de experimentos com hipercolesterolemia induzida por dieta em roedores. A tabela 1 exemplifica algumas outras dessas diferenças.

Tabela 1. Comparação entre o metabolismo do colesterol em humanos e camundongos.

<b>Variável</b>	<b>Humanos</b>	<b>Camundongos</b>
Absorção de colesterol da dieta	5 mg/dia/Kg	30 mg/dia/Kg
Total de colesterol biosintetizado	10 mg/dia/Kg	160 mg/dia/Kg
Taxa de produção de LDL	13 mg/dia/Kg	50 mg/dia/Kg
Depuração de colesterol LDL pelo fígado	70%	80%

Ainda assim, a principal estratégia de indução de hipercolesterolemia em camundongos é fornecendo aos mesmos uma dieta enriquecida com colesterol. Esta abordagem tenta modelar uma condição de hipercolesterolemia ambiental, derivada da absorção do lipídeo por meio da dieta. Diversas composições de dieta podem ser observadas na literatura. Podem-se distinguir dietas enriquecidas em gordura daquelas enriquecidas com colesterol, sendo que em geral as primeiras apresentam geralmente altas taxas de gorduras totais (>50%) e nenhum acréscimo de colesterol. Por outro lado, dietas

hipercolesterolêmicas são aquelas que possuem enriquecimento com colesterol, apresentando baixa adição de outros tipos de gordura (em torno de 20%), apenas o necessário para que o colesterol possa ser solubilizado e acrescentado à composição.

Um dos primeiros trabalhos utilizando dieta enriquecida em colesterol em camundongos foi o trabalho de Wissler e sua equipe na década de 1960 (Vasselinovitch e Wissler, 1968). Neste estudo verificou-se que camundongos alimentados com dieta enriquecida em 30% de gordura, 5% de colesterol e 2% de ácido cólico apresentavam hipercolesterolemia e estrias gordurosas em diversas regiões vasculares, porém sem indução de atividade inflamatória severa. Posteriormente, demonstrou-se que mesmo dietas com 15% de gordura total e enriquecida apenas com 1,25% de colesterol também ocasionam hipercolesterolemia em camundongos. Camundongos C57BL/6 alimentados com tal dieta desenvolvem hipercolesterolemia branda e presença de estrias gordurosas em na raiz aórtica após 3 meses de dieta (Lee et al., 2017). Porém os danos vasculares ocasionados em camundongos devido a condições hipercolesterolêmicas de origem dietética não são equiparáveis aos danos vasculares em humanos acometidos pela aterosclerose. Diferenças em genes de proteínas envolvidas no metabolismo do colesterol parecem diminuir a suscetibilidade a danos vasculares e condições hipercolesterolêmicas em camundongos (Paigen et al., 1987).

Desta forma, modelos de hipercolesterolemia de origem genética foram criados no intuito de se observar efeitos de uma condição mais severa de hipercolesterolêmica em animais. Por exemplo, o camundongo C57Bl/6 nocaute para o gene do receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>) é um modelo clássico utilizado na modelagem da HF em roedores (Ishibashi et al., 1993). O camundongo com genótipo rLDL<sup>-/-</sup> foi idealizado e desenvolvido por Ishibashi e colaboradores que reproduziram animais machos e fêmeas homozigotos para uma deleção no gene do rLDL, produzida por meio de recombinação de homólogos em células troncos. Estes animais apresentam cerca de duas a três vezes mais colesterol total e até nove vezes o teor de LDL plasmático que os animais selvagens de onde derivou a geração parental.

## Efeitos da Hipercolesterolemia no Comportamento de Roedores

Motivados pela relação entre a hipercolesterolemia, prejuízos cognitivos e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, diversos grupos de pesquisa passaram a investigar os efeitos da hipercolesterolemia sobre o desempenho de roedores em diferentes testes comportamentais, e.g., paradigmas de aprendizagem e memória. Estas pesquisas variam na espécie utilizada, parâmetros da dieta empregados (e.g., concentração colesterol, duração da exposição à dieta, etc.) e paradigmas comportamentais avaliados. De modo notório, a grande maioria dos resultados obtidos ao momento sugerem efeitos prejudiciais da hipercolesterolemia sobre a cognição de roedores (Schreurs, 2010). Por exemplo, ratos da linhagem *Sprague Dawley* alimentados com dieta enriquecida com 5% de em colesterol, por 20 semanas, apresentaram prejuízos na aprendizagem do teste do labirinto radial de oito braços. Evidências também apontam para prejuízos na formação de memórias aversivas em ratos alimentados com dietas hipercolesterolêmicas. Khorrami e colaboradores demonstraram que ratos da linhagem *Wistar* alimentados com dieta enriquecida com 2% de colesterol, por 14 semanas, demonstram prejuízos na formação da memória na tarefa de esquiva passiva (Khorrami et al., 2015).

Em camundongos tanto a hipercolesterolemia induzida por dieta, como por genótipo, parecem ocasionar prejuízos cognitivos relacionados à memória. Thirumangalakudi e colaboradores alimentaram camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e rLDL<sup>-/-</sup> com dieta enriquecida com 1,25% em colesterol, por oito semanas, para avaliar aspectos cognitivos relacionados à memória no labirinto radial aquático de oito braços. Os camundongos do tipo selvagem que receberam a dieta enriquecida cometeram mais erros no teste do que os do tipo selvagem com dieta normal, o que sugere prejuízos em sua memória de trabalho. Este foi um dos primeiros resultados a evidenciar prejuízos cognitivos em camundongos C57BL/6 com hipercolesterolemia induzida por dieta. Indiferente da dieta, os animais rLDL<sup>-/-</sup> apresentaram significativamente mais erros do que os do tipo selvagem com dieta normal. A análise bioquímica demonstrou micróglia ativada no hipocampo dos animais hipercolesterolêmicos, sugerindo indícios de neuroinflamação. A análise de diferentes marcadores, como citocinas e mediadores inflamatórios, revelou um processo neuroinflamatório no hipocampo destes animais de forma acentuada e relacionada aos níveis de colesterol (Thirumangalakudi et al., 2008).



Mulder e colaboradores, em 2004, avaliaram o aprendizado espacial em camundongos rLDL<sup>-/-</sup> no labirinto aquático. Os pesquisadores observaram que a latência destes animais para encontrar a plataforma não diminuiu significativamente conforme as sucessivas sessões de treino, sendo assim, os mesmos parecem ter sido incapazes de aprender a tarefa. Neste trabalho, eles também verificaram que o desempenho da memória de trabalho destes animais foi diminuído quando comparado ao dos controles do tipo selvagem no labirinto em T adaptado para memória de trabalho. Ademais, o número de botões sinápticos imunorreativos à sinaptofisina, importante indicador de processos fisiológicos mnemônicos, foi avaliado na região CA1 do hipocampo e demonstrou-se diminuído nos animais nocaute (Mulder et al., 2007). Em 2007, a mesma equipe investigou a proliferação celular na região CA1 e no giro denteado do hipocampo nos animais rLDL<sup>-/-</sup>. Em particular, foi verificado que o número de células proliferativas marcadas com bromodeoxiuridina (BrdU) foi menor nos animais nocaute, sugerindo um prejuízo na neurogênese hipocampal (Mulder et al., 2007).

Em 2011, no primeiro trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa envolvendo animais hipercolesterolêmicos, camundongos rLDL<sup>-/-</sup> machos (3 meses de idade) foram alimentados com dieta enriquecida com 1,25% de colesterol por quatro semanas. Obtivemos evidências de prejuízo na formação de uma memória espacial de curto prazo nos animais rLDL<sup>-/-</sup>, indiferente da dieta, na tarefa de localização de objetos. Além disso, a análise da função mitocondrial dos animais rLDL<sup>-/-</sup> demonstrou prejuízo na atividade dos complexos mitocondriais I e II no córtex cerebral. Esse prejuízo foi mais severo conforme o aumento dos níveis de colesterol plasmático (i.e., análise de correlação). Os animais rLDL<sup>-/-</sup> também apresentaram significativo decréscimo dos níveis de glutathione (GSH) e desbalanço nos sistemas antioxidantes enzimáticos de remoção de peróxido. Ademais, também foi demonstrado aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, processo sugestivo de peroxidação dos lipídeos de membrana, i.e., dano por estresse oxidativo (Oliveira et al., 2011).

Em 2010, um estudo de Ullrich e colaboradores levantou a hipótese de que a hipercolesterolemia poderia prejudicar a cognição de roedores em decorrência de alterações na neurotransmissão colinérgica. Os pesquisadores demonstraram que ratos alimentados com dieta enriquecida com 5% de colesterol, por 20 semanas, apresentaram prejuízos no aprendizado e na formação da memória de longo prazo no labirinto radial de 8 braços. Acompanhado de tais alterações cognitivas,

demonstrou-se diminuição no número de neurônios positivos para a colina acetiltransferase (ChAT) no núcleo basal de Maynert, importante área de regulação do sistema colinérgico. Ainda, os níveis totais de acetilcolina no encéfalo dos animais alimentados com a dieta hipercolesterolêmica apresentaram-se diminuídos em relação ao grupo controle (Ullrich et al., 2010).

Neste sentido, nosso grupo de pesquisa avaliou os efeitos da hipercolesterolemia induzida por genótipo na memória operacional, de referência e procedural de camundongos rLDL<sup>-/-</sup> de 3 e 14 meses de idade. Verificou-se que tal condição causou prejuízos mais pronunciados nos camundongos idosos, apesar de também ter causado nos camundongos jovens. De particular importância, neste trabalho evidenciou-se um aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no córtex pré-frontal destes animais, sugerindo efeitos da hipercolesterolemia, dependentes da idade, tanto em nível comportamental como em nível neuroquímico associado ao sistema colinérgico (Moreira et al., 2012). Na sequência nosso grupo de pesquisa aprofundou tal relação e demonstrou que camundongos da linhagem *Swiss* com hipercolesterolemia induzida por dieta enriquecida com 1,25% de colesterol, por oito semanas, apresentaram prejuízos na formação da memória de curto prazo, no teste de localização de objetos. Além disso, a dieta também acarretou em aumento na atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais. Este aumento na atividade desta enzima também foi demonstrado em cultura de células SH-SY5Y, sendo que a adição de colesterol LDL nas culturas aumentou a atividade da AChE de maneira concentração-dependente (Moreira et al., 2014).

De modo geral, embora um grande número de estudos tenham sido realizados, nenhum dos mesmos avaliou os efeitos das dietas enriquecidas em colesterol por curtos períodos de tempo (e.g., até quatro semanas) e em camundongos de diferentes idades. O período de exposição à dieta hipercolesterolêmica em geral varia de 2 a 20 meses. Sendo assim, a compreensão da relação entre as fases iniciais do desenvolvimento da hipercolesterolemia e as alterações comportamentais (e.g., cognitivas) ainda são pouco esclarecidas. Além disso, investigações mais profundas entre a relação da disponibilidade de acetilcolina em relação às fases iniciais da condição hipercolesterolêmica são necessárias ao esclarecimento da progressão das alterações neste importante sistema de neurotransmissão. Com base no exposto, a hipótese do presente trabalho é de que a hipercolesterolemia, induzida por meio de alterações na dieta ou

genótipo, induz prejuízos de aprendizagem de uma memória aversiva de longa duração em camundongos. Ademais, uma segunda hipótese, derivada da primeira, é de que fatores sabidamente perturbadores da homeostase do sistema colinérgico, e.g., envelhecimento e intervenções farmacológicas no sistema, potencializam a severidade dos prejuízos de aprendizagem de uma memória aversiva de longa duração, conquanto o aumento no tônus colinérgico durante a fase de consolidação da memória é capaz de reverter os prejuízos cognitivos induzidos pela hipercolesterolemia. Como consequência, dentro de seu limite translacional, este trabalho visa contribuir à investigação das relações entre o metabolismo do colesterol e os processos de aprendizagem e memória.

Por fim, ressalta-se que poucos trabalhos avaliaram os efeitos da hipercolesterolemia sobre a cognição em camundongos fêmeas. É importante notar que camundongos fêmeas exibem diferenças na distribuição do receptor de LDL em diferentes regiões do encéfalo quando comparadas aos machos. Por exemplo, o hipocampo de camundongos fêmeas idosas apresenta uma densidade de rLDL cerca de 40% maior do que machos da mesma idade, conquanto o córtex pré-frontal das fêmeas apresenta uma densidade de rLDL cerca de 20% menor do que os machos (Segatto et al., 2012). Além disso, mesmo o metabolismo do colesterol hepático das fêmeas possui diferenças em relação ao dos machos, existindo variação sexual quanto a quantidade total de colesterol hepático, absorção e síntese e, ainda, na expressão do gene para o rLDL em diferentes tecidos extra-hepáticos (Lorbek et al., 2013). Tendo em vista, ainda, o uso exagerado de animais machos nas pesquisas, um viés perigoso e ineficaz na translação de estudos em animais para humanos, o presente estudo empregou apenas camundongos fêmeas em suas análises.



## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Investigar os efeitos da hipercolesterolemia, induzida por meio de alterações na dieta ou genótipo, na formação de uma memória aversiva contextual de longa duração em camundongos.

### Objetivos Específicos

- I. Avaliar o comportamento exploratório de camundongos fêmeas, da linhagem C57BL/6, jovens e idosas, alimentadas com dieta enriquecida em colesterol (1,5%) por quatro semanas, no teste do labirinto em cruz elevado.
- II. Avaliar a formação de uma memória aversiva contextual em camundongos fêmeas, da linhagem C57BL/6, jovens e idosas, alimentadas com dieta enriquecida em colesterol (1,5%) por quatro semanas, por meio do paradigma do condicionamento aversivo ao contexto.
- III. Investigar, em camundongos fêmeas jovens, da linhagem C57BL/6, o possível efeito sinérgico da exposição à dieta enriquecida com colesterol com uma dose não efetiva do fármaco escopolamina, antagonista de receptores muscarínicos, durante a fase de consolidação de uma memória aversiva contextual.
- IV. Avaliar o comportamento exploratório de camundongos fêmeas, da linhagem C57BL/6 e nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>), no teste do labirinto em cruz elevado.
- V. Avaliar a formação de uma memória aversiva contextual em camundongos fêmeas, da linhagem C57BL/6 e nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>), por meio do paradigma do condicionamento aversivo ao contexto.
- VI. Investigar, em camundongos fêmeas, da linhagem C57BL/6 e nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>), os efeitos da administração de donepezil, inibidor da enzima acetilcolinesterase, durante a fase de consolidação de uma memória aversiva contextual.



## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados neste trabalho camundongos C57BL/6 fêmeas jovens (03 meses), adultas (12 meses) e idosas (24 meses). Também foram utilizados camundongos fêmeas adultas nocaute para o receptor de LDL (designados rLDL<sup>-/-</sup>), descritos previamente (Ishibashi et al., 1993). Os camundongos foram cedidos pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreza Fabro de Bem, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Os progenitores foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA). Os animais foram alojados em caixas plásticas (42 x 34 x 17 cm), com no máximo 10 animais por caixa. As caixas moradia foram mantidas em estantes isoladoras, com livre acesso à água e comida (Nuvilab CR1, Nuvital; Quimtia Nutrientes SA, Colombo, PR, Brasil). As estantes foram programadas com condição controlada de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 06:00 às 18:00 h). Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC), protocolado com o número 1793080916, estando de acordo com a Lei federal 11.794 de 2008.

### Modelos experimentais de hipercolesterolemia

Foram utilizados dois modelos para modelar a hipercolesterolemia em roedores. Em um primeiro momento, a hipercolesterolemia foi induzida por alterações na dieta. Os animais foram alimentados com dieta enriquecida em 1,5% de colesterol e 20% de gordura (Rhostrer Indústria e Comércio, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) por quatro semanas (Tabela 2). Em um segundo momento, foi utilizado o modelo de hipercolesterolemia familiar, camundongos nocaute para o receptor de LDL. Este modelo vem sendo amplamente utilizado no estudo da hipercolesterolemia em roedores. O nível plasmático de colesterol destes animais é de duas a três vezes maior que o de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem. Quando alimentados como dietas ricas em colesterol, estes níveis podem aumentar em até dez vezes em comparação com camundongos do tipo selvagem (Ishibashi et al., 1993).

Tabela 2. Comparação entre a dieta padrão de roedores com a dieta enriquecida em colesterol utilizada neste trabalho (Minatti et al., 2012).

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta Padrão de Roedores</b>	<b>Dieta Enriquecida com Colesterol</b>
<b>Proteína</b>	22%	21%
<b>Gordura</b>	4%	20%
<b>Carboidrato</b>	46,50%	47,75%
<b>Mix de minerais</b>	1%	1%
<b>Cholesterol</b>	0%	1,5%

## **Paradigmas Comportamentais**

Todos os experimentos foram realizados no turno da tarde (13h: 00 – 17h: 00), em condições controladas de temperatura e luminosidade. Os animais foram transportados à sala de experimentos climatizada para ambientação 1 hora antes do início de todos os experimentos comportamentais. Após cada experimento, os aparatos eram limpos com etanol 10%. Os experimentos comportamentais foram registrados por meio de câmera digital VX 3000 da Microsoft. Para facilitar a análise, foi utilizado o programa Ethowatcher (Crispim Junior et al., 2012).

## **Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

Este modelo baseia-se no conhecimento de que roedores evitam locais abertos e elevados. Quando neles confinados, mostram sinais de medo – congelamento, defecação e micção – e aumento do nível plasmático do hormônio de estresse, cortisona. O roedor explora ambos os braços, abertos e fechados, mas tipicamente entrará com maior frequência e permanecerá por mais tempo nos braços fechados. Uma maior intensidade de “ansiedade” equivale a menor preferência por braços abertos. Este teste representa um importante instrumento de pesquisa na área experimental para estudos de comportamentos relacionados à ansiedade, em especial na análise do efeito farmacológico de novas drogas (Lister, 1987).



No presente estudo, o aparato para camundongos, feito de acrílico transparente, consistia de dois braços abertos (18 x 6 cm), opostos a dois braços fechados (18 x 6 x 6 cm), elevados 60 cm acima do chão. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) mede 6 x 6 cm. Cada animal foi individualmente colocado na plataforma central de frente para o um braço fechado e foram observados durante um período de 5 min. Foram analisados os seguintes parâmetros: o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados (foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estiverem no interior do braço) e o número total de avaliações de risco. Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos [%EA: entradas nos braços abertos / (entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados)]; porcentagem de permanência nos braços abertos [%TA: tempo nos braços abertos / (tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados)]. Além disso, foi utilizado o número total de entradas nos braços fechados como uma medida de locomoção (Figura 6).

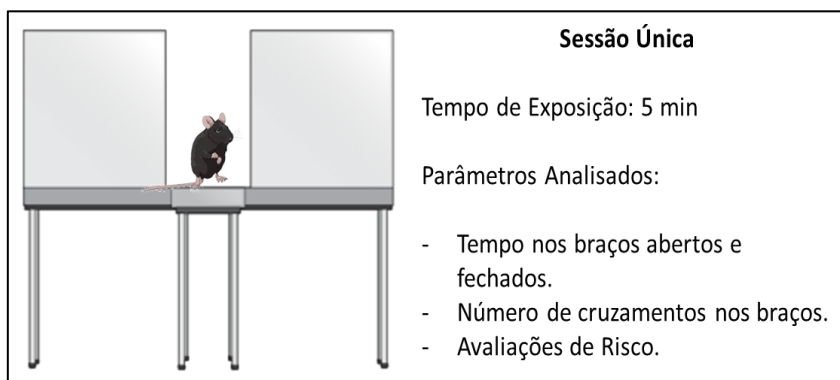


Figura 6. Teste do Labirinto em Cruz Elevado.

### **Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC)**

O CAC vem sendo amplamente utilizado na pesquisa sobre processos de aprendizado e memória, transtorno de estresse pós-traumático e disfunções associadas à memória (e.g., doença de Alzheimer). Nesta tarefa, o aprendizado ocorre em apenas uma sessão de treino e gera uma memória de longo prazo. De particular importância

para os objetivos do presente projeto de pesquisa, essa memória pode ser manipulada (i.e., acessada) farmacologicamente em diversas fases do processo mnemônico como: aquisição, consolidação, reconsolidação e extinção. Ressalta-se que o hipocampo e a amígdala são necessários para a formação e evocação desta memória (Izquierdo et al., 2016).

No presente protocolo experimental, inicialmente, a sessão de familiarização consistiu na exposição dos animais, por 3 min, à caixa de condicionamento contextual (contexto A), que é feita de alumínio (35 x 20 x 30 cm), com a parede frontal e teto de acrílico e piso gradeado (com barras metálicas de 3 mm de diâmetro, afastadas 0,9 mm centro a centro). Um gerador de choques estava conectado ao piso gradeado, permitindo a aplicação de choques elétricos, conforme o protocolo experimental. O condicionamento contextual (sessão de treino) foi realizado logo na sequência da fase de familiarização, também no contexto A. Nessa ocasião, o animal recebeu choque de 0,3 mA por 3 segundos. Após 30 segundos do primeiro choque os animais receberam novamente mais um choque nos mesmos parâmetros e, após 30 segundos, foram retirados do contexto, retornando a sua caixa moradia. 48 h após essa etapa de treino, os animais foram submetidos à caixa de condicionamento durante três minutos, para avaliar a expressão da memória formada anteriormente (sessão de teste). Como parâmetro de retenção de memória, foi registrada a porcentagem de tempo de congelamento ('freezing'), caracterizado pela ausência completa de movimentos, exceto os necessários para respiração (Figura 7).

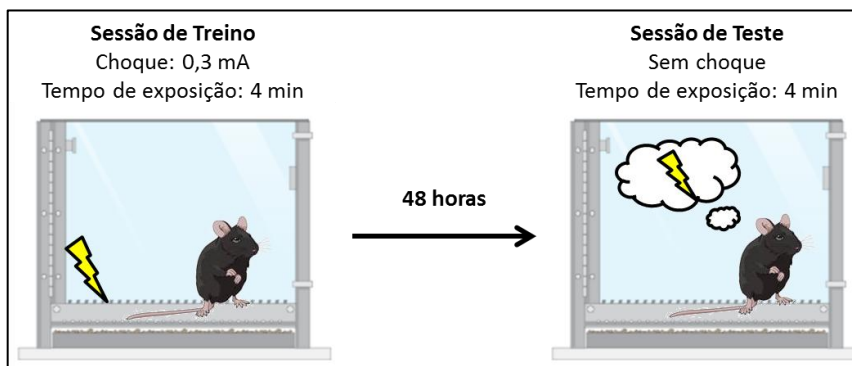


Figura 7. Condicionamento Aversivo ao Contexto.

## Desenhos Experimentais

Delineamento Experimental I: Avaliação dos efeitos da hipercolesterolemia, induzida por alterações na dieta, sobre a emocionalidade e formação de uma memória aversiva de longa duração em camundongos fêmeas, da linhagem C57Bl/6, jovens e idosos.

Neste experimento foram utilizados camundongos fêmeas jovens e camundongos fêmeas idosas. Os animais foram divididos quatro grupos (N = 8-10): 1) camundongos jovens alimentados com dieta padrão (Jovem-DP), 2) jovens alimentados com dieta enriquecida com colesterol (Jovem-DEC), 3) idosas alimentadas com dieta padrão (Idosas-DP) e 4) idosas alimentadas com dieta enriquecida com colesterol (Idosas-DEC). A duração da dieta foi de quatro semanas, sendo que a cada semana os animais foram pesados para controle da massa corporal. Após o término dos 30 dias os animais foram testados no LCE no dia 1 e nos dias 2 e 4 passaram pelo CAC. Ressalta-se que, durante os quatro dias dos testes comportamentais, os animais foram mantidos com suas respectivas dietas (Figura 8).

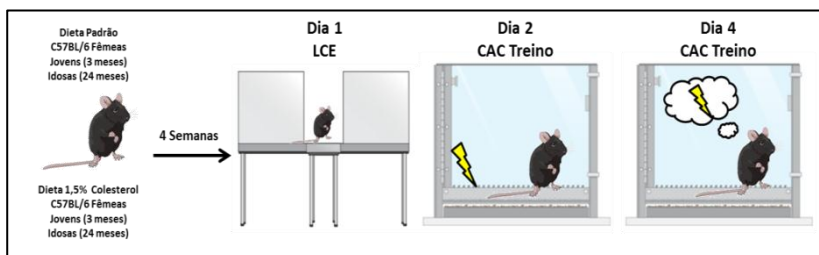


Figura 8. Delineamento Experimental I.

Delineamento Experimental 2: Determinação de uma dose de escopolamina sem efeito na consolidação de uma memória aversiva contextual.

Os efeitos de uma dose não efetiva do agente amnésico escopolamina<sup>1</sup> na consolidação de uma memória aversiva foram investigados para validar uma dose que não exerça efeitos detectáveis sobre a consolidação da memória aversiva e, assim, pudesse ser utilizada nos experimentos subsequentes. Para este objetivo, camundongos C57Bl/6 fêmeas de três meses de idade (alimentados com dieta padrão; n = 8) receberam; imediatamente após o treino no condicionamento aversivo, veículo ou escopolamina (0,37; 0,75 e 1,5 mg/kg; i.p.) e foram submetidos à sessão de teste do condicionamento aversivo após 48 horas, com o intuito de evitar possíveis efeitos comportamentais induzidos pela substância (Figura 9).

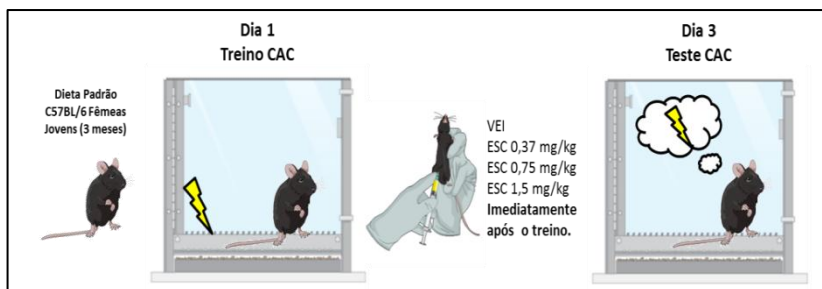


Figura 9. Delineamento Experimental II.

Delineamento Experimental 3: Avaliação dos possíveis efeitos sinérgicos de uma dieta enriquecida em colesterol e uma dose não efetiva de escopolamina na consolidação de um memória aversiva em camundongos fêmeas jovens.

---

<sup>1</sup> O fármaco escopolamina é um antagonista dos receptores muscarínicos. A escopolamina é considerada o padrão ouro para induzir prejuízos colinérgicos sobre processos de aprendizagem e memória em diferentes testes comportamentais em roedores (Klinkenberg and Blorland, 2010).

Neste desenho experimental, objetivou-se avaliar os efeitos sinérgicos entre uma dose não efetiva de escopolamina e a exposição à dieta enriquecida com colesterol sobre a consolidação da memória aversiva. Especificamente, camundongos C57Bl/6 fêmeas de três meses de idade foram randomicamente divididos em dois grupos experimentais ( $n = 16$ ) e alimentados por quatro semanas com diferentes dietas: (DP) dieta padrão para roedores ou (DEC) dieta enriquecida com colesterol. Após este período, os camundongos foram submetidos ao treino no teste de condicionamento aversivo ao contexto. Imediatamente após o treino, metade dos animais de cada grupo receberam veículo (NaCl 0,9%; i.p.) ou escopolamina (0,37 mg/kg; i.p.). Após 48 horas os animais foram submetidos à sessão de teste no condicionamento aversivo ao contexto (Figura 10).

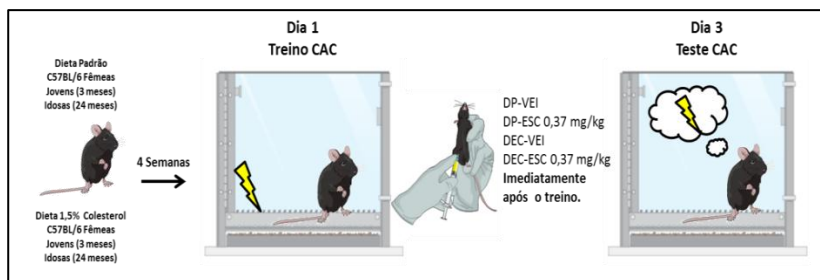


Figura 10. Delineamento Experimental III.

**Delineamento Experimental 4:** Avaliação dos efeitos da hipercolesterolemia, induzida por alterações no genótipo, sobre a emocionalidade e formação de uma memória aversiva de longa duração em camundongos fêmeas, da linhagem C57Bl/6 e nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>).

Neste experimento foram utilizados camundongos fêmeas com 12 meses de idade, sendo camundongos do tipo selvagem e camundongos rLDL<sup>-/-</sup>. Os animais foram testados no LCE no dia 1 e nos dias 2 e 4 passaram pelo CAC (Figura 11).

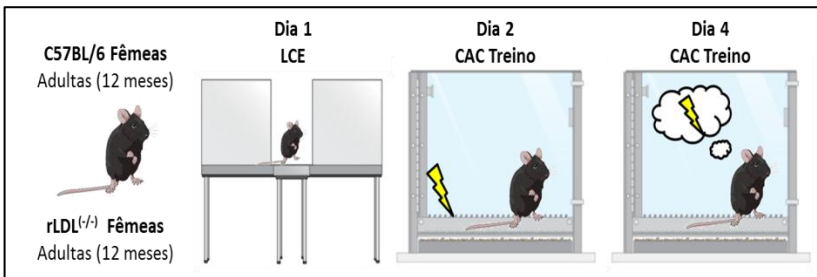


Figura 11. Delineamento Experimental IV.

Delineamento Experimental 5: Avaliação dos efeitos da administração de donepezil, inibidor da enzima acetilcolinesterase, durante a fase de consolidação de uma memória aversiva contextual camundongos fêmeas  $rLDL^{(-/-)}$ .

Neste desenho experimental, objetivou-se avaliar se a administração do fármaco donepezil<sup>2</sup>, um inibidor reversivo da enzima acetilcolinesterase, administrado durante a janela de consolidação da memória aversiva contextual, iria mitigar os prejuízos de aprendizagem e memória dos camundongos  $rLDL^{(-/-)}$ . Especificamente, foram utilizados camundongos fêmeas, sendo camundongos do tipo selvagem e camundongos  $rLDL^{(-/-)}$ , os quais divididos nos seguintes grupos: 1) camundongos do tipo selvagem que receberam salina após a sessão de treino do CAC; 2) camundongos do tipo selvagem que receberam o fármaco cloridrato de donepezil (3 mg/kg; i.p.) após a sessão de treino do CAC; 3) camundongos  $rLDL^{(-/-)}$  que receberam salina após o treino do CAC e 4) camundongos  $rLDL^{(-/-)}$  que receberam cloridrato de donepezil (3 mg/kg; i.p.) imediatamente após o treino do CAC. No primeiro dia os animais passaram pela sessão de treino do CAC e imediatamente após receberam seus respectivos tratamentos. Após 48 horas os animais passaram pela sessão de teste do CAC (Figura 12). A dose de cloridrato de donepezil foi escolhida em decorrência de um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa que demonstrou efeitos

<sup>2</sup> O fármaco donepezil, inibidor reversível da enzima acetilcolinesterase, é um agente com propriedades positivas sobre os processos de aprendizagem e memória, atuando no aumento da disponibilidade de acetilcolina na fenda sináptica ao inibir sua hidrólise (Dooley e Lamb, 2000).

positivos do tratamento crônico (i.e., 21 dias) nos prejuízos cognitivos observados nos animais rLDL<sup>-/-</sup> (Lopes et al., 2015).

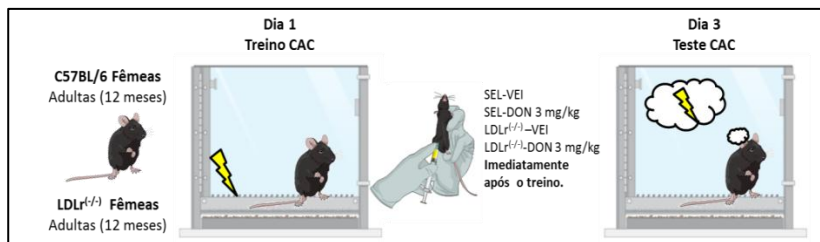


Figura 12. Delineamento Experimental V.

### Quantificação dos Níveis de Colesterol Plasmático.

Os níveis de colesterol plasmático foram quantificados por meio de ensaio bioquímico empregando reagente comercial (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as especificações do fabricante.

### Análises Estatísticas.

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas por meio de teste “t” de Student para amostras independentes ou por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Dunnett, quando apenas os tratamentos foram analisados. Para comparar dois ou mais grupos, juntamente com demais variáveis, ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni foi utilizado. Valores de P menores que 0,05 (\*P < 0,05) foram considerados como indicativos de significância.





## RESULTADOS

**Experimento I:** Avaliação dos efeitos da hipercolesterolemia, induzida por alterações na dieta, sobre a emocionalidade e formação de uma memória aversiva de longa duração em camundongos fêmeas, da linhagem C57Bl/6, jovens e idosos.

Inicialmente, cabe ressaltar que não houve alterações entre os grupos experimentais acerca da massa corpórea dos animais durante o período experimental (ANOVA de duas vias com medidas repetidas). Ademais, a análise dos níveis plasmáticos de colesterol demonstrou que, mesmo por um curto período de tempo, a dieta enriquecida com colesterol foi capaz de induzir hipercolesterolemia nos animais. O grupo de camundongos fêmeas jovens que recebeu a dieta enriquecida com colesterol apresentou um aumento de aproximadamente 20% nos níveis de colesterol plasmático em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, o grupo de camundongos fêmeas idosas que recebeu a dieta enriquecida com colesterol apresentou um aumento ainda maior, de aproximadamente 100%, nos níveis de colesterol plasmático em relação ao grupo controle idosas ( $p < 0,05$ ).

Neste bloco experimental também foram avaliados os parâmetros comportamentais de camundongos fêmeas, jovens e idosas, expostas à dieta enriquecida com colesterol (DEC), frente a um estímulo aversivo incondicionado, i.e., uma única exposição a um LCE (Figura 13). A análise de variância (ANOVA) de duas vias indicou um efeito significativo ao fator dieta para a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos [ $F(1,31)=26,38$ ;  $p < 0,0001$ ]. Também foi observado um efeito significativo da dieta [ $F(1,31)=18,59$ ;  $p < 0,001$ ] e uma interação entre dieta e idade [ $F(1,31)=11,85$ ;  $p < 0,01$ ] para a porcentagem de entradas nos braços abertos do aparato. Ademais, a ANOVA indicou um efeito significativo do fator idade para o número de avaliações de risco [ $F(1,31)=15,86$ ;  $p < 0,001$ ]. Finalmente, foi observado um efeito da idade [ $F(1,31)=12,18$ ;  $p < 0,005$ ] e da dieta [ $F(1,31)=11,09$ ;  $p < 0,005$ ] no número total de entradas nos braços fechados do aparato. Comparações *post-hoc* subsequentes indicaram que os camundongos tratados com dieta enriquecida com colesterol

(independente da idade) apresentaram um aumento significativo na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em comparação com o respectivo grupo controle ( $P<0,05$ ) (Figura 13A). Além disso, o envelhecimento foi capaz de diminuir a porcentagem de entradas nos braços abertos especificamente nos camundongos do grupo dieta padrão (controle) ( $P<0,05$ ) (Figura 13B). Ainda, o envelhecimento diminuiu o número de avaliações de risco nos camundongos, especificamente nos camundongos do grupo dieta enriquecida com colesterol ( $P<0,005$ ) (Figura 13C). Finalmente, as análises *post-hoc* demonstraram que o envelhecimento e a dieta enriquecida com colesterol aumentaram de modo significativo o número de entradas nos braços fechados ( $P<0,05$ ) (Figura 13D).

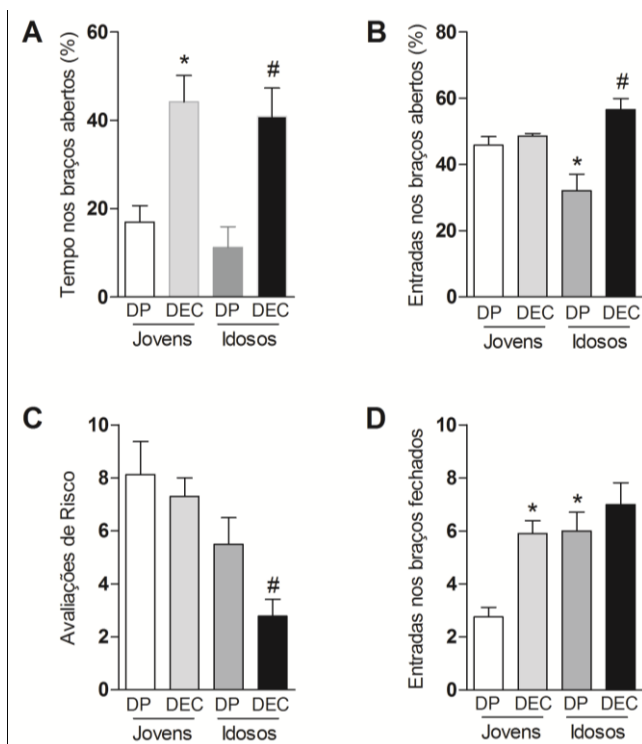


Figura 13. Avaliação dos parâmetros comportamentais de camundongos fêmeas, jovens e idosas, expostas à dieta enriquecida com colesterol (DEC), frente a um estímulo aversivo incondicionado, i.e., exposição ao LCE. A) Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos do

aparto. B) Porcentagem de entradas nos braços abertos do aparato. C) Número de avaliações de risco feitas pelos animais. D) Total de entradas nos braços fechados do aparato. Valores demonstrados como média + erro padrão da média (n = 8-10 camundongos/grupo). Os dados foram analisados com ANOVA de duas vias seguido de teste *post-hoc* Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$  comparado com grupo jovem/DP e #  $p < 0,05$  comparado com grupo idosos/DP.

Os efeitos da dieta enriquecida com colesterol em resposta a um estímulo aversivo condicionado estão apresentados na Figura 14. As análises estatísticas não mostraram efeitos significativos entre os grupos acerca dos níveis de congelamento (*freezing*) basais. Por outro lado, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da dieta [F(1,31)=9.49;  $p < 0.005$ ] e da interação entre idade e dieta [F(1,31)=5.47;  $p < 0.05$ ] para a porcentagem de resposta de congelamento. Comparações *post-hoc* subsequentes indicaram que o grupo de animais idosos tratados com dieta enriquecida com colesterol apresentou resposta de congelamento significativamente menor que os animais da mesma idade submetidos à dieta padrão ( $P \leq 0.005$ ).

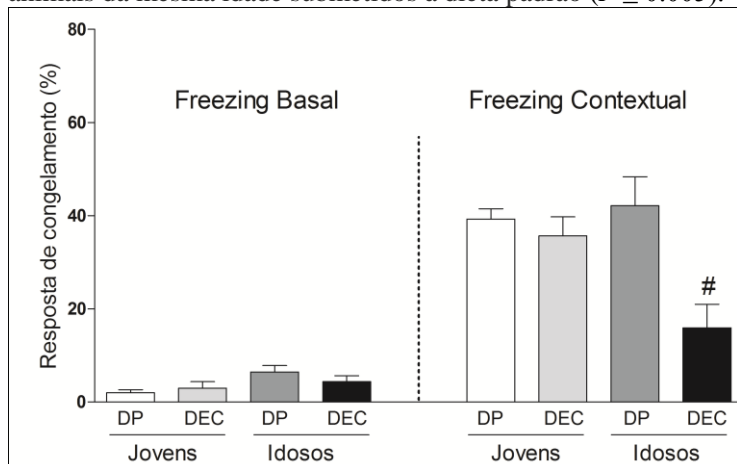


Figura 14. Avaliação dos efeitos de uma dieta enriquecida com colesterol (DEC) na formação de uma memória aversiva contextual. Camundongos C57Bl/6 fêmeas jovens (três meses de idade) e idosos (24 meses de idade) foram expostos diariamente por 4 semanas a uma dieta padrão (DP) ou dieta enriquecida com colesterol (DEC). Após, foram submetidos ao teste do condicionamento aversivo ao contexto. Os

valores estão representados com média + erro padrão da média (n = 8-10 camundongos/grupo). Os dados foram analisados com ANOVA de duas vias seguido de teste *post-hoc* Newman-Keuls. #  $P < 0,05$  comparado com o grupo ECD jovem.

**Experimento 2:** Determinação de uma dose de escopolamina sem efeito na consolidação de uma memória aversiva contextual.

Neste experimento foram verificados os efeitos de três diferentes doses (0,37, 0,75 e 1,5 mg/kg, i.p.) de escopolamina na janela da consolidação de uma memória aversiva contextual em camundongos jovens fêmeas. Como esperado, a análise estatística não mostrou efeito significativo entre os grupos acerca dos níveis basais de congelamento (Figura 15). Por outro lado, a ANOVA de uma via mostrou que a associação contexto-choque foi prejudicada pelo tratamento com escopolamina [ $F(3,28)=42.36$ ;  $p<0.00001$ ]. Análises *post-hoc* subsequentes mostraram que esse efeito ocorreu de uma maneira dose-dependente. Enquanto a menor dose de escopolamina (i.e., 0,37 mg/kg) não apresentou efeito no condicionamento ao contexto, as doses mais altas de escopolamina (0,75 e 1,5 mg/kg; i.p.) causaram um prejuízo significativo na resposta de congelamento comparados com o grupo controle ( $P \leq 0.0005$ ). A dose de escopolamina não efetiva (0,37 mg/kg) foi selecionada para experimentos subsequentes.

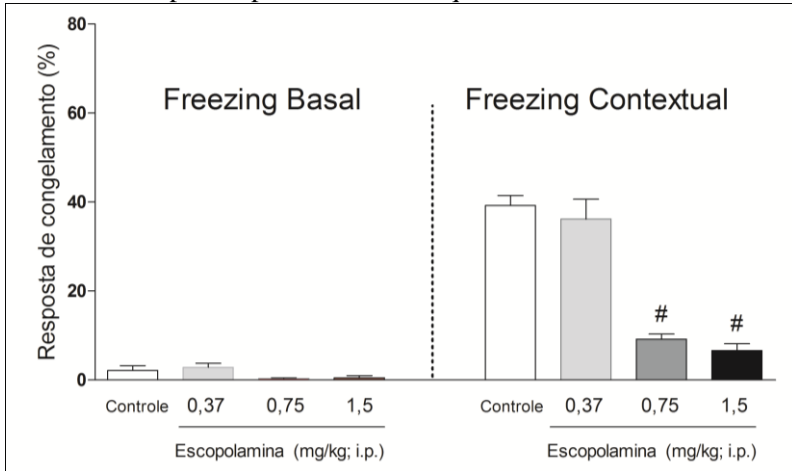


Figura 15. Curva dose-resposta do efeito da escopolamina via i.p. durante a fase de consolidação de uma memória aversiva contextual em camundongos fêmeas. Camundongos C57Bl/6 fêmeas de três meses de idade (expostas à dieta controle) receberam, imediatamente após o treino, veículo ou escopolamina (0,37; 0,75 e 1,5 mg/kg; i.p.) e foram submetidas à sessão de teste do condicionamento aversivo ao contexto 48 horas após. Os valores estão representados com média + erro padrão da média (n = 8 camundongos/grupo). #  $P < 0,05$  comparado com o grupo controle (Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

**Experimento 3:** Avaliação dos possíveis efeitos sinérgicos de uma dieta enriquecida em colesterol e uma dose não efetiva de escopolamina na consolidação de um memória aversiva em camundongos fêmeas jovens.

Neste experimento, foram avaliados os possíveis efeitos aditivos da interação entre a dieta enriquecida com colesterol e a dose de escopolamina não efetiva no condicionamento aversivo ao contexto em camundongos jovens. Como esperado, a análise estatística não mostrou efeito significativo entre os grupos acerca dos níveis basais de congelamento (Figura 16). Por outro lado, a ANOVA de duas vias para a porcentagem de resposta de congelamento mostrou um efeito significativo da dieta [ $F(1,28)=18.12$ ;  $p<0.0005$ ], tratamento [ $F(1,28)=5.8$ ;  $p<0.05$ ] e da interação entre dieta e tratamento [ $F(1,28)=14.74$ ;  $p<0.001$ ]. Análises *post-hoc* subsequentes indicaram que os animais expostos a dieta enriquecida com colesterol e tratados com a dose de 0,37 mg/kg de escopolamina mostraram menos tempo de congelamento que os animais do grupo controle exposto à dieta enriquecida com colesterol ( $P \leq 0.005$ ).

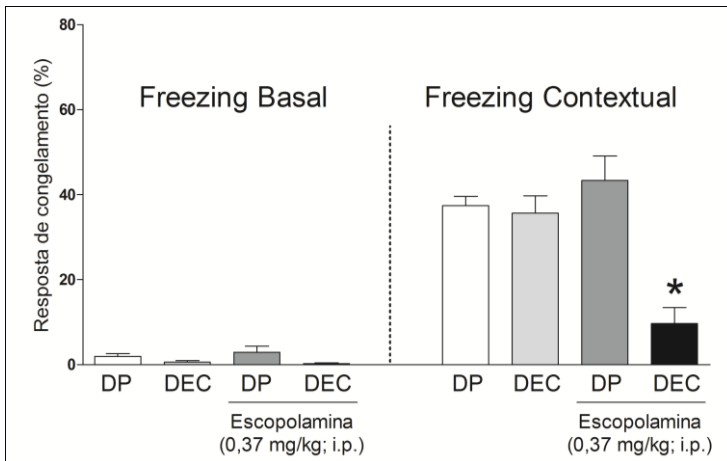


Figura 16. Avaliação do efeito sinérgico da DEC e de administração aguda de escopolamina durante a consolidação da memória aversiva contextual em camundongos fêmeas jovens. Camundongos C57Bl/6 fêmeas de três meses de idade foram divididas em dois grupos experimentais (n = 16) e expostas diariamente por 4 semanas a uma dieta padrão (DP) ou dieta enriquecida com colesterol (DEC). Após, foram submetidas ao condicionamento aversivo ao contexto. Imediatamente após o treino, metade dos animais de cada grupo recebeu veículo ou escopolamina (0,37 mg/kg; i.p.). 48 horas após foram submetidas à sessão de teste do condicionamento aversivo ao contexto. Os valores estão representados com média + erro padrão da média (n = 8 camundongos/grupo). \*P < 0,05 comparado com o DEC controle (Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Experimento 4: Avaliação dos efeitos da hipercolesterolemia, induzida por alterações no genótipo, sobre a emocionalidade e formação de uma memória aversiva de longa duração em camundongos fêmeas, da linhagem C57Bl/6 e nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>).

Neste experimento foram avaliados os parâmetros comportamentais de camundongos fêmeas, C57Bl/6 do tipo selvagem e nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>), frente a um estímulo aversivo incondicionado, i.e., uma única exposição a um LCE (Figura 17). As análises estatísticas, por meio do teste t de *Student* para amostras independentes, demonstraram que os camundongos (rLDL<sup>-/-</sup>)

apresentaram um aumento no tempo de permanência nos braços abertos do aparato em comparação com os camundongos do tipo selvagem ( $t = 2,52$ ,  $df = 13$ ,  $P \leq 0,05$ ). Por outro lado, não foram observadas diferenças entre os grupos com relação à porcentagem de entradas nos braços abertos ( $t = 0,92$ ,  $df = 13$ ,  $P = 0,37$ ), número de avaliações de risco ( $t = 1,88$ ,  $df = 13$ ,  $P = 0,08$ ) e no número total de entradas nos braços fechados ( $t = 1,17$ ,  $df = 13$ ,  $P = 0,26$ ).

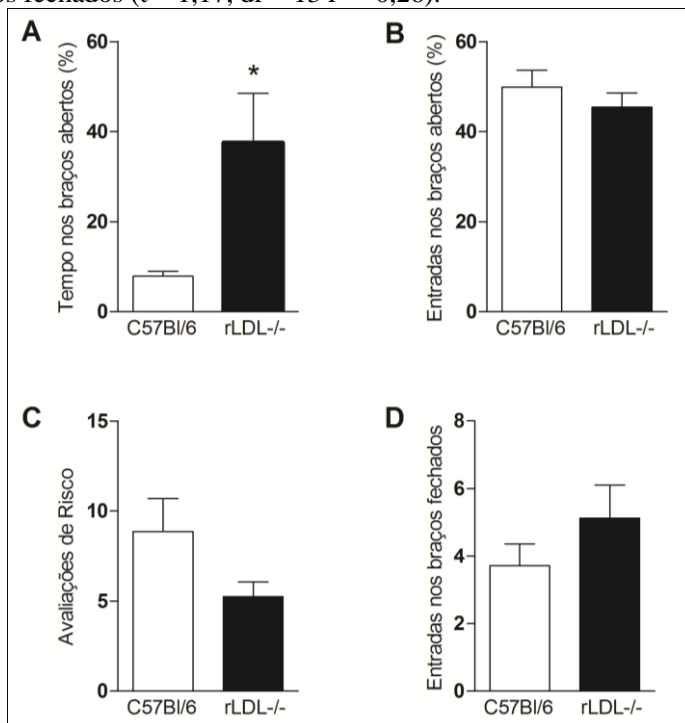


Figura 17. Avaliação dos parâmetros comportamentais de camundongos fêmeas, C57Bl/6 do tipo selvagem e nocaute para o rLDL, frente a um estímulo aversivo incondicionado, i.e., exposição ao LCE. A) Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos do aparato. B) Porcentagem de entradas nos braços abertos do aparato. C) Número de avaliações de risco feitas pelos animais. D) Total de entradas nos braços fechados do aparato. Valores demonstrados como média + erro padrão da média ( $n = 7-8$  camundongos/grupo). \* $P < 0,05$  em comparação com camundongos C57Bl/6 (teste t de *student* não pareado).

Os efeitos da deleção gênica do receptor de LDL em resposta a um estímulo aversivo condicionado estão apresentados na Figura 18. As análises estatísticas não mostraram efeitos significativos entre os grupos acerca dos níveis de congelamento (*freezing*) basais. Por outro lado, na sessão de teste, os camundongos rLDL<sup>-/-</sup> apresentaram menos tempo de congelamento do que os animais do tipo selvagem ( $t = 3,71$ ,  $df = 15$ ,  $P = 0,005$ ).

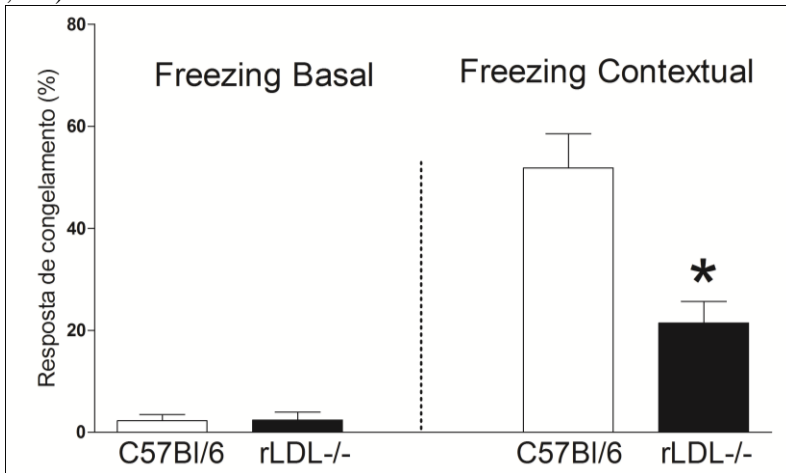


Figura 18. Avaliação dos efeitos da deleção gênica do receptor de LDL na formação de uma memória aversiva contextual em camundongos. Os valores estão representados com média + erro padrão da média ( $n = 8-9$  camundongos/grupo). \* $P < 0,05$  em comparação com camundongos C56Bl/6 na sessão de teste (teste t de *student* não pareado).

**Experimento 5:** Avaliação dos efeitos da administração de donepezil, inibidor da enzima acetilcolinesterase, durante a fase de consolidação de uma memória aversiva contextual camundongos fêmeas rLDL<sup>(-/-)</sup>.

Posteriormente, foram avaliados, em camundongos fêmeas C57Bl/6 do tipo selvagem e nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>), os efeitos da administração pós-condicionamento (i.e., na janela de consolidação da memória aversiva contextual) do fármaco donepezil (3 mg/kg; i.p.). Como esperado, a análise estatística não mostrou efeito significativo entre os grupos acerca dos níveis basais de congelamento (Figura 19). Por outro lado, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo



do genótipo [ $F(1,29)=7,17$ ;  $p<0,05$ ], tratamento [ $F(1,28)=7,11$ ;  $p<0,05$ ] e da interação entre genótipo e tratamento [ $F(1,29)=8,59$ ;  $p<0,01$ ] na porcentagem de respostas de congelamento. Comparações *post-hoc* subsequentes indicaram que o grupo de animais rLDL<sup>-/-</sup> que receberam o tratamento com o fármaco donepezil apresentaram um aumento na porcentagem de resposta de congelamento em comparação com camundongos rLDL<sup>-/-</sup> controle ( $P \leq 0.005$ ).

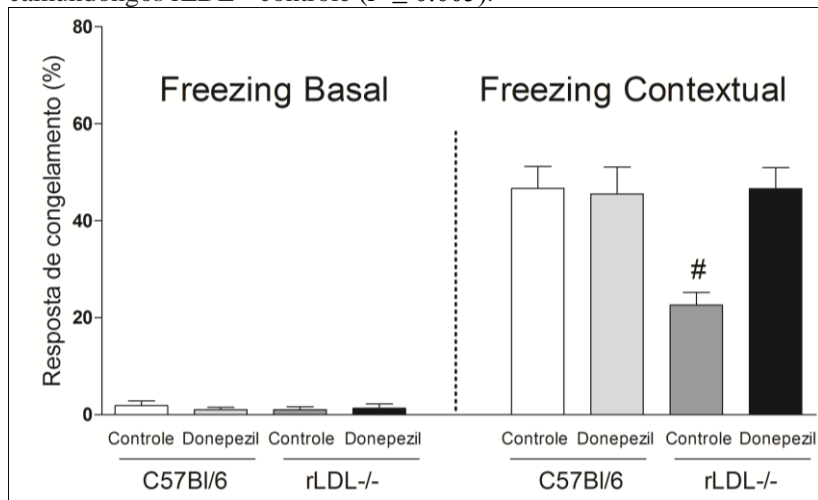


Figura 19. Avaliação do efeito da administração aguda de donepezil durante a consolidação da memória aversiva contextual em camundongos fêmeas C57Bl/6 do tipo selvagem e nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>). Imediatamente após o treino do teste de condicionamento aversivo ao contexto, metade dos animais de cada grupo recebeu veículo ou donepezil (3 mg/kg; i.p.). 48 horas após foram submetidas à sessão de teste do condicionamento aversivo ao contexto. Os valores estão representados com média + erro padrão da média (n = 8-9 camundongos/grupo). #P < 0,05 comparado com camundongos rLDL<sup>-/-</sup> na sessão de teste (Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

## DISCUSSÃO

Evidências epidemiológicas e clínicas acumuladas ao longo das duas últimas décadas apontam para uma correlação positiva entre a hipercolesterolemia e a doença de Alzheimer esporádica (Sparks et al., 1990; Sparks et al., 1994; Kuo et al., 1998; Solomon et al., 2009). Neste sentido, os efeitos da hipercolesterolemia no comportamento e cognição em modelos animais, especialmente roedores, vêm sendo intensamente investigados desde a década passada (Schreurs, 2010). Em particular, a manipulação dos níveis de colesterol em roedores tem jogado luz à relação entre colesterol e cognição. Por exemplo, a hipercolesterolemia tem sido associada com prejuízos de aprendizagem e memória em diversos paradigmas comportamentais, incluindo os labirintos aquático e radial (Thirumangalakudi et al., 2008; Ullrich et al., 2010), medo condicionado ao contexto (Hwang et al., 2010), esquiva passiva e ativa (Ghodke et al., 2012; Lee et al., 2016), reconhecimento e realocação de objetos (Moreira et al., 2014; Knight et al., 2014) e alternância espontânea (Knight et al., 2014). Ademais, o camundongo nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>), uma ferramenta experimental ao estudo da hipercolesterolemia familiar humana, apresenta prejuízos de memória operacional (Mulder et al., 2004; de Oliveira et al., 2014) e de formação de memórias aversivas (Moreira et al., 2012) e não aversivas (Mulder et al., 2004; Thirumangalakudi et al., 2008) de longa duração. Neste sentido, os estudos acerca dos mecanismos neuroquímicos pelos quais a hipercolesterolemia poderia levar aos prejuízos de aprendizagem e memória em roedores têm se focado em disfunção vascular (Ramírez et al., 2011; de Oliveira et al., 2014), neuroinflamação (Thirumangalakudi et al., 2008), estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (de Oliveira et al., 2011; Sharma et al., 2015), metabolismo da proteína precursora amiloide (Vestergaard et al., 2010) e perda da integridade dendrítica (Granhölm et al., 2008) como possíveis eventos subjacentes.

Ressalta-se, contudo, que foram poucos os trabalhos que utilizaram exposições a dietas enriquecidas em colesterol ou gorduras por curtos períodos de tempo. Em geral, a grande parte dos mesmos emprega períodos superiores a dois meses de exposições às dietas, principalmente em decorrência da eficiência do metabolismo lipídico em roedores<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Os roedores apresentam uma grande capacidade em suprimir a síntese de colesterol, bem como para intensificar a síntese de ácidos biliares, após o consumo de colesterol (Beynen, 1988). Ainda, em virtude deste sistema

(Beynen, 1988). No presente trabalho, tanto camundongos fêmeas jovens, quanto camundongos fêmeas idosas, apresentaram hipercolesterolemia induzida por uma dieta enriquecida com 1,5% de colesterol por apenas quatro semanas. Ressalta-se que o incremento nos níveis de colesterol plasmático foi maior nas fêmeas idosas, provavelmente devido às condições metabólicas mais debilitadas pelo envelhecimento (Houtkooper et al., 2011). Por outro lado, não foram observadas alterações significativas na massa dos animais ao longo do período experimental. Em geral, dietas hipercolesterolêmicas, pouco enriquecidas em gorduras totais, não acarretam em alterações significativas no peso dos animais quando oferecidas após o período de desenvolvimento pós-natal, em decorrência da eficiência do metabolismo lipídico de camundongos (Lutz e Woods, 2007).

No presente estudo, à avaliação de um estímulo aversivo incondicionado foi utilizado o teste do labirinto em cruz elevado, um paradigma experimental amplamente empregado ao estudo dos comportamentos relacionados à “ansiedade” em camundongos, sob uma perspectiva psicobiológica (Lister, 1987). Este paradigma baseia-se em duas tendências comportamentais inatas dos roedores ao serem expostos ao aparato: i) a tendência exploratória em novos ambientes e estímulos e ii) a tendência em responder defensivamente ao serem expostos à lugares abertos e altos (i.e., considerados de risco). Sendo assim, observa-se uma situação de conflito, a qual dependerá da avaliação de risco. A avaliação de risco pode ser considerada como componente central da ansiedade, mesmo sob uma perspectiva comportamental (Blanchard et al., 2001). Estudos no campo da psicofarmacologia mostram que drogas com efeito ansiolítico em humanos, como os benzodiazepínicos (e.g., diazepam), são capazes de aumentar o tempo de permanência e as entradas nos braços abertos do labirinto, quando administrados de forma aguda em camundongos. Por outro lado, drogas com efeitos ansiogênicos, como agonistas inversos dos receptores de benzodiazepínicos, como o FG 7142, parecem induzir um maior tempo de permanência nos braços fechados do aparato (Pellow e File, 1986).

Assim, os resultados obtidos no presente estudo sugerem um efeito do tipo ansiolítico ocasionado pela dieta enriquecida com colesterol em camundongos fêmeas jovens e idosas, uma vez que ambos os grupos

---

metabólito bastante eficiente no que tange a mobilização e o metabolismo do colesterol, os roedores tendem a responder brandamente a dietas hipercolesterolêmicas, desenvolvendo hipercolesterolemia leve e apenas estrias gordurosas no arco aórtico (Paigen et al., 1990).

apresentaram um significativo aumento no tempo de permanência nos braços abertos do aparato. Tal observação evidencia que o comportamento exploratório nestes animais foi preponderante frente à inibição comportamental induzida pela área de risco, i.e., braços abertos do labirinto. As fêmeas idosas expostas à dieta enriquecida com colesterol, além do exposto, também apresentaram um aumento significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparadas ao grupo de fêmeas idosas que recebeu dieta controle. Em conjunto, estes dados sugerem que os efeitos comportamentais da dieta enriquecida com colesterol, frente a estímulos aversivos incondicionados, são mais intensos nos camundongos idosos em relação aos camundongos jovens. Contudo, estas medidas de “ansiedade” observadas no labirinto em cruz elevado não podem ser adequadamente dissociadas de simples mudanças na atividade locomotora (i.e., a hiperatividade apresentada pelos camundongos tratados com dieta enriquecida com colesterol, o que foi evidenciado pelo aumento no número de entradas nos braços fechados do aparato), as quais podem confundir a interpretação dos dados. Digno de nota, a hipercolesterolemia parece aumentar a locomoção espontânea de camundongos no teste do campo aberto, sem evidências de mudanças nos parâmetros relacionados à ansiedade nos testes do campo aberto e caixa claro e escuro (Elder et al., 2008). Assim, é difícil determinar o quanto mudanças na exploração dos braços abertos refletem uma modulação da “ansiedade” ou outra consequência comportamental não específica, como hiperatividade ou aumento na motivação à exploração, induzidos pela hipercolesterolemia. Uma maneira de dissociar a atividade locomotora da ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado é a incorporação de etogramas comportamentais com elementos como avaliação de risco, um índice sensível de ansiedade (Weiss et al., 1998). Neste sentido, as análises estatísticas, ANOVA, observaram apenas um efeito do fator idade (i.e., envelhecimento) acerca do número de avaliações de risco no aparato. De fato, diversas linhas de evidência têm demonstrado mudanças dependentes da idade no comportamento emocional de roedores (Lamberty e Gower, 1993; Boguszewski e Zagrodzka, 2002).

Ademais, ressalta-se que este não foi o primeiro trabalho que avaliou efeitos de uma dieta enriquecida com colesterol em roedores na exploração do labirinto em cruz elevado. Por exemplo, já foram demonstrados efeitos ambíguos de tais dietas em ratos de diferentes idades. Xu Hu e colaboradores demonstraram que ratos jovens (três semanas de idade) alimentados com dieta enriquecida com colesterol

(2%) por oito semanas apresentaram maior tempo de permanência nos braços abertos, enquanto ratos mais idosos (vinte semanas de idade) apresentaram um perfil típico de efeitos ansiogênicos, inibindo o comportamento de exploração dos braços abertos do aparato. Interessante notar que, embora os animais idosos tenham apresentado perfil diferente dos observados no presente trabalho (o que poderia ser explicado pela variação da espécie, sexo e dieta), a dieta enriquecida com colesterol também ocasionou alterações dependentes da idade, reforçando uma possível interação sinérgica entre o tempo de vida dos animais e o impacto dos efeitos da dieta enriquecida com colesterol (Hu et al., 2014). Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa corroboram os achados do presente estudo e reforçam o efeito ansiolítico da dieta enriquecida com colesterol em camundongos. Em tese de doutorado conduzida por Gianni Mancini, foi observado um aumento na porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado em camundongos triplos transgênicos 3xTg-DA de três meses de idade, modelo experimental para a doença de Alzheimer, e em camundongos controle C56Bl/6x129SV, ambos tratados com dieta enriquecida com colesterol (1,25% por oito semanas) (Mancini, 2017). Por outro lado, em outro estudo de nosso grupo de pesquisa, foi observado que camundongos *Swiss* expostos à dieta enriquecida com colesterol (1,25 % de colesterol por oito semanas) apresentaram prejuízo de memória espacial de referência (teste de realocação de objeto), sem alterações no padrão de exploração no labirinto em cruz elevado (Moreira et al., 2014).

O presente estudo também joga novas evidências à etiologia da disfunção cognitiva induzida pela hipercolesterolemia. Inicialmente, ao demonstrar novos achados que a dieta enriquecida com colesterol induz declínio cognitivo, dependente da idade, no teste de condicionamento aversivo ao contexto. Enquanto os camundongos jovens alimentados com a dieta hipercolesterolêmica apresentaram resposta de congelamento similar aos do grupo controle, os camundongos idosos apresentaram uma resposta de congelamento significativamente menor. Especificamente, o condicionamento ao contexto representa uma associação entre um estímulo incondicionado e diversas pistas de múltiplas modalidades sensoriais, as quais requerem integração hipocampal em um mapa cognitivo representativo do ambiente (Pamplona et al., 2006). Neste sentido, o sistema de neurotransmissão colinérgico parece ser particularmente vulnerável aos efeitos da hipercolesterolemia. Inicialmente, Ullrich e colaboradores (2010) mostraram que a hipercolesterolemia diminuiu de modo significativo o

número de neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert e os níveis corticais de acetilcolina em ratos. Ehrlich e colaboradores (2012) corroboraram este achado ao também demonstrar que a exposição crônica a uma dieta enriquecida com 5% de colesterol reduziu de modo significativo o número de neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert. Ademais, os níveis de colesterol plasmático parecem se correlacionar positivamente com a atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral. Especificamente, diversas linhas de evidência demonstraram que a hipercolesterolemia aumenta de modo significativo a atividade desta enzima em áreas cerebrais relacionadas a processos cognitivos, como o córtex pré-frontal e o hipocampo (Liu et al., 2007; Ghodke et al., 2012; Moreira et al., 2012; Moreira et al., 2013; Husain et al., 2017). Também é importante mencionar que a atividade da acetilcolinesterase aumentou de modo significativo, e concentração-dependente, após a exposição de células SH-SY5Y à LDL isolada (Moreira et al., 2014).

A inervação colinérgica à formação hipocampal e córtex cerebral, a qual se origina principalmente do complexo prosencefálico basal (Lacalle et al., 1994), apresenta papéis preponderantes na modulação de diversas funções centrais, como consciência, cognição, controle motor e processamento sensorial (Hasselmo, 2006; Scarr, 2011). Por exemplo, diversas evidências farmacológicas mostraram prejuízos de memória operacional, especial e episódica após o tratamento com agentes anticolinérgicos, como a escopolamina<sup>4</sup> (Klinkenberg e Blorland, 2010). Por outro lado, o aumento das funções colinérgicas (e.g., uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase) normalmente potencializam os processos de aprendizagem e memória (Lindner et al., 2006). Ademais, a degeneração de neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal é uma

---

<sup>4</sup> A escopolamina é um agente hipocolinérgico com efeitos amnésicos na formação da memória aversiva contextual em camundongos. Quando administrada em fases importantes da formação da memória, como a aquisição e a consolidação, acarreta em prejuízo na formação do traço mnemônico (Wallenstein e Vago, 2001). Tal efeito deve-se a interferência provocada pelo fármaco na disponibilidade de receptores muscarínicos colinérgicos, i.e., antagonista dos receptores. Os receptores muscarínicos, como o M1 e o M2, estão envolvidos nos processos de plasticidade sináptica adjacentes aos processos de formação da memória aversiva (Wilson e Fadel, 2016).

característica proeminente da doença de Alzheimer, a qual tem sido relacionada com o declínio cognitivo (Terry e Buccafusco, 2003). Assim, levando em consideração que (i) o aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex pré-frontal e hipocampo parece ser um evento inicial associado com os prejuízos cognitivos induzidos pela hipercolesterolemia em camundongos (Moreira et al., 2014) e (ii) que a hipercolesterolemia reduziu o número de neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert e os níveis corticais de acetilcolina (Ullrich et al., 2010), poder-se-ia assumir que a hipercolesterolemia potencialmente afeta o sistema colinérgico. É digno de nota que os neurônios colinérgicos da prosencéfalo basal parecem passar por moderadas mudanças degenerativas com o envelhecimento, resultando em hipofunção colinérgica, que tem sido relacionada com os déficits de memória progressivos com o envelhecimento (Schliebs e Arendt, 2011). Assim, poder-se-ia supor que ambas perturbações colinérgicas (i.e., a induzida pela dieta enriquecida com colesterol e pelo envelhecimento) tenham interagido (i.e., efeitos aditivos), consequentemente induzindo um prejuízo na consolidação de uma memória aversiva contextual em camundongos idosos. Para avaliar essa hipótese, no presente estudo foi administrada uma dose não efetiva de escopolamina durante a janela de consolidação da memória.

Neste sentido, inicialmente foi padronizado uma dose não efetiva de escopolamina sobre a consolidação de uma memória aversiva contextual. Enquanto as doses de 1,5 mg/kg e 0,75 mg/kg ocasionaram uma significativa redução na resposta de congelamento quando administradas dentro da janela de consolidação da memória aversiva, a dose de 0,375 mg/kg não acarretou em alteração na resposta de congelamento. Desta forma, embora tal dose possa alterar o tônus colinérgico na fenda sináptica, ao competir pelos sítios dos receptores muscarínicos com a acetilcolina, quando administrada em nosso protocolo experimental esta dose não foi suficiente para acarretar em prejuízos de aprendizagem e memória de camundongos fêmeas jovens. Por outro lado, de modo notório, foram observadas interações aditivas, uma vez que esse protocolo de administração de escopolamina significativamente prejudicou a formação da memória em camundongos jovens expostos à dieta enriquecida com colesterol. Assim, de modo conjunto, poder-se-ia concluir que a dieta enriquecida com colesterol causa uma perturbação colinérgica leve, a qual foi suficiente para prejudicar a consolidação da memória em camundongos idosos.

Recentemente, um estudo de Zambón e colaboradores (2010) mostrou que pacientes com hipercolesterolemia familiar de meia-idade

apresentam um alto índice de comprometimento cognitivo leve (CCL), um estágio de desempenho cognitivo anormal e que precede a doença de Alzheimer (Mariani et al., 2007). Em concordância com este achado, diversos estudos mostraram que o camundongo nocaute para o receptor de LDL – um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana amplamente utilizado – apresenta prejuízos de aprendizagem e memória em diversos paradigmas comportamentais (Mulder et al., 2004; de Oliveira et al., 2011; Moreira et al., 2012; Moreira et al., 2013; de Oliveira et al., 2014). Especificamente, nosso grupo de pesquisa previamente demonstrou que os camundongos rLDL<sup>-/-</sup> são mais susceptíveis a alterações dependentes da idade na retenção de uma memória de longa duração na esQUIVA passiva do tipo *step-down*, evento comportamental acompanhado de um aumento significativo na atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex pré-frontal (Moreira et al., 2012). No presente estudo, camundongos fêmeas rLDL<sup>-/-</sup> foram submetidas ao paradigma do labirinto em cruz elevado e do condicionamento aversivo ao contexto. Especificamente, foi observado que os animais rLDL<sup>-/-</sup> permaneceram um tempo significativamente maior nos braços abertos do aparato em comparação com os camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem, embora nenhuma alteração no número de avaliações de risco tenha sido observada. Além disso, foi observado um prejuízo significativo na formação da memória aversiva nos camundongos rLDL<sup>-/-</sup> adultos. Como mencionado anteriormente, nosso grupo de pesquisa mostrou um aumento significativo na atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos rLDL<sup>-/-</sup> (Moreira et al., 2012; de Oliveira et al., 2014) e de camundongos *Swiss* (Moreira et al., 2013). A elevação dos níveis de acetilcolina por meio da inibição da enzima responsável por sua metabolização é uma estratégia interessante para mitigar os prejuízos cognitivos. De fato, os inibidores da acetilcolinesterase têm sido amplamente usados ao tratamento da doença de Alzheimer, sendo a estratégia de tratamento sintomática mais indicada para esta condição neurodegenerativa (Birks, 2006). Assim, os efeitos do fármaco donepezil, inibidor da acetilcolinesterase, durante a janela de consolidação da memória aversiva, foram avaliados no presente estudo. De modo notório, a administração de donepezil, imediatamente após o treino no condicionamento aversivo ao contexto, mitigou os prejuízos cognitivos apresentados pelos camundongos rLDL<sup>-/-</sup>. Neste sentido, Mitsushima e colaboradores (2013) mostraram que a ativação de receptores muscarínicos participa no aprendizado do medo contextual por meio do fortalecimento de sinapses excitatórias nas células



piramidais do hipocampo, através da incorporação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA.

Como conclusão, os presentes achados indicam que um período curto de exposição a uma dieta enriquecida com colesterol afeta o comportamento exploratório e a formação de uma memória aversiva contextual de modo diferente camundongos fêmeas jovens e idosas. Ademais, os resultados indicam que ambos os modelos de hipercolesterolemia, induzidos por alterações na dieta ou genótipo, prejudicam a aquisição de uma memória aversiva dependente do hipocampo em camundongos. Até onde o presente estudo conseguiu determinar, os prejuízos de aprendizagem e memória observados são susceptíveis a intervenções farmacológicas ao sistema colinérgico, reforçando a ideia de que a disfunção deste sistema de neurotransmissão seja um evento causal relacionado aos prejuízos cognitivos induzidos pela hipercolesterolemia (Ullrich et al., 2010; Moreira et al., 2013; Lopes et al., 2015). Como a hipercolesterolemia pode afetar tal sistema de neurotransmissão constitui-se um campo de pesquisa que merece especial atenção, uma vez que colesterol não transpassa a barreira hemato-encefálica (Dietschy e Turley, 2001). Neste sentido, oxisteróis, derivados oxigenados do colesterol, são capazes de transpassar membranas lipofílicas (Björkhem et al., 2002). Especificamente, o 27-hidroxicolesterol é capaz de transpassar a barreira hemato-encefálica (Heverin et al., 2005), e, devido à direta correlação entre os níveis de colesterol e de 27-hidroxicolesterol na circulação sanguínea (Babiker et al., 2005), é provável que o aumento nos níveis de colesterol plasmático resulte em um aumento na captação cerebral de 27-hidroxicolesterol (Shafaati et al., 2011).

Merece ser destacado que foram observados níveis elevados de 27-hidroxicolesterol no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (Björkhem et al., 2006). Assim, a avaliação dos efeitos da administração, aguda e crônica, por meio da via intravenosa ou intrahipocampal, deste metabólito oxigenado do colesterol sobre a formação de uma memória aversiva contextual, pode jogar luz aos mecanismos bioquímicos que relacionam a hipercolesterolemia com os prejuízos cognitivos. Ressalta-se que, nos neurônios, o colesterol é associado com domínios da membrana (*lipid rafts*) responsáveis por modular a atividade de proteínas membranares (Mason et al., 2003). Desta forma, tem sido demonstrado que alterações no conteúdo do colesterol na membrana lipídica podem modular a atividade de enzimas (Howland et al., 1998). Uma possibilidade, então, seria uma modulação

na atividade da acetilcolinesterase ocasionada por mudanças no conteúdo de colesterol na membrana plasmática.

## CONCLUSÕES

- A exposição a uma dieta enriquecida com colesterol (1,5%) por curto período de tempo (quatro semanas) aumentou a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, tanto em camundongos jovens quanto idosos;
- A dieta enriquecida em colesterol especificamente prejudicou a formação da memória aversiva contextual em camundongos idosos;
- Uma dose não efetiva de escopolamina prejudicou a consolidação da memória aversiva contextual em camundongos jovens expostos à dieta enriquecida com colesterol;
- Camundongos nocaute para o receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>), modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana, apresentaram um tempo de exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado significativamente maior que camundongos do tipo selvagem;
- Camundongos rLDL<sup>-/-</sup> apresentaram um prejuízo na formação da memória aversiva contextual;
- Uma única administração do fármaco donepezil, inibidor da enzima acetilcolinesterase, na janela de consolidação da memória, foi capaz de mitigar o prejuízo de formação da memória aversiva contextual em camundongos rLDL<sup>-/-</sup>.

De modo conjunto, os achados do presente estudo sugerem que elevados níveis de colesterol plasmático, induzidos pela administração de dieta enriquecida com colesterol ou do genótipo, produzem um prejuízo na formação de uma memória aversiva contextual, evento que parece envolver o sistema de transmissão colinérgico.



## REFERÊNCIAS

ALONSO, A. et al. Cardiovascular risk factors and dementia mortality: 40 years of follow-up in the Seven Countries Study. **J Neurol Sci**, v. 280, n. 1-2, p. 79-83, May 2009.

ARIZA, M. et al. Neuropsychological performance of young familial hypercholesterolemia patients. **Eur J Intern Med**, v. 34, p. e29-e31, Oct 2016.

AUPPERLE, R. L.; PAULUS, M. P. Neural systems underlying approach and avoidance in anxiety disorders. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 12, n. 4, p. 517-31, 2010.

BIRKS, J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD005593, Jan 2006.

BJÖRKHEM, I. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. **J Intern Med**, v. 260, n. 6, p. 493-508, Dec 2006.

BJÖRKHEM, I.; MEANEY, S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 5, p. 806-15, May 2004.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 3, p. 205-18, May 2001.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **J Comp Physiol Psychol**, v. 68, n. 1, p. 129-35, May 1969.

BOGUSZEWSKI, P.; ZAGRODZKA, J. Emotional changes related to age in rats--a behavioral analysis. **Behav Brain Res**, v. 133, n. 2, p. 323-32, Jul 2002.

BROWN, M. S.; HO, Y. K.; GOLDSTEIN, J. L. The low-density lipoprotein pathway in human fibroblasts: relation between cell surface receptor binding and endocytosis of low-density lipoprotein. **Ann N Y**

**Acad Sci**, v. 275, p. 244-57, 1976.

CASTELLI, W. P. Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. **Am J Med**, v. 76, n. 2A, p. 4-12, Feb 1984.

CASTELLI, W. P. et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. **JAMA**, v. 256, n. 20, p. 2835-8, Nov 1986.

COOPER, R. A. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. **J Supramol Struct**, v. 8, n. 4, p. 413-30, 1978.

CRISPIM JUNIOR, C. F. et al. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Comput Biol Med**, v. 42, n. 2, p. 257-64, Feb 2012.

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 1, p. 171-6, Sep 1994.

DE LA TORRE, J. C.; MUSSIVAND, T. Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease? **Neurol Res**, v. 15, n. 3, p. 146-53, Jun 1993.

DE LACALLE, S. et al. Cholinergic innervation in the human hippocampal formation including the entorhinal cortex. **J Comp Neurol**, v. 345, n. 3, p. 321-44, Jul 1994.

DE OLIVEIRA, J. et al. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience**, v. 197, p. 99-106, Dec 2011.

DIAMOND, D. M. et al. The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashbulb and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. **Neural Plast**, v. 2007, p. 60803, 2007.

DOOLEY, M.; LAMB, H. M. Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease. **Drugs Aging**, v. 16, n. 3, p. 199-226, Mar 2000.

EHRLICH, D.; PIRCHL, M.; HUMPEL, C. Effects of long-term moderate ethanol and cholesterol on cognition, cholinergic neurons, inflammation, and vascular impairment in rats. **Neuroscience**, v. 205, p. 154-66, Mar 2012.

ELDER, G. A. et al. Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **Behav Brain Res**, v. 191, n. 2, p. 256-65, Aug 2008.

GETZ, G. S.; REARDON, C. A. ApoE knockout and knockin mice: the history of their contribution to the understanding of atherogenesis. **J Lipid Res**, v. 57, n. 5, p. 758-66, May 2016.

GHODKE, R. M.; TOUR, N.; DEVI, K. Effects of statins and cholesterol on memory functions in mice. **Metab Brain Dis**, v. 27, n. 4, p. 443-51, Dec 2012.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, n. 6257, p. 425-30, Feb 1990.

GRANHOLM, A. C. et al. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. **J Alzheimers Dis**, v. 14, n. 2, p. 133-45, Jun 2008.

HASSELMO, M. E. The role of acetylcholine in learning and memory. **Curr Opin Neurobiol**, v. 16, n. 6, p. 710-5, Dec 2006.

HERING, H.; LIN, C. C.; SHENG, M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. **J Neurosci**, v. 23, n. 8, p. 3262-71, Apr 2003.

HEVERIN, M. et al. 27-hydroxycholesterol mediates negative effects of dietary cholesterol on cognition in mice. **Behav Brain Res**, v. 278, p. 356-9, Feb 2015.

HOUTKOOOPER, R. H. et al. The metabolic footprint of aging in mice. **Sci Rep**, v. 1, p. 134, 2011.

HU, X. et al. Age-dependent effect of high cholesterol diets on anxiety-

like behavior in elevated plus maze test in rats. **Behav Brain Funct**, v. 10, p. 30, Sep 2014.

HUSAIN, I. et al. Rosuvastatin ameliorates cognitive impairment in rats fed with high-salt and cholesterol diet via inhibiting acetylcholinesterase activity and amyloid beta peptide aggregation. **Hum Exp Toxicol**, p. 960327117705431, Jan 2017.

HWANG, L. L. et al. Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 3, p. 463-9, Mar 2010.

ISHIBASHI, S. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J Clin Invest**, v. 92, n. 2, p. 883-93, Aug 1993.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. **Physiol Rev**, v. 96, n. 2, p. 695-750, Apr 2016.

KHORRAMI, A. et al. Investigation of the memory impairment in rats fed with oxidized-cholesterol-rich diet employing passive avoidance test. **Drug Res (Stuttg)**, v. 65, n. 5, p. 231-7, May 2015.

KIVIPELTO, M. et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. **BMJ**, v. 322, n. 7300, p. 1447-51, Jun 2001.

KLINKENBERG, I.; BLOKLAND, A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 34, n. 8, p. 1307-50, Jul 2010.

KLOP, B.; ELTE, J. W.; CABEZAS, M. C. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1218-40, Apr 2013.

KNIGHT, E. M. et al. High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. **Neurobiol Aging**, v. 35, n. 8, p. 1821-32, Aug 2014.



LAMBERTY, Y.; GOWER, A. J. Spatial processing and emotionality in aged NMRI mice: a multivariate analysis. **Physiol Behav**, v. 54, n. 2, p. 339-43, Aug 1993.

LEDOUX, J. E.; ROMANSKI, L.; XAGORARIS, A. Indelibility of subcortical emotional memories. **J Cogn Neurosci**, v. 1, n. 3, p. 238-43, 1989.

LEE, J. M. et al. Comparison of the behavioral effects of exercise and high fat diet on cognitive function in adolescent rats. **J Exerc Rehabil**, v. 12, n. 6, p. 520-525, Dec 2016.

LEE, Y. T. et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. **Lipids Health Dis**, v. 16, n. 1, p. 12, Jan 2017.

LINDNER, M. D. et al. Donepezil primarily attenuates scopolamine-induced deficits in psychomotor function, with moderate effects on simple conditioning and attention, and small effects on working memory and spatial mapping. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 188, n. 4, p. 629-40, Nov 2006.

LINDQVIST, A. et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. **Eur J Neurol**, v. 13, n. 12, p. 1385-8, Dec 2006.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987.

LIU, Y. Q. et al. Memory performance of hypercholesterolemic mice in response to treatment with soy isoflavones. **Neurosci Res**, v. 57, n. 4, p. 544-9, Apr 2007.

LOPES, J. B. et al. Efficacy of Donepezil for Cognitive Impairments in Familial Hypercholesterolemia: Preclinical Proof of Concept. **CNS Neurosci Ther**, v. 21, n. 12, p. 964-6, Dec 2015.

LORBEEK, G. et al. Sex differences in the hepatic cholesterol sensing mechanisms in mice. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 11067-85, Sep 2013.

LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of animal models of obesity. **Curr Protoc Pharmacol**, v. Chapter 5, p. Unit5.61, Sep 2012.

MAIR, R. G.; ONOS, K. D.; HEMBROOK, J. R. Cognitive activation by central thalamic stimulation: the yerkes-dodson law revisited. **Dose Response**, v. 9, n. 3, p. 313-31, 2011.

MARIANI, E.; MONASTERO, R.; MECOCCI, P. Mild cognitive impairment: a systematic review. **J Alzheimers Dis**, v. 12, n. 1, p. 23-35, Aug 2007.

MINATTI, J. et al. Green tea extract reverses endothelial dysfunction and reduces atherosclerosis progression in homozygous knockout low-density lipoprotein receptor mice. **Nutr Res**, v. 32, n. 9, p. 684-93, Sep 2012.

MITCHELL, A. J. et al. Guideline concordant monitoring of metabolic risk in people treated with antipsychotic medication: systematic review and meta-analysis of screening practices. **Psychol Med**, v. 42, n. 1, p. 125-47, Jan 2012.

MITCHELL, N. S. et al. Obesity: overview of an epidemic. **Psychiatr Clin North Am**, v. 34, n. 4, p. 717-32, Dec 2011. ISSN 1558-3147.

MITSUSHIMA, D.; SANO, A.; TAKAHASHI, T. A cholinergic trigger drives learning-induced plasticity at hippocampal synapses. **Nat Commun**, v. 4, p. 2760, 2013.

MOREIRA, E. L. et al. Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia. **Neurosci Lett**, v. 541, p. 193-8, Apr 2013.

Kivipelto, M et al. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? **J Neural Transm (Vienna)**, v. 121, n. 4, p. 415-26, Apr 2014.

Moreira, E et al. Age-related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr<sup>-/-</sup>): evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **J Alzheimers Dis**, v. 32, n. 2, p. 495-511, 2012.

MULDER, M. et al. Low-density lipoprotein receptor-knockout mice

display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. **Neurobiol Dis**, v. 16, n. 1, p. 212-9, Jun 2004.

MULDER, M. et al. LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. **Neurosci Res**, v. 59, n. 3, p. 251-6, Nov 2007.

NELSON, R. H. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. **Prim Care**, v. 40, n. 1, p. 195-211, Mar 2013.

NES, W. D. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. **Chem Rev**, v. 111, n. 10, p. 6423-51, Oct 2011.

PAMPLONA, F. A. et al. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 188, n. 4, p. 641-9, Nov 2006.

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocr Rev**, v. 25, n. 6, p. 947-70, Dec 2004.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 24, n. 3, p. 525-9, Mar 1986.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav Neurosci**, v. 106, n. 2, p. 274-85, Apr 1992.

POLESZAK, E. et al. Involvement of NMDA receptor complex in the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide in mice. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 118, n. 6, p. 857-64, Jun 2011.

RAMÍREZ, C. et al. ApoB100/LDLR<sup>-/-</sup> hypercholesterolaemic mice as a model for mild cognitive impairment and neuronal damage. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22712, 2011.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 6, p. 801-10, Nov 1997. ISSN

0149-7634.

RUDY, J. W.; HUFF, N. C.; MATUS-AMAT, P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 7, p. 675-85, Nov 2004.

RUSSELL, D. W. et al. Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. **Annu Rev Biochem**, v. 78, p. 1017-40, 2009a.

SCARR, E. Muscarinic receptors: their roles in disorders of the central nervous system and potential as therapeutic targets. **CNS Neurosci Ther**, v. 18, n. 5, p. 369-79, May 2012.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2, p. 555-63, Aug 2011.

SCHMECHEL, D. E. et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 20, p. 9649-53, Oct 1993.

SCHREURS, B. G. The effects of cholesterol on learning and memory. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 34, n. 8, p. 1366-79, Jul 2010.

SEGATTO, M. et al. Analysis of the protein network of cholesterol homeostasis in different brain regions: an age and sex dependent perspective. **J Cell Physiol**, v. 228, n. 7, p. 1561-7, Jul 2013.

SOBESKY, J. L. et al. High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1 $\beta$ , an effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism. **Brain Behav Immun**, v. 42, p. 22-32, Nov 2014.

SOLOMON, A. et al. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 28, n. 1, p. 75-80, 2009.

STREKALOVA, T. et al. Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. **Brain Behav Immun**, v. 48, p. 42-7, Aug 2015.

SUÁREZ BAGNASCO, M. Psychological issues and cognitive impairment in adults with familial hypercholesterolemia. **Fam Pract**, v. 34, n. 5, p. 520-524, Sep 2017.

TERRY, A. V.; BUCCAFUSCO, J. J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 306, n. 3, p. 821-7, Sep 2003.

THELEN, K. M. et al. Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 316, n. 3, p. 1146-52, Mar 2006.

THIRUMANGALAKUDI, L. et al. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **J Neurochem**, v. 106, n. 1, p. 475-85, Jul 2008.

ULLRICH, C.; PIRCHL, M.; HUMPEL, C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. **Mol Cell Neurosci**, v. 45, n. 4, p. 408-17, Dec 2010.

VAN DER WULP, M. Y.; VERKADE, H. J.; GROEN, A. K. Regulation of cholesterol homeostasis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 368, n. 1-2, p. 1-16, Apr 2013.

VAN VLIET, P. Cholesterol and late-life cognitive decline. **J Alzheimers Dis**, v. 30 Suppl 2, p. S147-62, 2012.

VAN VLIET, P. et al. The influence of age on the association between cholesterol and cognitive function. **Exp Gerontol**, v. 44, n. 1-2, p. 112-22, 2009 Jan-Feb 2009.

VANCE, D. E.; VAN DEN BOSCH, H. Cholesterol in the year 2000. **Biochim Biophys Acta**, v. 1529, n. 1-3, p. 1-8, Dec 2000.

VESSELINOVITCH, D.; WISSLER, R. W.; DOULL, J. Experimental production of atherosclerosis in mice. 1. Effect of various synthetic diets and radiation on survival time, food consumption and body weight in mice. **J Atheroscler Res**, v. 8, n. 3, p. 483-95, 1968.

VESTERGAARD, M. et al. Cholesterol, lipids, amyloid Beta, and Alzheimer's. **Curr Alzheimer Res**, v. 7, n. 3, p. 262-70, May 2010.

VLAHCEVIC, Z. R.; PANDAK, W. M.; STRAVITZ, R. T. Regulation of bile acid biosynthesis. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 28, n. 1, p. 1-25, v, Mar 1999.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 322-8, 2007.

WEISS, S. M. et al. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 2, p. 265-71, 1998.

WILSON, M. A.; FADEL, J. R. Cholinergic regulation of fear learning and extinction. **J Neurosci Res**, v. 95, n. 3, p. 836-852, Mar 2017. ISSN 1097-4547.

XAVIER, H. T. et al. [V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis]. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 4 Suppl 1, p. 1-20, 10 2013.

ZAMBÓN, D. et al. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **Am J Med**, v. 123, n. 3, p. 267-74, Mar 2010.

ZHANG, M. et al. Quercetin regulates hepatic cholesterol metabolism by promoting cholesterol-to-bile acid conversion and cholesterol efflux in rats. **Nutr Res**, v. 36, n. 3, p. 271-9, Mar 2016.

