



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Gislaine Olescowicz

O impacto da hipercolesterolemia sobre os processos de memória e plasticidade sináptica em camundongos machos e fêmeas: do receptor LDL aos oxisteróis

Florianópolis

2021

Gislaine Olescowicz

O impacto da hipercolesterolemia sobre os processos de memória e plasticidade sináptica em camundongos machos e fêmeas: do receptor LDL aos oxisteróis

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel Prediger

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar
Moreira

Florianópolis

2021

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

Olescowicz, Gislaine

O impacto da hipercolesterolemia sobre os processos de memória e plasticidade sináptica em camundongos machos e fêmeas : do receptor LDL aos oxisteróis / Gislaine Olescowicz ; orientador, Rui Daniel Prediger , coorientador, Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, 2021.
117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Memória, Plasticidade hipocampal, proteínas sinápticas. 3. Diferença sexual. 4. Hipercolesterolemia Familiar, Receptor LDL, Homeostase cerebral do colesterol. 5. Oxisteróis, 27 hidroxicoesterol. I. Prediger , Rui Daniel . II. Gasnhar Moreira, Eduardo Luiz . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Gislaine Olescowicz

O impacto da hipercolesterolemia sobre os processos de memória e plasticidade sináptica em camundongos machos e fêmeas:

do receptor LDL aos oxisteróis

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Andressa Fabro de Bem, Dra
Universidade de Brasília

Prof. Mychael Vinicius Lourenco, Dr.
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Helena Iturvites Cimarosti, Dra
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Rui Daniel Prediger Dr.
Orientador

Florianópolis, 2021.

*Este trabalho é dedicado aos meus pais
Raul Olescowicz e Maria Lúcia P. Olescowicz
e à minha avó Elvira K. Prust.*

AGRADECIMENTOS

Inúmeras pessoas fizeram parte dessa caminhada, as quais sou muito grata, e gostaria de registrar aqui meu agradecimento especial:

Ao Prof. Dr. Rui Daniel Prediger por ter aberto as portas do seu laboratório e ter prontamente aceitado ser meu orientador. Agradeço-o pela confiança em mim depositada, e principalmente por ter sido um incentivador para que eu alcançasse voos mais altos e me ensinar a crescer diante dos desafios. Além disso, agradeço principalmente, por ter me permitido trabalhar com tema de meu interesse, o que tornou o caminho muito mais agradável.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eduardo Luiz G. Moreira, pelas inúmeras discussões científicas e contribuições, por proporcionar tantos aprendizados sobre o metabolismo do colesterol.

Ao doutorando Hiago de Melo, pela amizade e discussões científica e pela disposição em colaborar na técnica de eletrofisiologia e me receber no laboratório do Professor Dr. Roger Walz, ao qual também sou muito grata pela oportunidade de colaboração.

À Dr^a. Leandra Celso Constantino, pela amizade e pela disposição em me ensinar a técnica de *Western Blotting* e me receber no laboratório do Professor Dr. Rodrigo Bainy Leal, ao qual também sou muito grata.

À Professora Dr^a. Andreza Fabro de Bem, Professora Dr^a. Jade de Oliveira e Professora Dr^a. Daiane Engel gostaria de registrar minha admiração, por terem despertado em mim a paixão pelo tema hipercolesterolemia e memória quando eu ainda estava no mestrado.

Ao Dr. Angel Cedazo-Minguez, por ter confiado no meu trabalho e ter me aceitado em seu grupo de pesquisa no Instituto Karolinska. À Professora Assistente Dr^a. Sílvia Maioli, por ter me auxiliado diretamente na elaboração de protocolos e discussão de resultados e pelas oportunidades de crescimento profissional muito significativas.

Aos professores membros da banca de qualificação do doutorado: Dr. Alfeu Zanotto Filho, Dr. Daniel Fernandes e Dr. Helena Cimarosti pelas críticas, sugestões e discussões, que contribuíram dando maior consistência e qualidade ao andamento do trabalho, bem como à minha formação como pesquisadora.

Aos professores membros da banca examinadora do doutorado, Dr^a. Andreza Fabro de Bem, Dr. Daniel Fernandes, Dr^a. Helena Cimarosti, Dr^a. Jade de Oliveira e Dr. Mychael Vinicius Lourenço pela atenção dispensada na leitura da tese, discussões e sugestões importantíssimas para o aprimoramento da versão final desta tese e para a minha formação acadêmica.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFSC, pelos conhecimentos transmitidos, pelo senso crítico despertado e pelas discussões científicas, sempre agregando valor e conhecimento aos alunos.

Aos técnicos do LAMEB, Denis, Vanessa, Chirle, Emily, Laís e Demétrio pela presteza e auxílio na utilização de diversos equipamentos.

Aos meus colegas do LEXDON: Ana Elisa, Andréia, Angela, Bruna, Dayse, Fernanda, Josiel, Juliana, Katiane, Marcelo, Marina, Marissa, Naiane, Nei, Nelson, Samantha e Tuane, pela amizade, incentivo e ajuda diária.

Aos meus colegas do grupo Cedazo-Minguez e Maioli: Maria, Julen, Raúl, Luís, Makrina, Francesca, Ana, Vilma, Martha e Fokion por terem me recebido tão bem em terras nórdicas e terem facilitado minha adaptação ao laboratório.

Aos meus pais Lúcia e Raul, exemplos de honestidade, trabalho duro e doação incondicional, por todo o amor, carinho, incentivo, suporte e educação a mim dedicados desde sempre.

Ao meu irmão Dieison, pela amizade, amor e carinho, pelas conversas e risos, pela torcida e incentivo e por estar sempre presente.

A todos os colaboradores e amigos, com quem pude aprender ciência e lições de vida, pelas marcas deixadas e pela participação direta ou indireta nesta fase da minha vida, meu muito obrigado!

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro. Ao Programa CAPES/Print pela bolsa de estudos e pelo suporte durante a realização do estágio de doutorado sanduíche no Instituto Karolinska (Suécia).

*“Pode-se arrancar tudo do homem, menos uma coisa,
a última das liberdades humanas: a escolha da atitude
pessoal diante das circunstâncias que vão definir seu
próprio caminho.”*

Viktor Frankl

RESUMO

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença de ordem genética causada por anormalidades que direta ou indiretamente afetam o metabolismo da lipoproteína de baixa densidade (LDL), tendo por consequência o acúmulo da LDL no plasma desde o nascimento, o que é mais comumente causado por alterações na função do receptor de LDL (LDLr). Classicamente, essa condição está relacionada com o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares prematuras. Mais recentemente, estudos clínicos têm associado a HF ao surgimento do declínio cognitivo moderado em pacientes com menos de 50 anos de idade. Clinicamente, observa-se que os homens são mais susceptíveis aos danos cardiovasculares, enquanto que as mulheres apresentam maior incidência de demência e da doença de Alzheimer. Entretanto, este possível dimorfismo sexual tem sido ignorado nos estudos realizados em modelos animais de hipercolesterolemia investigando os mecanismos moleculares subjacentes aos prejuízos cognitivos, sendo estes conduzidos majoritariamente em animais machos. Adicionalmente, é sabido que a molécula de colesterol não é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica, logo o 27-hidroxicolesterol (27-OH), seu metabólito oxidado, tem sido implicado nos danos cerebrais causados pelo aumento do colesterol periférico. De maneira importante, homens apresentam concentrações plasmáticas mais elevadas de 27-OH, bem como maior influxo cerebral desta molécula em comparação às mulheres. Neste sentido, no presente estudo foi investigado se camundongos machos e fêmeas seriam diferentemente afetados por distúrbios do metabolismo do colesterol quanto à processos de memória e plasticidade sináptica no hipocampo, bem como explorar o envolvimento dos oxisteróis nestes parâmetros. Os resultados revelaram que camundongos machos e fêmeas nocaute para o receptor (LDLr^{-/-}), um modelo animal de HF, apresentaram prejuízos de memória espacial, enquanto que machos também apresentaram prejuízos na memória de reconhecimento e memória aversiva, quando comparados ao grupo controle selvagem. Camundongos LDLr^{-/-} fêmeas apresentaram um perfil hiperlocomotor em relação aos machos do mesmo genótipo. De maneira pioneira, foi observado que os camundongos LDLr^{-/-} de ambos os sexos apresentaram prejuízo na plasticidade sináptica funcional, indicada pela redução do potencial excitatório pós-sináptico na via colateral de Schaffer na região CA1 do hipocampo após aplicação de um protocolo de potenciação de longa duração. Esta alteração não foi acompanhada por alterações no volume hipocampal ou no imunoconteúdo de proteínas envolvidas na manutenção e estruturação sináptica (sinaptopodina, aromatase e PSD95). Entretanto, foi observada uma redução no imunoconteúdo da proteína SNAP25 no hipocampo de camundongos LDLr^{-/-} machos, além de uma astrogliose hipocampal indicada pelo aumento da imunomarcagem para GFAP em camundongos LDLr^{-/-} de ambos os sexos. Experimentos *in vitro* revelaram que a deleção parcial do receptor LDL especificamente em neurônios não alterou a regulação de genes das proteínas SNAP25, PSD95 e Arc. Camundongos LDLr^{-/-} de ambos os sexos apresentaram aumento significativo do colesterol total circulante quando comparado aos camundongos selvagens, porém, apenas as fêmeas LDLr^{-/-} apresentaram aumento significativo no metabólito oxidado do colesterol, 27-OH. Buscando investigar o possível envolvimento do 27-OH no dimorfismo sexual do impacto da hipercolesterolemia foram utilizados camundongos transgênicos CYP27A1Tg machos e fêmeas, que apresentam altos níveis circulantes de 27-OH. Camundongos CYP27A1Tg fêmeas apresentaram aumento na expressão dos genes LDLr e LRP1. Enquanto camundongos CYP27A1Tg machos

apresentaram aumento na expressão dos genes CYP7B1, SREBP1, SREBP2, LDLr e LRP1, envolvidos na homeostase do colesterol no cérebro. Estas alterações estão possivelmente associadas ao metabólito cerebral do 27-OH, o 7-HOCA, uma vez que não foram observadas em camundongos machos nocaute para a enzima CYP7B1 que apresentam redução drástica nos níveis cerebrais de 7-HOCA. Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que camundongos LDLr^{-/-} de ambos os sexos apresentam prejuízos de memórias dependentes do hipocampo que estão associados, ao menos em parte, a prejuízos na plasticidade sináptica hipocampal. Além disso, machos expostos à altos níveis de 27-OH, metabólito oxidado do colesterol, são mais susceptíveis ao desenvolvimento de alterações na homeostase cerebral do colesterol, sendo esta resposta possivelmente mediada pelo metabólito 7-HOCA. Finalmente, estes resultados encorajam a realização de estudos adicionais buscando elucidar as diferenças sexuais observadas nos distúrbios do metabolismo do colesterol.

Palavras-chave: Receptor de LDL, Hipercolesterolemia, sexo, 27-hidroxicolesterol, memória, plasticidade sináptica, homeostase cerebral do colesterol.

ABSTRACT

Familial hypercholesterolemia (FH) is a genetic disorder caused by abnormalities that directly or indirectly affect the metabolism of low-density lipoprotein (LDL), resulting in the accumulation of LDL in plasma since birth, which is most commonly caused by changes in the function of the LDL receptor (LDLr). Classically, this condition is related to the development of atherosclerosis and premature cardiovascular diseases. More recently, clinical studies have associated FH with the onset of moderate cognitive decline in patients under 50 years of age. Clinically, it is observed that men are more susceptible to cardiovascular damage, while women have a higher incidence of dementia and Alzheimer's disease. However, this possible sexual dimorphism has been ignored in studies carried out on animal models of hypercholesterolemia investigating the molecular mechanisms underlying cognitive impairments, which are mostly performed in male animals. Additionally, it is known that the cholesterol molecule is not able to cross the blood-brain barrier, thus 27-hydroxycholesterol (27-OH), its oxidized metabolite, has been implicated in brain damage caused by the increase in peripheral cholesterol. Importantly, men have higher plasma concentrations of 27-OH, as well as greater brain influx of this molecule compared to women. Therefore, in the present study it was investigated whether male and female mice would be affected differently by disorders of cholesterol metabolism focusing on the processes of memory and synaptic plasticity in the hippocampus, as well as exploring the putative involvement of oxysterols in these parameters. The results revealed that male and female LDLr knockout mice (LDLr $-/-$), an animal model of HF, displayed spatial memory impairments, while males also showed disruption in recognition and aversive memories, when compared to the wild-type control group. Female LDLr $-/-$ mice showed a hyperlocomotor profile in relation to males of the same genotype. For the first time, it was observed that LDLr $-/-$ mice of both sexes showed impairment in functional synaptic plasticity, as indicated by the reduction of post-synaptic excitatory potential in the Schaffer collateral pathway in the CA1 region of the hippocampus after application of long-term potentiation (LTP) stimuli. This change was not accompanied by alterations in the hippocampal volume or in the immunoccontent of proteins involved in synaptic maintenance and structuring (synaptopodine, aromatase and PSD95). However, a reduction in the immunoccontent of the SNAP25 protein was observed in the hippocampus of male LDLr $-/-$ mice, as well as a hippocampal astrogliosis indicated by increased immunostaining for GFAP in LDLr $-/-$ mice of both sexes. *In vitro* studies revealed that the partial deletion of the LDLr specifically in neurons did not alter the gene regulation of SNAP25, PSD95 and Arc proteins. LDLr $-/-$ mice of both sexes showed a significant increase in total circulating cholesterol when compared to wild mice, however, only LDLr $-/-$ females presented a significant increase in the oxidized cholesterol metabolite, 27-OH. In order to investigate the possible involvement of 27-OH in the sexual dimorphism of the impact of hypercholesterolemia, male and female CYP27A1Tg transgenic mice, which have high circulating levels of 27-OH, were used. Female CYP27A1Tg mice presented increased expression of the LDLr and LRP1 genes. On the other hand, male CYP27A1Tg mice showed increased expression of the CYP7B1, SREBP1, SREBP2, LDLr and LRP1 genes involved in cholesterol homeostasis in the brain. These changes are possibly associated with the brain metabolite of 27-OH, 7-HOCA, since they were not observed in male knockout mice for the enzyme CYP7B1 that show a drastic reduction in brain levels of 7-HOCA. Taken together,

the results of the present study indicate that LDLr ^{-/-} mice of both sexes have impaired hippocampal-dependent memories that are associated, at least in part, with impaired hippocampal synaptic plasticity. In addition, males exposed to high levels of 27-OH, an oxidized cholesterol metabolite, are more susceptible to the development of changes in cerebral cholesterol homeostasis, and that this response is possibly mediated by the 7-HOCA metabolite. Finally, these results encourage further studies to elucidate the sexual differences observed in disorders of cholesterol metabolism.

Keywords: LDL receptor, Hypercholesterolemia, sex, 27-hydroxycholesterol, memory, synaptic plasticity, cerebral cholesterol homeostasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura representativa da estrutura do receptor LDL.	23
Figura 2. Regulação da homeostase intracelular de colesterol mediada pelo receptor LDL.....	25
Figura 3. Representação dos níveis de colesterol encontrados nas formas homozigótica e heterozigótica da HF.....	28
Figura 4. Metabolismo do colesterol no SNC.....	32
Figura 5. Resumo gráfico das evidências científicas utilizando camundongos LDLr-/-.....	40
Figura 6. Ilustração das vias de síntese dos ácidos biliares.	42
Figura 7. Esquema representativo do protocolo comportamental 1.....	51
Figura 8. Esquema representativo do protocolo comportamental 2.....	51
Figura 9. Esquema de experimentos utilizados para avaliação do PEPS hipocampal e imunocontéudo e expressão gênica de proteínas sinápticas.....	52
Figura 10. Esquema de experimentos utilizados para avaliação da astrogliose e volume hipocampal em camundongos C57Bl6 e LDLr-/- machos e fêmeas.....	53
Figura 11. Esquema de experimentos utilizados para avaliação dos genes relacionados à homeostase cerebral em camundongos com expressão aumentada de 27-OH.	54
Figura 12. Efeitos da deleção do LDLr sobre a memória dependente do hipocampo em camundongos machos e fêmeas.	63
Figura 13. Efeitos da deleção do LDLr sobre a atividade locomotora em camundongos machos e fêmeas.....	64
Figura 14. Efeitos da deleção do LDLr sobre as memórias de reconhecimento e aversiva de longo prazo em camundongos machos e fêmeas.....	66
Figura 15. Efeitos da HF sobre a resposta excitatória pós-sináptica no hipocampo de camundongos machos e fêmeas.	67
Figura 16. Efeitos da HF sobre o imunocontéudo de proteínas sinápticas no hipocampo de camundongos machos e fêmeas.	68
Figura 17. Efeito da redução da expressão do LDLr sobre a expressão gênica de proteínas sinápticas em cultura primária de neurônios de camundongos.....	69
Figura 18. Efeitos da HF sobre a ativação astrocitária na região CA1 do hipocampo de camundongos machos e fêmeas.	70

Figura 19. Efeitos da HF sobre o volume do hipocampo de camundongos machos e fêmeas.	71
Figura 20. Concentração plasmática de colesterol total e 27-OH em camundongos machos e fêmeas LDLr-/-.	72
Figura 21. Expressão gênica da enzima CYP7B1 no cérebro de camundongos machos e fêmeas CYP27A1.....	73
Figura 22. Expressão gênica do fator de transcrição SREBP1 e SREBP2 no cérebro de camundongos machos e fêmeas CYP27A1Tg.	74
Figura 23. Expressão gênica de LXR α e LXR β no cérebro de camundongos machos e fêmeas CYP27A1.	75
Figura 24. Expressão gênica de LRP1 no cérebro em camundongos machos e fêmeas CYP27A1.....	76
Figura 25. Expressão gênica e imunocontéudo do LDLr no cérebro de camundongos machos e fêmeas CYP27A1.....	77
Figura 26. Expressão gênica do LDLr, LRP1 e CYP7B1 em cultura primária de neurônios tratados com 27-OH.	78
Figura 27. Expressão gênica do fator de transcrição SREBP1 e SREBP2 no cérebro de camundongos nocaute para a CYP7B1 machos.	79
Figura 28. Expressão gênica do fator do gene LXR α e LXR β no cérebro de camundongos nocaute para a CYP7B1 machos.	80
Figura 29. Expressão gênica do fator do gene LDLr e LRP1 no cérebro de camundongos nocaute para a CYP7B1 machos.	81
Figura 30. Resumo ilustrado simplificado dos principais achados desta tese.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos realizados com camundongos LDLr-/- que avaliaram memória. ..	36
Tabela 2. Estudos realizados com camundongos LDLr-/- que avaliaram parâmetros moleculares no SNC.	37
Tabela 3. Principais modelos animais para estudos dos oxisteróis.	43
Tabela 4- Evidências obtidas em modelos animais genético dos efeitos dos oxisteróis na memória.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

24-OH- 24- hidroxicolesterol
25-OH- 25- hidroxicolesterol
27-OH- 27- hidroxicolesterol
7-HOCA- 7 α -hidroxi-3-oxo-4-ácido colestenoico
A β – Peptídeo β - amiloide
APP- Proteína precursora amiloide
ApoB- Apolipoproteína B
ApoC- Apolipoproteína
ApoE- Apolipoproteína E
BHE- Barreira Hematoencefálica
CY27A1Tg- animais transgênicos para estero 27-hidroxiase
CYP27A1- Citocromo P450, família 27, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP46- Citocromo 46
CYP46A1 - Citocromo P450, família 46, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP7A1- Citocromo P450, família 7, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP7B1- Citocromo P450, família 7, subfamília B, polipeptídeo 1
GFAP- proteína ácida fibrilar glial
HDL- Lipoproteínas de alta densidade
HF- Hipercolesterolemia familiar
HMG-CoAR- 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
IDL- lipoproteínas de densidade intermediária
LDL- lipoproteínas de baixa densidade
LDLr- Receptor LDL
LRP1- Proteína 1 relacionada ao receptor de LDL
LXR α - receptores hepáticos ativados por X alfa
LXR β - receptores hepáticos ativados por X beta
mg/dL- Miligramas por decilitro
MYLIP- proteína de interação da cadeia leve reguladora da miosina
NPC- proteínas Niemann-Pick C
PCSK9- proteína convertase subtilisina/Kexin tipo 9
RNAm- ácido ribonucleico mensageiro

SER-1- elemento regulatório de esterol

SNC- Sistema nervoso central

SREBP- proteína de ligação a elemento regulada por esterol

VLDL- lipoproteínas de muita baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 COLESTEROL E PROTEÍNAS CARREADORAS.....	20
1.2 RECEPTOR LDL - ASPECTOS GERAIS	22
1.3 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.....	26
1.4 FUNÇÕES DO RECEPTOR LDL NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	30
1.5 HF COMO FATOR DE RISCO PARA O PREJUÍZO COGNITIVO MODERADO E DEMÊNCIA	32
1.6 MODELO ANIMAL DE HF	34
1.7 ACHADOS EM CAMUNDONGOS LDLr/- RELACIONADOS A MEMÓRIA: ESTARÍAMOS IGNORANDO AS PARTICULARIDADES SEXUAIS?	34
1.8 OXIDAÇÃO DA LDL E A PRODUÇÃO DE OXIESTERÓIS	40
1.9 MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DOS OXISTERÓIS	43
1.10 EFEITOS DOS OXIESTERÓIS NO SNC E NA MEMÓRIA: ESTARÍAMOS IGNORANDO AS DIFERENÇAS SEXUAIS?	44
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	47
3. OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GERAL	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 ANIMAIS	49
4.2 CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS CÓRTICO-HIPOCAMPAIS E SILENCIAMENTO DO LDLR.....	50
4.3 DESENHOS EXPERIMENTAIS.....	50
4.3.1 Pergunta experimental 1: Camundongos LDLr/- apresentam diferenças sexuais no desempenho de testes comportamentais de memória?	50
4.3.2 Pergunta experimental 2: A deleção do receptor LDL leva a redução da plasticidade hipocampal em camundongos machos e fêmeas?	52
4.3.3 Pergunta experimental 3: A ativação astrocitária e a atrofia hipocampal estão relacionadas com os prejuízos cognitivos observados em camundongos LDLr/- machos e fêmeas?	53
4.3.4 Pergunta experimental 4: O 27-hidroxicoesterol representa a conexão entre os altos níveis periféricos de colesterol e as alterações cerebrais e comportamentais observadas em camundongos LDLr/- machos e fêmeas?	53
4.3.5 Pergunta experimental 5: Os altos níveis circulantes de 27-hidroxicoesterol causa diferente impacto na homeostase cerebral do colesterol em camundongos machos e fêmeas?	54

4.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	54
4.4.1	Teste do campo aberto.....	55
4.4.2	Teste de realocação de objeto.....	55
4.4.3	Teste do labirinto em Y modificado.....	56
4.4.4	Teste de reconhecimento de objeto	57
4.4.5	Medo condicionado ao contexto	57
4.5	EXPERIMENTOS EX VIVO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS	58
4.5.1	Eletrofisiologia.....	58
4.5.2	Western blotting	59
4.5.3	Dosagem de colesterol total e 27-OH	60
4.5.4	PCR quantitativo	60
4.6	TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	60
4.6.1	Perfusão.....	60
4.6.2	Processamento do Tecido.....	61
4.6.3	Imunofluorescência para GFAP	61
4.6.4	Coloração hematoxilina-eosina e avaliação do volume hipocampal	61
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	62
5.	RESULTADOS.....	63
5.1	PERGUNTA EXPERIMENTAL 1: CAMUNDONGOS LDLR ^{-/-} APRESENTAM DIFERENÇAS SEXUAIS NO DESEMPENHO DE TESTES COMPORTAMENTAIS DE MEMÓRIA?.....	63
5.2	PERGUNTA EXPERIMENTAL 2: A DELEÇÃO DO RECEPTOR LDL LEVA A REDUÇÃO DA PLASTICIDADE HIPOCAMPAL EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS?.....	66
5.3	PERGUNTA EXPERIMENTAL 3: A ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA E A ATROFIA HIPOCAMPAL ESTÃO RELACIONADAS COM OS PREJUÍZOS COGNITIVOS OBSERVADOS EM CAMUNDONGOS LDLR ^{-/-} MACHOS E FÊMEAS?.....	69
5.4	PERGUNTA EXPERIMENTAL 4: O 27-HIDROXICOLESTEROL REPRESENTA A CONEXÃO ENTRE OS ALTOS NÍVEIS PERIFÉRICOS DE COLESTEROL E AS ALTERAÇÕES CEREBRAIS E COMPORTAMENTAIS OBSERVADAS EM CAMUNDONGOS LDLR ^{-/-} MACHOS E FÊMEAS?.....	71
5.5	PERGUNTA EXPERIMENTAL 5: OS ALTOS NÍVEIS CIRCULANTES DE 27-HIDROXICOLESTEROL CAUSAM DIFERENTE IMPACTO NA HOMEOSTASE CEREBRAL DO COLESTEROL EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS?....	72
6.	DISCUSSÃO.....	82
7.	SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	95
8.	CONCLUSÃO	96
9.	REFERÊNCIAS	97

1. INTRODUÇÃO

Existem diversas evidências médico-científicas relacionando os distúrbios no metabolismo do colesterol com o surgimento de problemas cardiovasculares (BALAKUMAR; MAUNG-U; JAGADEESH, 2016). Em particular, na hipercolesterolemia familiar (HF), uma condição genética caracterizada por uma alta concentração de colesterol circulante desde o nascimento, especialmente da lipoproteína de baixa densidade (LDL), observam-se complicações cardiovasculares mais aceleradas (YUAN; WANG; HEGELE, 2006). Na última década, estudos clínicos têm ampliado o conhecimento sobre a HF, mostrando que as complicações da hipercolesterolemia não se limitam ao sistema cardiovascular, mas afetam também diversas funções do sistema nervoso central (SNC), predispondo ao aparecimento de demência e ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (ZAMBÓN et al., 2010). De maneira complementar, estudos pré-clínicos têm sido focados em desvendar eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem em regiões cerebrais envolvidas no processamento de memórias e que sabidamente são afetadas na doença de Alzheimer (como o hipocampo e o córtex cerebral). Neste contexto surge uma questão interessante: como o colesterol, carregado na circulação periférica e incapaz de alcançar o cérebro, poderia afetar diretamente a função dos neurônios, astrócitos e micróglia? Pesquisas recentes têm revelado que a molécula que figura como “protagonista e mensageira” transpassando a barreira hematoencefálica (BHE) é na verdade um derivado oxidado do colesterol, o 27-hidroxicolesterol (27-OH).

Outro ponto que merece destaque é que o impacto da hipercolesterolemia sobre as funções cardiovasculares e cognitivas apresenta um padrão dual em relação ao sexo. O desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos com HF é mais comum em homens do que em mulheres (COUTINHO et al., 2021; PÉREZ GARCÍA, 2018). Por outro lado, as mulheres com HF são mais susceptíveis do que os homens a desenvolverem quadros de demência e doença de Alzheimer (BEAM et al., 2018; VIÑA; LLORET, 2010). Este dimorfismo sexual é também observado quando analisamos a molécula derivada do colesterol que comunica periferia-cérebro, sendo que os homens apresentam uma concentração periférica mais elevada de 27-OH e também apresentam maior influxo cerebral deste composto (PARRADO-FERNANDEZ et al., 2020). Existem numerosos estudos descrevendo as alterações moleculares causadas pela hipercolesterolemia no cérebro. Entretanto, permanecem pouco explorados os mecanismos moleculares responsáveis pelas diferenças quanto ao sexo observadas em condições de hipercolesterolemia. Diante deste

cenário, na presente tese foram investigados os efeitos do dimorfismo sexual e metabolismo de colesterol sobre a plasticidade sináptica e processos de memória em camundongos através do uso de técnicas bioquímicas, genéticas, de biologia molecular, eletrofisiológicas e comportamentais.

1.1 COLESTEROL E PROTEÍNAS CARREADORAS

A história de descobertas acerca da molécula do colesterol, sua síntese, função celular e regulação foi de tamanha importância para o meio científico que rendeu, de maneira direta, 12 Prêmios Nobel. Primeiramente, em 1770, o colesterol foi descrito como um componente dos ácidos biliares, e, posteriormente, isolado a partir de gordura animal em 1815 pelo químico Michel Chevreul. Entretanto, a sua estrutura química foi completamente elucidada somente mais de um século depois, o que rendeu ao químico alemão Heinrich Wieland o Prêmio Nobel de Química em 1927. Na década de 1950, Konrad Bloch descreveu as 26 enzimas necessárias para converter duas moléculas simples de carbono (acetato) em uma molécula complexa composta por 27 carbonos estruturados em 4 anéis, o colesterol. Neste mesmo trabalho ele postulou que a enzima limitante dessa síntese seria a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoAR), o que foi confirmado posteriormente. O impacto da descoberta da via de biossíntese do colesterol rendeu ao pesquisador o Prêmio Nobel de Química em 1964 (ZETTERSTRÖM, 2009). Os norte-americanos Michael Stuart Brown e Joseph Leonard Goldstein receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia em 1985, por suas descobertas relativas à regulação do metabolismo do colesterol (BROWN; GOLDSTEIN, 1986).

Estruturalmente, a molécula do colesterol é formada por 4 anéis (grupo esterol) que possuem ligações *trans*, tornando-a uma molécula plana. O colesterol é um componente estrutural crucial das membranas biológicas, precursor de hormônios esteroides, da vitamina D, dos ácidos biliares, além de desempenhar um papel crítico nos processos de sinalização e proliferação celular (NELSON; COX, 2013; SIMONS; IKONEN, 2000). O principal local da síntese endógena do colesterol é o fígado, e, devido a sua característica lipofílica, o colesterol é carregado através circulação por lipoproteínas, o que garante um suprimento apropriado e contínuo de colesterol para os demais tecidos (NELSON; COX, 2013).

Antes mesmo da elucidação da via de biossíntese do colesterol, em 1929, já havia sido postulado que essa molécula era transportada na circulação ligada à proteínas.

Entretanto, somente com o surgimento de novas ferramentas laboratoriais (como o desenvolvimento da ultracentrífuga) foi possível classificar as lipoproteínas transportadoras do colesterol de acordo com a sua densidade, classificação esta utilizada até os dias atuais (LINDGREN; ELLIOTT; GOFMAN, 1951; SIRI-TARINO; KRAUSS, 2016).

As lipoproteínas maiores e mais densas, os quilomícrons, contém uma alta proporção de triacilgliceróis. Estas lipoproteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático das células epiteliais que recobrem a superfície interna do intestino delgado e, então, são transportadas através do sistema linfático até a veia subclávia, onde acessam o sistema sanguíneo (HOKKANEN; TIRRONEN; YLÄ-HERTTUALA, 2019). As apolipoproteínas contidas nos quilomícrons são a apoB-48, a apoE e a apoC-II. A apoC-II é responsável pela ativação da enzima lipase lipoproteica nos capilares dos tecidos adiposo, cardíaco e músculo esquelético, que cliva os ácidos graxos dessa lipoproteína propiciando a sua entrega aos tecidos. Após a liberação dos triglicerídeos, os remanescentes de quilomícrons, que contém colesterol, apoE e apoB-48, são captados pelo fígado (COOPER, 1997).

O fígado exporta o colesterol como constituinte de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, a VLDL (lipoproteínas de muita baixa densidade), que além de triacilgliceróis, contém colesterol e ésteres do colesterol, bem como apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE. Nos músculos e tecido adiposo, a apoC-II ativa a lipase lipoproteica e provoca a liberação de ácidos graxos livres dos triacilgliceróis a partir da VLDL. A maior parte dos remanescentes de VLDL é retirada da circulação pelos hepatócitos (SPARKS; SPARKS, 2013). Contudo, a perda dos triacilgliceróis converte parte das VLDL em remanescentes de VLDL (também chamadas de lipoproteínas de densidade intermediária, IDL) e com a saída de mais triacilgliceróis em lipoproteínas de baixa densidade (LDL). As partículas de LDL são ricas em colesterol e ésteres do colesterol, e são metabolizadas pelo fígado e pelos tecidos periféricos, sendo a principal fonte de colesterol pelos tecidos. As LDLs são absorvidas pelas células via receptores de LDL (LDLr) por meio do reconhecimento da apoB-100 presente nas LDL (GOLDSTEIN; BROWN, 2009). Esses receptores possuem papel crucial na regulação intracelular do colesterol e são o foco principal do presente trabalho.

Alterações no metabolismo do colesterol, bem como hábitos alimentares, podem levar ao aumento dos níveis de colesterol circulante. O aumento dos níveis de colesterol total, particularmente o aumento da LDL, é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo que este risco pode ser atenuado através da redução dos níveis de colesterol (BALAKUMAR; MAUNG-U; JAGADEESH, 2016; HADJIPHILIPPOU; RAY, 2018). De acordo com a Associação Americana de

Cardiologia, um dos componentes da saúde cardiovascular é a manutenção das concentrações plasmáticas de colesterol total inferiores a 200 mg/dL para adultos e 170 mg/dL para crianças (MOZAFFARIAN et al., 2016). A Sociedade Brasileira de Cardiologia estabeleceu recentemente que seriam desejáveis níveis de colesterol total para adultos com mais de 20 anos inferiores a 190 mg/dL, e inferiores a 170 mg/dL para crianças. Os níveis ideais de LDL variam de inferior a 130 mg/dL (para pessoas que apresentam baixo risco de doenças cardiovasculares) até inferiores a 100 mg/dL (para pessoas que apresentam alto risco). Sendo que um valor igual ou superior a 160 mg/dL de LDL já é considerado como um quadro de hipercolesterolemia (ANDRÉ ARPAD FALUDI et al., 2017).

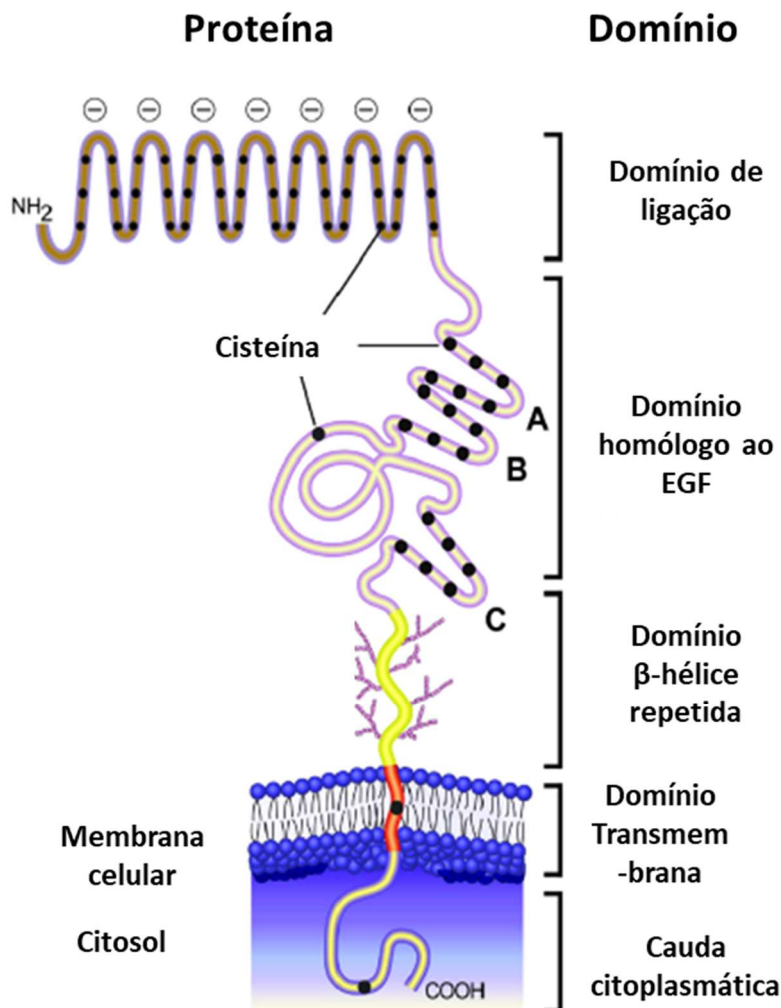
1.2 RECEPTOR LDL - ASPECTOS GERAIS

O receptor LDL regula a homeostase do colesterol no organismo pela remoção de lipoproteínas circulantes no plasma através de um processo de endocitose (BROWN; GOLDSTEIN, 1986). Em 1974 foi postulada pela primeira vez a existência de um receptor de superfície responsável pela captação do colesterol para o meio intracelular. Neste estudo pioneiro, Goldstein e Brown incubaram LDL marcada radioativamente em fibroblastos humanos e observaram que esta partícula ligava com alta afinidade a receptores de membrana e que isso tinha como consequência a degradação desta, além de redução da enzima limitante da síntese de colesterol. Testando diferentes concentrações da LDL, estes pesquisadores também demonstraram que esta ligação é saturável ao longo do tempo e atinge um platô (GOLDSTEIN; BROWN, 1974a). Posteriormente, o receptor LDL, de 164 kDa, foi isolado a partir do córtex da glândula adrenal de bovinos (SCHNEIDER et al., 1982).

A família de receptores LDL é estruturalmente composta por uma porção amino terminal extracelular, uma porção transmembrana e uma porção carboxi terminal intracelular. A porção extracelular apresenta três tipos de domínios: i) domínio de ligação rico em cisteína (que contém 7 repetições de cisteína R1-R7); ii) domínio para o fator de crescimento epidermal (EGF, do inglês *epidermal growth factor*); iii) domínio β hélice repetida, estes são ancorados na membrana celular por um único domínio transmembrana (Figura 1). A porção extracelular do receptor LDL adota uma conformação aberta e alongada em pH neutro e uma conformação fechada e compacta em pH ácido, o que favorece a ligação as lipoproteínas quando está ancorado na membrana com a porção extracelular exposta, e

propicia a liberação da lipoproteína quando dentro do lisossomo onde está exposto a um pH baixo (RUDENKO et al., 2002).

Figura 1. Figura representativa da estrutura do receptor LDL.



Legenda: A porção extracelular composta pelo domínio rico em cisteína, domínio homólogo ao EGF, domínio β hélice repetida está ancorados na membrana através de um domínio transmembrana que é ligado a uma cauda citoplasmática intracelular. Fonte: Adaptado de (GABCOVA-BALAZIOVA et al., 2015).

Estudos mais recentes demonstraram, através de mutações nos resíduos de aminoácidos da porção extracelular do receptor, que a exposição dos resíduos R4 e R5 de cisteína e de alguns resíduos na β-hélice é importante para a interação entre as cargas positivas das lipoproteínas e o receptor (BENITO-VICENTE et al., 2018; HUANG et al., 2010; MARTÍNEZ-OLIVÁN et al., 2015).

A descoberta do receptor LDL também impactou na área da biologia celular e até mesmo em teorias utilizadas até hoje na farmacologia, uma vez que introduziu três conceitos

gerais: i) endocitose mediada por receptor; ii) reciclagem de receptores; e iii) *feedback* de regulação de receptores (BROWN; ANDERSON; GOLDSTEIN, 1983; GOLDSTEIN; BROWN, 2009).

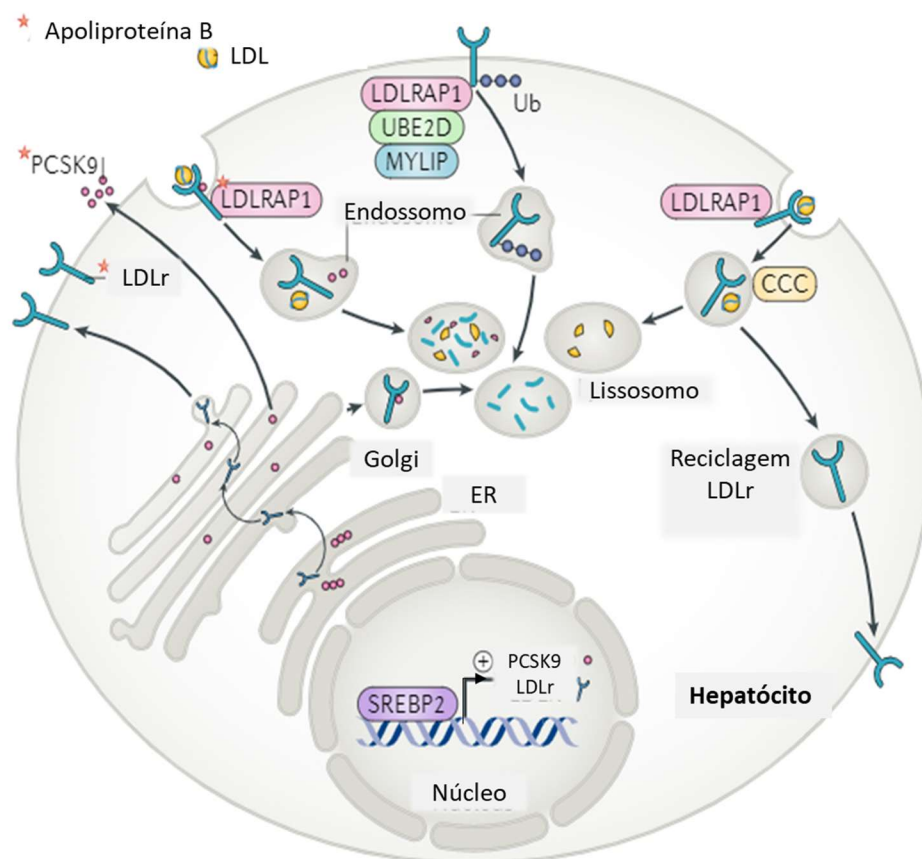
A endocitose dos receptores LDL foi descrita em 1976 utilizando moléculas de LDL ligadas à ferritina. Os pesquisadores observaram através de microscopia eletrônica que a ligação da LDL a seus receptores ocorria em locais específicos e revestidos na superfície celular, e hipotetizaram sobre a existência de sítios especializados em internalização de macromoléculas através de receptores (ANDERSON; GOLDSTEIN; BROWN, 1976). No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que após a ligação com o receptor ocorria a invaginação das regiões revestidas da membrana celular, e, aproximadamente 1 minuto após esse evento, as vesículas recém-formadas migravam para o citoplasma, sendo que aos 6 minutos já haviam se fundido com um lisossomo (ANDERSON; BROWN; GOLDSTEIN, 1977). Estes dados indicaram que estas regiões eram revestidas por clatrina, o que favorecia a rápida internalização desta estrutura, e que a localização do receptor LDL nesta região era essencial para a eficiência da captação de macromoléculas (GOLDSTEIN; ANDERSON; BROWN, 1979).

O segundo conceito originado durante os estudos sobre o receptor LDL foi o da reciclagem dos receptores. Utilizando a monensina como ferramenta para impedir o tráfico de moléculas dentro dos fibroblastos, foi observado que 15 minutos após a sua incubação na presença de LDL ocorria uma redução de 75% na quantidade dos receptores LDL, sendo que o impacto era ainda maior (90%) após 1 hora de incubação. Já na ausência de LDL, a monensina causava um impacto menor sobre o número de receptores na membrana. Isto demonstra que a maior parte dos receptores expostos nas regiões revestidas são receptores reciclados, e que a externalização é regulada pelo seu próprio ligante (BASU et al., 1981). Atualmente, já é sabido que após a endocitose e exposição a baixo pH do lisossomo, o complexo receptor-ligante se dissocia e o colesterol é liberado para o citoplasma, enquanto que o receptor retorna para a membrana. Esse ciclo do receptor pode levar em torno de 10 minutos para ser completado, uma vez que cada partícula de LDL contém aproximadamente 1600 moléculas de colesterol, esta reciclagem rápida do receptor garante um mecanismo eficiente de entrega do colesterol para as células (BROWN; ANDERSON; GOLDSTEIN, 1983).

Logo após a descoberta da existência do receptor LDL, uma das características observadas foi que a medida que a concentração intracelular de colesterol aumentava ocorria o *feedback* negativo de regulação do receptor (BROWN; GOLDSTEIN, 1975). Contudo,

demorou alguns anos para que se chegasse ao mecanismo dessa regulação. Foi observado que um fator de transcrição chamado proteína de ligação a elemento regulada por esterol (SREBP), sintetizado no retículo endoplasmático e liberado mediante aumento dos produtos de degradação do colesterol, se transloca até o complexo de Golgi onde é clivado em um fragmento solúvel. Esse fragmento se transloca para o núcleo onde irá ativar a transcrição de genes que codificam a HMG-CoAR e o receptor LDL. Esta fina regulação impede o acúmulo de colesterol intracelular, bem como mantém a homeostase desta molécula dentro da célula possibilitando que desempenhe suas funções celulares (WANG et al., 1994) (Figura 2).

Figura 2. Regulação da homeostase intracelular de colesterol mediada pelo receptor LDL.



Legenda: Normalmente, a redução da concentração intracelular de colesterol causa regulação positiva do gene do LDLr através da ativação de SREBP2 (proteína de ligação a elemento regulada por esterol 2). Então, o LDLr é sintetizado no retículo endoplasmático (RE) e glicosilado no aparato de Golgi, logo esses receptores maduros são expostos na superfície celular em regiões recobertas por clatrina. A apolipoproteína B é reconhecida pelo receptor e o complexo LDL-receptor é internalizado através da formação da vesícula da região recoberta por clatrina, que se funde com endossomos. A internalização da partícula LDL depende da interação da porção citoplasmática do receptor com a proteína adaptadora do LDLr 1 (LDLRAP1). Quando o complexo ligado é exposto ao pH baixo do endossomo, o receptor se dissocia e é posteriormente reciclado para a superfície celular. Um único LDLr pode ser reciclado mais de 100 vezes. As partículas das LDL retidas procedem de um

endossomo maduro para um lisossomo. Depois da degradação, o colesterol é liberado dentro das células através dos transportadores intracelulares de colesterol (NPC 1 e 2). Em resposta aos níveis de colesterol intracelular, o LDLr é degradado em um processo mediado pela proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9) ou pela proteína ubiquitina-ligase E3 (MYLIP). PCSK9 atua interrompendo a alteração conformacional que ocorre com as alterações de pH do meio, assim o receptor permanece dentro do endossomo, levando a degradação no lisossomo. Ao passo que a degradação do LDLr sinalizado pela MYLIP em resposta ao aumento do colesterol intracelular ocorre através do processo de ubiquitinação, que consiste em uma endocitose independente de clatrina ou do LDLRPA1 e uma via alternativa que leva a formação do lisossomo. As estrelas vermelhas indicam proteínas, que quando mutadas podem levar ao quadro de HF (Fonte: BERBERICH; HEGELE, 2019).

Após a purificação do receptor (SCHNEIDER et al., 1982), a forma humana deste foi clonada (YAMAMOTO et al., 1984) e, posteriormente, foi identificado o gene que codifica o receptor (SÜDHOF et al., 1985). Esses avanços contribuíram para a elucidação de defeitos relacionados ao receptor LDL, que podem ser classificados em cinco grandes grupos: defeitos na ligação do ligante, de transporte, de internalização, reciclagem e completa ausência do receptor (SOUTAR; NAOUMOVA, 2007). Até o momento, mais de 2000 mutações no gene que codifica o receptor já foram identificadas (disponível em: <https://databases.lovd.nl/shared/variants/LDLR/unique>, acesso em 03/04/2020). Estas mutações representam a principal causa da HF. A maior parte das descobertas sobre o receptor LDL foram realizadas ou mesmo confirmadas utilizando células provenientes de pacientes portadores de HF. Inclusive, foram os primeiros casos de HF que levaram os pesquisadores a questionar e postular a existência de um receptor envolvido na homeostase do colesterol (BROWN; GOLDSTEIN, 1974; GOLDSTEIN; BROWN, 1974b).

1.3 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

A HF foi descrita pela primeira vez em 1938 como um erro inato do metabolismo, clinicamente caracterizada por altos níveis de colesterol sanguíneo, presença de xantomas cutâneos e infarto agudo do miocárdio em pacientes jovens durante a infância e a adolescência (MÜLLER, 1938). Posteriormente, foi descrito que a doença poderia se apresentar em uma forma heterozigótica, menos severa e uma forma homozigótica, mais severa (KHACHADURIAN, 1964).

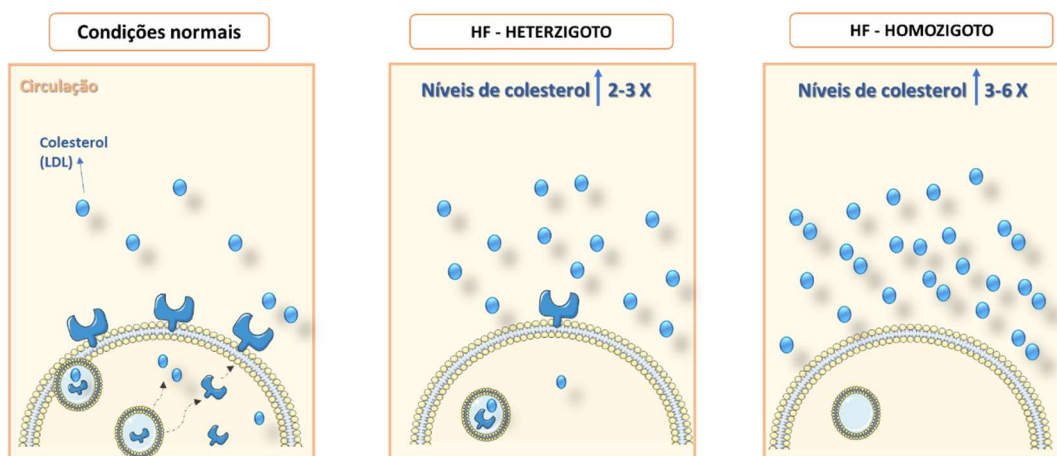
A primeira hipótese postulada para tal erro no metabolismo foi de que estes pacientes apresentavam problemas no gene que codifica a HMG-CoAR, visto que era o que se sabia naquela época sobre o metabolismo do colesterol (BROWN; DANA; GOLDSTEIN, 1973). Entretanto, ao testar esta hipótese incubando fibroblastos provenientes de pacientes controle e de portadores de HF foram observados dois eventos. Primeiro, a retirada da lipoproteína

LDL do meio induzia um aumento da atividade da HMG-CoAR nas células provenientes dos pacientes controle, enquanto nenhuma regulação da enzima era observada nas células provenientes do HF. Porém, esta alteração só ocorria com a retirada seletiva da LDL e não era alterada quando outras lipoproteínas eram retiradas. A segunda observação que este experimento trouxe foi de que a atividade da HMG-CoAR reduzia proporcionalmente a concentração da LDL incubada no meio, logo se notou que além da resposta ser específica apresentava afinidade (BROWN; DANA; GOLDSTEIN, 1973; GOLDSTEIN; BROWN, 1973).

Com base nessas evidências, postulou-se então a existência de um receptor que poderia estar mediando o reconhecimento da LDL, e a consequente regulação da síntese de colesterol. Para testar esta hipótese, os pesquisadores utilizaram a LDL marcada radioativamente e observaram que em fibroblastos provenientes de um indivíduo controle ocorria a adesão da LDL a superfície celular, em seguida a sua internalização e degradação, enquanto que fibroblastos de um paciente portador de HF não eram capazes de internalizar a LDL (GOLDSTEIN; BROWN, 1974a).

Atualmente é reconhecido que mutações do gene que codifica o receptor LDL acarretam uma redução parcial da função do mesmo e consequente elevação na concentração sérica de colesterol, entre 2 a 3 vezes nos casos heterozigotos. Enquanto que nos casos homozigotos há redução total da função do receptor e consequente elevação de 3 até 6 vezes nos níveis de colesterol (Figura 3) (USIFO et al., 2012). Como consequência do excesso de colesterol circulante, em ambos os casos, é classicamente descrito o aumento significativo de desenvolvimento de doenças cardiovasculares prematuras, sendo o sexo masculino o mais susceptível a este dano (COUTINHO et al., 2021; SUN et al., 2018; WANG et al., 2020b). Nos casos heterozigóticos não tratados existe um aumento de 20 vezes no risco de doença arterial coronariana prematura. Os pacientes acometidos pela forma homozigótica apresentam uma curta expectativa de vida, e podem vir a óbito ainda na infância (WATTS; LEWIS; SULLIVAN, 2007).

Figura 3. Representação dos níveis de colesterol encontrados nas formas homozigótica e heterozigótica da HF.



Legenda: Da direita para esquerda, pode ser visualizado uma representação de uma condição normal, onde as moléculas de LDL são captadas pelo LDLr e posteriormente esse receptor é reciclado para a membrana. O quadro seguinte representa os casos mais comuns, heterozigotos, onde o LDLr é parcialmente funcional, e um acúmulo de 2-3 vezes mais moléculas de LDL é observado na circulação. O último quadro, representa os casos homozigotos, nos quais ocorre total disfunção do LDLr e um acúmulo cerca de 6 vezes maior de moléculas de LDL no plasma. Fonte: Adaptado de (MYTILINAIYOU et al., 2018).

Segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipercolesterolemia Familiar da Sociedade Brasileira de Cardiologia o quadro de HF é caracterizado por depósitos extravasculares de colesterol, níveis de colesterol LDL superior a 190 mg/dL no sangue, em conjunto com histórico familiar da doença e identificação de mutações e polimorfismos genéticos que favoreçam o desenvolvimento da HF (PEREIRA et al., 2012). A HF constitui um dos distúrbios metabólicos hereditários mais comumente observados na população (GOLDBERG et al., 2011; MYTILINAIYOU et al., 2018). Estudos epidemiológicos sugerem que a forma heterozigótica apresenta uma grande variabilidade na prevalência, que pode estar associada com a etnia da população avaliada, enquanto que a forma homozigótica é mais rara e apresenta uma menor prevalência (MABUCHI et al., 1977; SEFTEL et al., 1989). Dados recentes demonstram que no Brasil, a prevalência da HF heterozigótica é de 1:263 indivíduos, muito próxima da média mundial que é de aproximadamente 1:250 indivíduos (HARADA et al., 2018). A forma homozigótica, por sua vez, apresenta uma prevalência de 1:160000 até 300000 indivíduos (CUCHEL et al., 2014).

No Brasil a HF é subdiagnosticada, o que acarreta em graves consequências como o aumento de casos prematuros de doença arterial coronariana. Estima-se que os custos de cada caso dessa doença associada a HF é de R\$ 4.008,00 para o Sistema único de Saúde

(SUS). A prevalência de doença arterial coronariana atribuída a HF no Brasil é de 12,9% ao ano, bem acima da média mundial de 0,73% (BAHIA et al., 2018).

O diagnóstico precoce da HF propicia um início de tratamento ainda no início da doença, o que pode retardar o surgimento de doenças cardiovasculares e prolongar a vida dos pacientes. Desde o seu lançamento no mercado em 1987, as estatinas vêm sendo utilizadas como primeira opção no tratamento da hipercolesterolemia e prevenção de eventos cardiovasculares (REINER, 2013). Essas drogas revolucionaram o tratamento da hipercolesterolemia, impactando diretamente na prevenção da aterosclerose e consequentemente as doenças cardiovasculares. O mecanismo de ação das estatinas consiste na inibição da enzima limitante da síntese de colesterol, a HMG-CoAR, reduzindo principalmente síntese de colesterol hepático. Ao passo que as estatinas reduzem a concentração intracelular de colesterol, ocorre o conseqüente aumento da expressão de receptores LDL na superfície celular aumentando a captação de partículas LDL. Em conjunto, essas alterações levam a redução significativa dos níveis de LDL circulante (ANDRÉ ARPAD FALUDI et al., 2017).

Na clínica, a associação de estatinas com outros fármacos é comum para atingir concentrações plasmáticas de LDL desejáveis. O ezetimiba é um fármaco que age bloqueando os transportadores NPC1 nos enterócitos no intestino delgado e, portanto, reduzindo a absorção do colesterol proveniente da dieta. Essa associação (estatina e ezetimiba) resulta num aumento ainda maior do LDLr na superfície celular em comparação a monoterapia com estatinas (PHAN; DAYSPRING; TOTH, 2012). Neste sentido, nos casos de HF, onde geralmente há um defeito na função do receptor de LDL, especialmente nos casos homozigóticos, essas abordagens não são efetivas. Mesmo nos casos heterozigotos a eficácia do tratamento com estatinas é limitada, resultando em uma redução inferior a 30% nos níveis de LDL circulante (CLIMENT et al., 2021).

A baixa taxa de sucesso do tratamento com estatinas em portadores de HF tem levado a tentativa do uso de abordagens novas, especialmente os inibidores da proteína (PCSK9) alirocumabe e evolocumabe (ARNESEN et al., 2021). Seu mecanismo de ação consiste em inibir a proteína PCSK9, o que por consequência reduz a degradação de LDLr e leva ao aumento da captação das partículas de LDL. Em portadores da forma heterozigótica de HF, a aplicação desses anticorpos monoclonais por via subcutânea em intervalos de 2 ou 4 semanas promove uma redução de 50-60% nos níveis de LDL circulante (PAPADEMETRIOU et al., 2018). Este avanço no conhecimento acerca dos mecanismos moleculares da HF e o desenvolvimento de novos tratamentos têm melhorado a qualidade

de vida e aumentado a longevidade dos pacientes com HF (PEĆIN; REINER, 2021). Como consequência, foi possível a observação do impacto negativo da hipercolesterolemia além do sistema cardiovascular, como em funções do SNC.

1.4 FUNÇÕES DO RECEPTOR LDL NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O SNC contém aproximadamente 25% de todo o colesterol do corpo humano, sendo o órgão com maior quantidade de colesterol. Em consonância com essa composição, o colesterol desempenha importantes funções na comunicação celular no SNC. É um componente essencial para a maturação celular durante o desenvolvimento, incluindo a formação da bainha de mielina, onde está confinado em sua maior parte (KRÄMER-ALBERS et al., 2006; MATHEWS et al., 2014).

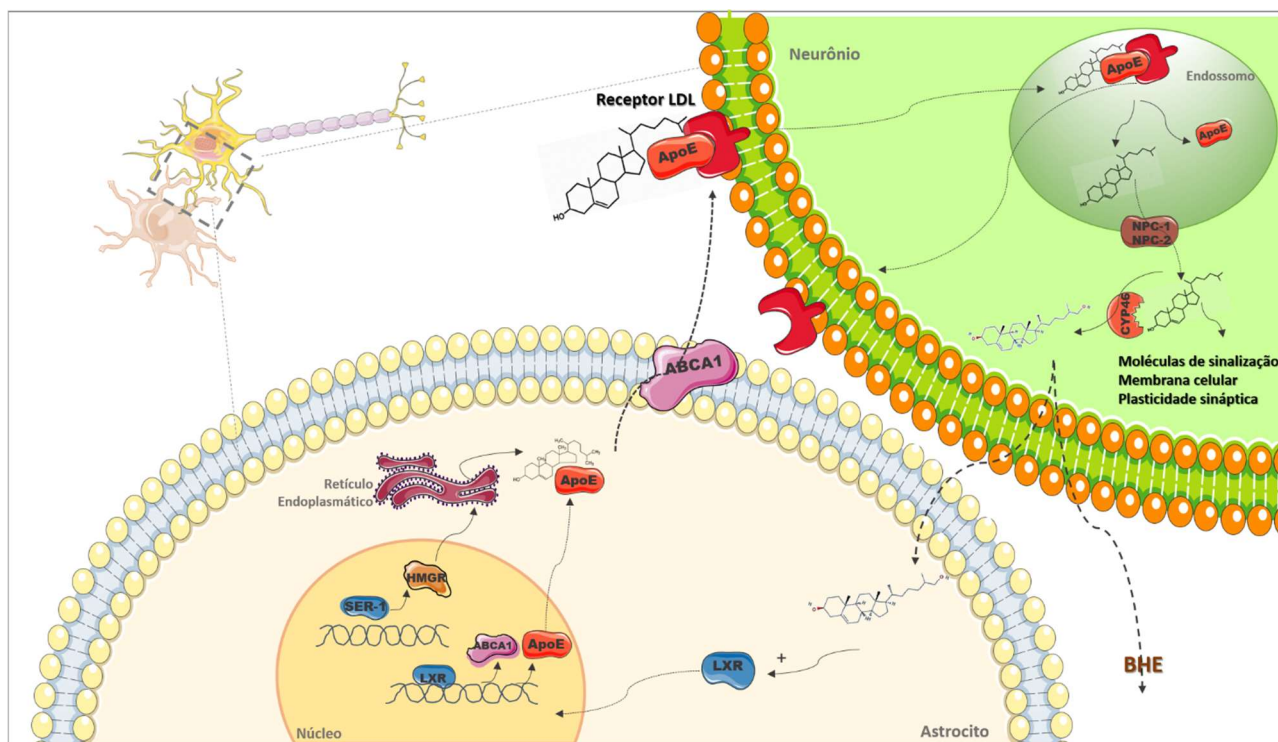
Em neurônios, na porção pré-sináptica, o colesterol é responsável por regular a fluidez, espessura e permeabilidade das membranas celulares, além de regular a síntese, formação e liberação de vesículas sinápticas. Na porção pós-sináptica, o colesterol tem a função de formar microdomínios onde estão localizados os receptores de neurotransmissores, fatores neurotróficos e canais iônicos. Desta maneira, o colesterol é crucial para as propriedades biofísicas da membrana, para a iniciação, propagação e manutenção da transdução de sinal de todos os sistemas de neurotransmissão (BORRONI; VALLÉS; BARRANTES, 2016). Além disso, a formação e manutenção de novas sinapses, a sinaptogênese, uma das formas de plasticidade envolvidas em eventos como aprendizado e memória, depende essencialmente do colesterol (MAUCH et al., 2001; ULLIAN et al., 2001).

De maneira interessante, a síntese e o metabolismo do colesterol no SNC envolvem complexas interações entre os astrócitos e os neurônios e são independentes da periferia, uma vez que essa molécula não é capaz atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Especialmente na idade adulta, o principal fornecimento de colesterol para os neurônios provém dos astrócitos (PFRIEGER, 2003). O passo inicial para a síntese de colesterol é a conversão da acetil coenzima A (CoA) em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) no citoplasma celular, seguido pela conversão do HMG-CoA em mevalonato pela ação da enzima HMG-CoAR, no retículo endoplasmático. A enzima limitante da síntese do colesterol, HMG-CoAR, sofre complexa regulação por *feedback* negativo, tendo a transcrição regulada pela proteína SREBP. Após a síntese, os astrócitos secretam o colesterol ligado a ApoE via transportadores de cassete de ligação ao ATP (ABCA1) para o meio

extracelular. Esse complexo colesterol-ApoE é internalizado pelos neurônios via LDLr (com o próprio receptor, ou com a proteína relacionada ao receptor de LDL-LRP1), sendo o único mecanismo conhecido de internalização do colesterol nos neurônios (Figura 4) (PFRIEGER; UNGERER, 2011). A ApoE é formada por um domínio N-terminal e um domínio C-terminal que estão ligados por 4 alfa-hélices. O domínio N-terminal é a porção responsável pelo reconhecimento do LDLr, enquanto o domínio C-terminal é essencial para o efluxo do colesterol das células (VEDHACHALAM et al., 2007; YANG et al., 2018).

O colesterol é liberado das lipoproteínas dentro de lisossomos neuronais e posteriormente transportado por proteínas Niemann-Pick C tipo 1 (NPC1) e tipo 2 (NPC2) para o citoplasma, onde desempenha inúmeras funções celulares ou é convertido em 24-hidroxicolesterol (24-OH) por uma enzima membro da família do citocromo P450, a CYP46. Esse metabólito do colesterol pode cruzar a BHE, ou ser liberado no plasma via fluido cérebro espinal, que é a principal rota de eliminação do colesterol do cérebro (Figura 4). De fato, os oxisteróis, derivados oxigenados do colesterol, são capazes de atravessar membranas lipofílicas (BJÖRKHEM, 2008). Assim como o 24-OH, o 27-hidroxicolesterol (27-OH) também é capaz de atravessar a BHE. Contudo, a maior parte do 27-OH flui da circulação para o cérebro e, devido à direta correlação entre os níveis de colesterol e de 27-OH na circulação sanguínea (BABIKER et al., 2005), se supõe que o aumento nos níveis de colesterol plasmático resulte em um aumento na captação cerebral de 27-OH (SHAFATI et al., 2011).

Figura 4. Metabolismo do colesterol no SNC.



Legendas: Os astrócitos são a principal fonte de colesterol para os neurônios. O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático pela ação da HMG-CoAR, a qual é regulada por *feedback* negativo via proteína de ligação a elemento regulada por esterol (SREBP) que se liga ao elemento regulatório de esterol (SER-1) no gene da HMG-CoAR. Os astrócitos secretam o colesterol sintetizado ligado à apolipoproteína E (Apo E) via transportadores de cassete de ligação ao ATP (ABCA1). O complexo colesterol-apoE é internalizado pelos neurônios via receptores LDL, e o colesterol é liberado dentro dos endossomos neuronais. O tráfico do colesterol para o citoplasma requer proteínas Niemann-Pick C tipo 1 (NPC1) e tipo 2 (NPC 2), a partir de onde é direcionado para suas inúmeras funções celulares ou sofre a ação da CYP46 e é convertido em 24-hidroxicolesterol (24-OH). Este metabólito pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) via líquido cefalorraquidiano, e também se liga aos receptores hepáticos ativados por X (LXR), que se translocam para o núcleo e induzem a expressão dos genes Apo E e ABCA 1 nos astrócitos, favorecendo o fornecimento de colesterol para os neurônios. Fonte: A autora com base em BENARROCH, 2008.

1.5 HF COMO FATOR DE RISCO PARA O PREJUÍZO COGNITIVO MODERADO E DEMÊNCIA

Além das alterações periféricas, estudos recentes têm reportado a existência de alterações neurológicas e neuropsiquiátricas, em particular o declínio cognitivo, em indivíduos com HF (SUÁREZ BAGNASCO, 2017). Desde a descrição pioneira da relação da HF com prejuízos de memória (CRUZ-SANCHEZ et al., 2008), diversos estudos têm corroborado estes achados (ARIZA et al., 2016; GAROLERA et al., 2016; HYTTINEN et al., 2010; ZAMBÓN et al., 2010).

Em particular, pacientes com HF apresentam alta prevalência de prejuízo cognitivo moderado (MCI, do inglês *mild cognitive impairment*), o qual é estabelecido enquanto o paciente ainda é jovem, corroborando a ideia de que a exposição precoce à hipercolesterolemia ou diminuição na função do LDLr podem induzir alterações diretas e precoces no SNC desses indivíduos (ARIZA et al., 2016; ZAMBÓN et al., 2010). Curiosamente, a deposição cerebral de colesterol já foi observada através da técnica de imagem de ressonância magnética em portadores da forma homozigota de HF com 21 anos (LI et al., 2015) ou 45 anos (FRANCIS et al., 2005).

Os efeitos da HF no SNC parecem estar diretamente relacionados aos altos níveis de LDL circulante. Um estudo realizado em pacientes idosos com a mesma mutação para HF (*North Karelia mutation*), comparando os que faziam o uso de estatinas com a população saudável, observaram que os portadores de HF fazendo uso do hipolipemiante apresentavam melhor memória episódica do que a população em geral (HYTTINEN et al., 2010).

Em um estudo de caso, Orehek (2016) relatou uma paciente portadora de HF com altos níveis circulantes de colesterol LDL, não responsiva a terapia medicamentosa ou alterações do estilo de vida, que começou a apresentar problemas cognitivos e de memória aos 50 anos de idade. A ressonância magnética mostrou alargamento bilateral dos ventrículos, perda da massa neuronal e alargamento dos sulcos cerebrais, sinais clássicos observados nos quadros de demência e na doença de Alzheimer (KURODA et al., 2020). Nesse caso, a única maneira efetiva de controlar os níveis de colesterol e reverter os prejuízos cognitivos foi a realização de aférese de plasma. Após dois anos de troca de plasma com intervalos de 3 semanas, os níveis de LDL foram controlados (entre 46–114 mg/dL), ocorrendo também uma melhora no quadro neurológico. A paciente apresentou recuperação na habilidade de ler livros e seguir as histórias, além de voltar a ser capaz de realizar tarefas cotidianas, como elaborar uma lista de compras para o supermercado. O autor discute que além do controle dos níveis de LDL, a aférese também remove fatores pró-inflamatórios, o que pode promover benefícios adicionais ao quadro (OREHEK, 2016).

Apesar das evidências supracitadas sobre os déficits cognitivos em indivíduos com HF, até o momento não existem estudos investigando a possibilidade de homens e mulheres serem diferentemente afetados neste aspecto. É interessante notar que, no que diz respeito aos eventos cardiovasculares recorrentes da HF, os homens costumam ser mais susceptíveis (COUTINHO et al., 2021; PÉREZ GARCÍA, 2018). Por outro lado, é sabido que as mulheres apresentam maior prevalência de demências e doença de Alzheimer (BEAM et al., 2018; VIÑA; LLORET, 2010). Ademais, o manejo da HF para mulheres pode ter implicações

muito além do controle dos níveis da LDL, como por exemplo na escolha do anticoncepcional e demais oscilações hormonais ao longo da vida, o que torna a eficácia e a adesão ao tratamento mais difíceis (BALLA et al., 2020).

1.6 MODELO ANIMAL DE HF

Com a evolução nas técnicas de pesquisa e no conhecimento, a manipulação genética passou a ser uma ferramenta muito útil para avaliar a participação de vias e receptores em diferentes funções fisiológicas e condições patológicas. Muitos anos depois da descrição do LDLr, em 1993, Ishibashi e colaboradores desenvolveram um camundongo com deleção do gene que codifica o receptor LDL (ISHIBASHI et al., 1993). Este animal é considerado um bom modelo da HF, apresentando as seguintes vantagens: i) a semelhança biológica à condição humana da HF heterozigótica, causada por mutações no gene para o LDLr; ii) o perfil de lipoproteínas plasmáticas, que se assemelha ao de humanos, estando a maior parte do colesterol confinado na fração LDL; e iii) o grau de dislipidemia intermediário, desenvolvendo lesões menos avançadas do que os camundongos apoE^{-/-} (outro modelo animal da HF) (ZADELAAR et al., 2007).

Os camundongos LDLr^{-/-} apresentam hipercolesterolemia, caracterizada por níveis moderados de colesterol LDL quando alimentados com uma dieta padrão, podendo desenvolver lesões ateroscleróticas a longo prazo. Contudo, tornam-se severamente hipercolesterolêmicos e muito susceptíveis ao desenvolvimento de intensa aterosclerose aórtica e xantomas subcutâneos quando alimentados com dieta rica em colesterol (ISHIBASHI et al., 1993; LANGBEIN et al., 2015; VIANA GONÇALVES et al., 2017). Este modelo animal possibilitou investigar, além dos prejuízos cardiovasculares já conhecidos na HF, aspectos adjacentes aos danos reportados no SNC.

1.7 ACHADOS EM CAMUNDONGOS LDLr^{-/-} RELACIONADOS A MEMÓRIA: ESTARÍAMOS IGNORANDO AS PARTICULARIDADES SEXUAIS?

Os prejuízos cognitivos apresentados pelos animais LDLr^{-/-} têm sido demonstrados de maneira consistente através da utilização de diversos paradigmas de avaliação (ver Tabela 1). A maior parte dos estudos demonstra prejuízos em tarefas dependentes do hipocampo, como de aprendizagem e memória espacial. É interessante notar que, apesar do uso de dietas

com alto teor de colesterol aumentar significativamente os níveis de LDL circulante nos animais (ELDER et al., 2008; THIRUMANGALAKUDI et al., 2008), os prejuízos comportamentais são muito evidentes mesmo com a dieta padrão, sendo que muitos estudos não encontraram diferenças comportamentais quanto ao fator dieta (DE OLIVEIRA et al., 2020a). Isso reforça a ideia de que não somente os níveis plasmáticos de colesterol estão relacionados aos prejuízos cognitivos, como também a própria deleção do LDLr ou sua ausência durante o desenvolvimento do SNC. A idade representa outro fator importante para a observação de prejuízos cognitivos em camundongos LDLr-/- (MOREIRA et al., 2012b), embora alguns prejuízos já sejam observados em animais adultos jovens (2 meses) (ELDER et al., 2008) (ver detalhes na Tabela 1).

Os eventos celulares e moleculares subjacentes à essas alterações comportamentais reveladas até o momento envolvem especialmente prejuízos vasculares, caracterizados por redução do fluxo sanguíneo cerebral e oclusões trombóticas (JAHRLING et al., 2018, KRAFT et al., 2017), aumento da permeabilidade da BHE (DE OLIVEIRA et al., 2020a) e consequente neuroinflamação indicada pela astrogliose e microgliose (NUTHIKATTU et al., 2020, GAO et al., 2020). Essas alterações foram reportadas em estudos que utilizaram animais ainda jovens (com menos de 6 meses de idade), indicando que essas são características iniciais no curso temporal do surgimento dos prejuízos cognitivos. Alterações sinápticas, reveladas pela marcação de proteínas sinápticas como sinaptofisina, são eventos observados em animais com idade mais avançada (mais de 12 meses) (MULDER et al., 2004, 2007; WANG et al., 2014), o que reflete a consequência de uma exposição prolongada à neuroinflamação (para uma revisão detalhada da literatura ver Tabela 2). Apesar dessas alterações serem também convergentes com um quadro da doença de Alzheimer, até o momento não foi observado aumento da deposição da proteína beta amiloide ($A\beta$) no cérebro de camundongos LDLr-/- (DE OLIVEIRA et al., 2020b).

Analisando esse conjunto de evidências, destaca-se que grande parte dos estudos comportamentais foi realizada utilizando animais machos (Tabela 1, Figura 5A). Mais especificamente no que diz respeito aos estudos que avaliaram mecanismos celulares e moleculares, nenhum desses estudos utilizou fêmeas (Tabela 2, Figura 5B). Entretanto, sabe-se que ambos sexos são afetados pela HF, e especialmente mulheres apresentam maior prevalência de demências e a doença de Alzheimer (CAO et al., 2020). Este cenário aponta para a negligência dos estudos pré-clínicos em relação as particularidades sexuais diante de um quadro de hipercolesterolemia, especialmente com relação ao impacto no SNC.

Tabela 1. Estudos realizados com camundongos LDLr-/- que avaliaram memória.

Idade (meses)	Sexo	Principais Resultados	Teste Comportamental	Dieta	Referência
6	Macho	Prejuízo de memória espacial	Labirinto em T Labirinto aquático	Padrão	(MULDER et al., 2004)
4	Não especificado	Prejuízo de memória trabalho	Labirinto radial aquático	21% de gordura + 1,25% de colesterol 8 semanas	(THIRUMANGALAKUDI et al., 2008)
2	Macho	Prejuízo de memória espacial	Labirinto aquático	4.3% de gordura + 0.15% de colesterol 16 semanas	(ELDER et al., 2008)
3 e 14	Não especificado	Prejuízo de memória espacial e de procedimento	Labirinto aquático/ Realocação de objeto/Medo condicionado	Padrão	(MOREIRA et al., 2012b)
10 a 12	Fêmea	Prejuízo de memória espacial	Labirinto aquático/ Reconhecimento de objeto/Medo condicionado	Padrão	(JOHNSON et al., 2014)
5	Não especificado	Prejuízo de memória espacial e de trabalho	Labirinto em cruz elevado/ Realocação de objeto	Padrão	(DE OLIVEIRA et al., 2014a)
12	Macho	Prejuízo de memória espacial	Labirinto aquático	Padrão	(WANG et al., 2014)
6	Macho	Prejuízo de memória espacial e de trabalho	Labirinto T/ Reconhecimento de	Padrão	(LOPES et al., 2015)

			objeto/Realocação de objeto		
3 e 24	Fêmea	Prejuízo em memórias aversivas	Medo condicionado ao contexto	1,5% de colesterol	(MACHADO et al., 2018)
3	Macho	Prejuízo de memória espacial	Teste da mudança métrica/ Teste da ordem temporal	Padrão	(ENGEL et al, 2019)
3 e 14	Macho	Prejuízo de memória espacial	Labirinto aquático	Padrão	(DE OLIVEIRA et al., 2020b)
3	Macho	Prejuízo de memória espacial, de reconhecimento e aprendizado	Reconhecimento de objeto/Realocação de objeto/ Labirinto aquático	Padrão	(DE PAULA et al., 2020)
3	Macho	Prejuízo de memória espacial e de reconhecimento	Reconhecimento de objeto/Realocação de objeto	20% de gordura + 1,25% colesterol	(DE OLIVEIRA et al., 2020a)
6	Macho	Prejuízo de memória espacial e aprendizagem	Labirinto aquático	Rica em gordura	(GAO et al., 2020)

Dados coletados da base de dados Pubmed utilizando para a busca as palavras chave: *LDL receptor knockout animals + memory*. Foram considerados todos os resultados da busca que atenderam às informações acima citadas. Data da busca: 08/03/2020.

Tabela 2. Estudos realizados com camundongos LDLr^{-/-} que avaliaram parâmetros moleculares no SNC.

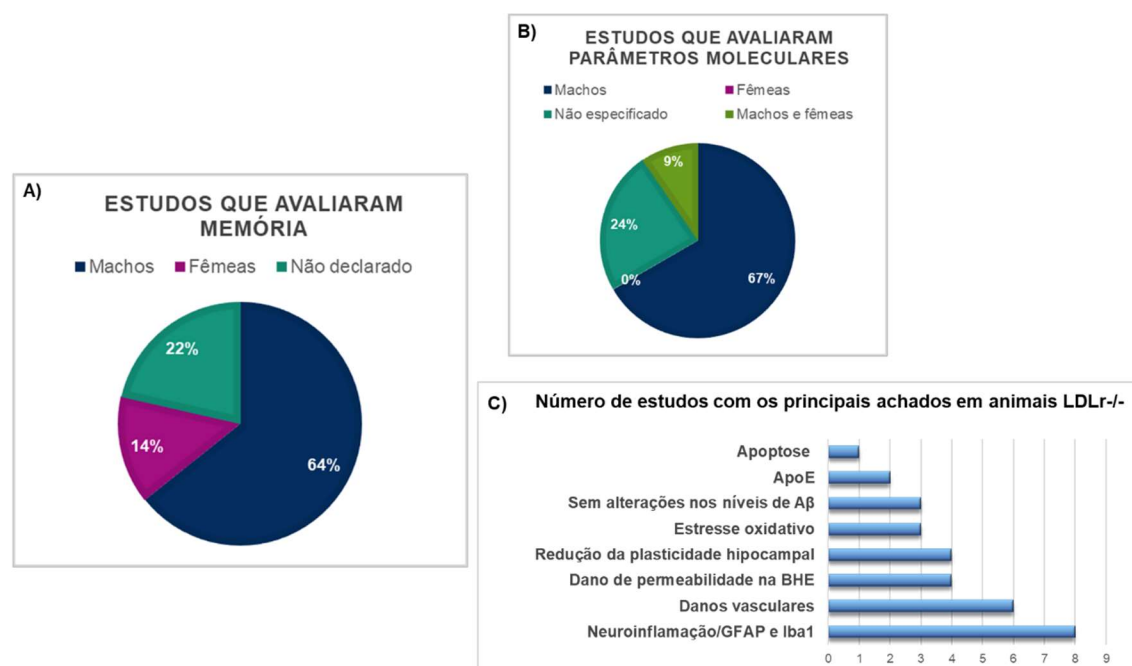
Idade (meses)	Sexo	Principais resultados no SNC	Dieta/intervenção	Referência
3	Não especificado	Aumento de ApoE no líquido cefalorraquidiano sem alteração na deposição de A β	Padrão	(FRYER et al., 2005)
6	Macho	Sem alterações na deposição de A β , APP Aumento de ApoE	0,15% de colesterol 16 semanas	(ELDER et al., 2007)

14	Macho	Diminuição de proliferação celular e botões pré-sinápticos no hipocampo	Padrão	(MULDER et al., 2007)
6	Não especificado	Ativação glial aumento dos níveis de TNF α , IL-1 β , IL-6, NOS2 e COX2	20% de gordura+ 1,25% colesterol 8 semanas	(THIRUMANGALAKUDI et al., 2008)
3	Macho	Desbalanço oxidativo e da cadeia mitocondrial	20% de gordura+ 1,25% colesterol 4 semanas	(DE OLIVEIRA et al., 2011, 2013)
3 e 14	Não especificado	Desbalanço oxidativo	Padrão	(MOREIRA et al., 2012b)
3	Não especificado	Ativação glial	Padrão	(DE OLIVEIRA et al., 2014b; MOREIRA et al., 2012a)
24	Macho	Prejuízo sináptico	Padrão	(WANG et al., 2014)
3	Fêmea e macho	Aumento da permeabilidade da BHE, e aumento da expressão de hemeoxigenase-1 (pró-inflamatória)	Padrão	(ENGEL, 2016)
9	Macho	Redução do fluxo sanguíneo cerebral e ativação microglial no hipocampo	45% de gordura 15 semanas	(ARNOLDUSSEN et al., 2017)
12	Macho	Redução do fluxo sanguíneo e densidade vascular cerebral	Padrão	(JAHRLING et al., 2018)
6 e 12	Macho	Oclusões trombóticas no córtex e hipocampo	Padrão	(KRAFT et al., 2017)
10	Macho e fêmea	Dano da BHE	Padrão	(VAN SKIKE et al., 2018)
3	Macho	Redução da neurogênese	Padrão	(ENGEL et al., 2019)
3 e 14	Macho	Apoptose (BAX/Bcl2) e	Padrão	(DE OLIVEIRA et al., 2020b)

		ativação de astrócitos no hipocampo sem alterações no conteúdo de beta-amilóide		
3	Macho	Aumento de ativação astrocitária e dano de células endoteliais	Padrão	(DE PAULA et al., 2020)
1	Macho	Alterações da microvasculatura e permeabilidade endotelial hipocampal	21% de gordura+ 0,2% colesterol 8 semanas	(NUTHIKATTU et al., 2020)
3	Macho	Aumento da permeabilidade de BHE	20% de gordura+ 1,25% colesterol 30 dias	(DE OLIVEIRA et al., 2020a)
6	Macho	Disfunção no eixo-cérebro-intestino, Neuroinflamação (aumento de GFAP e IBA1)	46% de gordura+ colesterol (não especificado o percentual) 14 semanas	(GAO et al., 2020)

Dados coletados da base de dados *Pubmed* utilizando para a busca as palavras chave: *ldlr knockout mice brain*. Foram incluídos estudos com parâmetros morfológicos e bioquímicos de interesse para esta tese. Data da busca: 11/03/2020.

Figura 5. Resumo gráfico das evidências científicas utilizando camundongos LDLr-/-.



Legenda: Demonstração gráfica de publicações encontradas na base de dados *Pubmed* sobre os achados em animais LDLr/-. A) Representação do percentual do sexo utilizado nos estudos explorando memória. B) Representação do percentual do sexo utilizado para avaliação das alterações celulares ou moleculares. C) Número de estudos publicados que exploraram mecanismos celulares e moleculares no SNC.

Bertolotti e colaboradores (2012) reportaram um aumento significativo nos níveis circulantes de 27-OH em indivíduos com HF quando comparados com indivíduos saudáveis. Neste mesmo estudo também foi observado uma correlação positiva entre os níveis de colesterol circulantes e a produção de 27-OH (BERTOLOTTI et al., 2012). Uma vez que, diferente do colesterol que não é capaz de atravessar a BHE, o 27-OH pode se difundir através da barreira, essa molécula pode representar a conexão que medeia os danos no SNC em consequência do aumento dos níveis periféricos de colesterol (BJÖRKHEM, 2008; SANDEBRING-MATTON et al., 2021).

1.8 OXIDAÇÃO DA LDL E A PRODUÇÃO DE OXIESTERÓIS

A oxidação da LDL é uma das principais causas desencadeadora de doenças relacionadas ao seu excesso, como doenças cardiovasculares, infarto agudo do miocárdio, síndrome metabólica e diabetes mellitus (SIGURDARDOTTIR; FAGERBERG; HULTHE, 2002). A LDL oxidada pode também desencadear uma resposta imune com produção de autoanticorpos contra a molécula (PALINSKI et al., 1989; SALONEN et al., 1992). A

transição entre o estado “nativo” da LDL para o estado oxidado é determinante para o surgimento das complicações supracitadas e é fortemente influenciada por fatores como tabagismo e idade. Este estado de oxidação pode ser monitorado através de biomarcadores de oxidação que possibilitam acessar o *status* de oxidação *in vivo* utilizando a quantificação da própria LDL oxidada (JÜRGENS et al., 1987; UCHIDA, 2015), do 4-hidroxinonal (HOFF et al., 1989) e dos oxisteróis (UMETANI et al., 2014). A susceptibilidade da LDL a oxidação pode ser acessada *in vitro*, submetendo a molécula a desafio oxidantes, como por exemplo, íons de cobre (ESTERBAUER et al., 1989).

A oxidação do colesterol aumenta a sua polaridade, facilitando a sua eliminação pelas células. Grupamentos hidroxila, epóxi, ou cetonas são introduzidos ao núcleo esterol resultando em compostos de 27 carbonos, metabólitos intermediários ou finais do metabolismo do colesterol chamados de oxisteróis (BJÖRKHEM; DICZFALUSY; LÜTJOHANN, 1999). Diferente de seu precursor, os oxisteróis apresentam características particulares, como a habilidade de atravessarem membranas biológicas e alta reatividade, o que contribui para seu envolvimento em vários processos patogênicos (MEANEY et al., 2002; WIELKOSZYŃSKI et al., 2018).

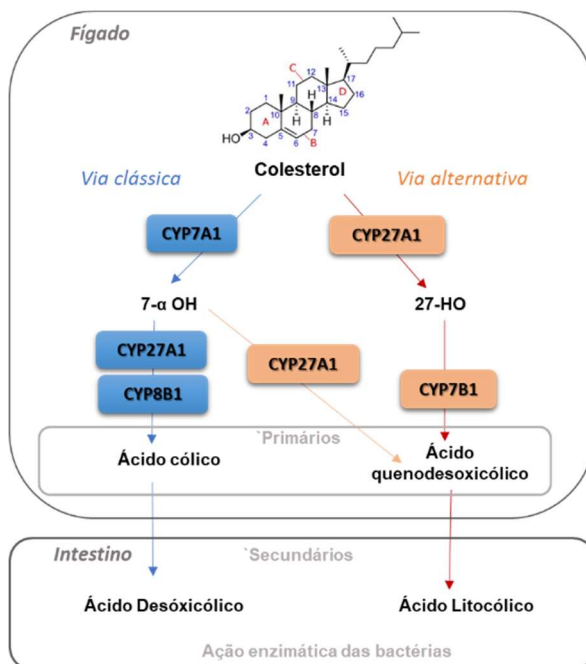
Uma pequena porção dos oxisteróis pode ser proveniente da dieta, entretanto, esta tem menor impacto nos níveis circulantes totais (HUR; PARK; JOO, 2007). Majoritariamente esses são provenientes do metabolismo endógeno, que pode ocorrer via: i) auto-oxidação, que pode ser influenciada por fatores externos, como o tabagismo (IULIANO, 2011); ii) por ação enzimática (PIKULEVA et al., 1998). Esta última é um mecanismo análogo e bem conservado em humanos e roedores (MUTEMBEREZI; GUILLEMOT-LEGRIS; MUCCIOLI, 2016).

As enzimas envolvidas no metabolismo dos oxisteróis podem ser classificadas em três grupos: i) oxirredutases; ii) hidrolases; iii) transferases. Dentro do grupo das oxirredutases as enzimas do citocromo P450 (CYP450) são as mais estudadas. A colesterol 7-alfa-hidroxilase (CYP7A1) inicia a via clássica da produção de ácidos biliares, enquanto que a esterol 27-hidroxilase (CYP27A1) inicia a via alternativa. A partir dessa primeira reação uma cascata de reações leva a formação dos ácidos biliares, conforme ilustrado na Figura 7 (RUSSELL, 2003).

Em indivíduos saudáveis, a produção média diária do 27-HO (o mais abundante oxisterol periférico) é de cerca de 17,6 mg/dia, sendo que boa parte deste ($\pm 66\%$) é destinado para a produção de ácidos biliares (DUANE; JAVITT, 1999). Em concentrações fisiológicas, os oxisteróis possuem um tempo de meia-vida variável dependendo do

metabólito, representando um mecanismo importante de eliminação do colesterol. O tempo de meia-vida em humanos do 4 β -hidroxicolesterol é longa, de aproximadamente 60 horas, enquanto do 27-OH e do 7-HOCA é inferior a 1 hora (BODIN et al., 2002).

Figura 6. Ilustração das vias de síntese dos ácidos biliares.



Legenda: Os ácidos biliares são sintetizados a partir do colesterol no fígado através de duas vias: i) a via clássica e ii) a via alternativa. No fígado a síntese de ácidos biliares ocorre principalmente a partir de dois principais ácidos biliares primários, ácido cólico e quenodesoxicólico. As enzimas regulatórias dessa produção estão destacadas nas cores azul e laranja. A CYP7A1 catalisa o passo limitante da síntese dando origem ao 7 α -hidroxicolesterol (7- α OH), enquanto que a CYP27A1 inicia a via alternativa convertendo o colesterol em 27-hidroxicolesterol (27-OH), que é posteriormente convertido, após uma sucessão de conversões, em ácido quenodesoxicólico pela enzima oxisterol 7-hidroxilase (CYP7B1). A enzima CYP7B1 regula a síntese de ácido cólico na via clássica. No intestino, os ácidos biliares primários são convertidos por enzimas presentes nas bactérias intestinais em ácido quenodesoxicólico e ácido cólico (CHIANG; LI, 2009).

Fisiologicamente, oxisteróis, especialmente o 27-OH, têm sido implicados em processos imunes, homeostase de massa óssea e mielinização e sobrevivência neuronal (NEVIUS et al., 2015; SOROOSH et al., 2014; THEOFILOPOULOS et al., 2014). Entretanto, situações onde os níveis circulantes dessas moléculas estão aumentados, por exemplo em casos de falha genética ou em quadros de hipercolesterolemia, essas moléculas contribuem para o surgimento de doenças (POLI; BIASI; LEONARDUZZI, 2013; TESTA et al., 2018). A contribuição dos oxisteróis na fisiopatologia de diferentes doenças ocorre em razão de suas características reativas que favorece um quadro de estresse oxidativo,

promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como interleucina-8 e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (PRUNET et al., 2006).

Os níveis de oxisteróis são especialmente alterados em algumas condições, como na síndrome metabólica e diabetes melittus e têm sido sugeridos como biomarcadores para estas condições (SAMADI et al., 2019). Os alvos moleculares com os quais os oxisteróis podem interagir são diversos, como receptores LXR α e β , ROS (do inglês, *retinoid-related orphan receptor*) ER α (do inglês, *strogen receptor*), INSIG (do inglês, *Insulin-Induced Gene 1*). A variedade de receptores ativados ou antagonizados pelos oxisteróis explicam a variedade de efeitos que essas moléculas podem exercer no metabolismo do colesterol, lipídeos e glicose, além dos efeitos sob o sistema imune. É importante destacar que a ampla família dos oxisteróis compartilham similaridades químicas e estruturais, porém podem apresentar efeitos fisiológicos distintos e até mesmo antagônicos (JAKOBSSON et al., 2012; LAPPANO et al., 2011; RACCOSTA et al., 2013; UMETANI et al., 2007).

1.9 MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DOS OXISTERÓIS

A função e o metabolismo dos oxisteróis no contexto de diversas doenças têm sido melhor compreendidos através da utilização de modelos murinos. Manipulações genéticas, como a superexpressão ou a deleção de genes para algumas enzimas envolvidas na síntese dessas moléculas, têm contribuído no entendimento do envolvimento desses oxisteróis no desenvolvimento das doenças (BJÖRKHEM; LEONI; MEANEY, 2010; MAIOLI et al., 2013). Uma descrição dos principais modelos utilizados atualmente e suas respectivas características são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Principais modelos animais para estudos dos oxisteróis.

Enzima	Abordagem	Observações	Doença relacionada	Referências
Cyp7a1	Cyp7a1 nocaute/ Cyp7a1 ^{-/-}	Aumento da expressão de Cyp7b1		(SCHWARZ et al., 1996)
Cyp7b1	Cyp7b1 nocaute/ Cyp7b1 ^{-/-}	Aumento dos níveis de 25-OH e 27- OH	Doença neonatal do fígado e paraplegia espástica tipo 5	(HEVERIN et al., 2017; SETCHELL et al., 1998; TSAOUSIDOU et al., 2008)

Cyp27a1	Cyp27a1 nocaute/ Cyp27a1 ^{-/-}	Redução significativa de 27- OH. Prejuízo da síntese de ácidos biliares	Xantomatose cerebrotendínea	(ALI et al., 2013; BJÖRKHEM; LEONI; MEANEY, 2010)
Cyp27a1	Cyp7a1super expressão/ Cyp27a1 ^{+/+}	Aumento de 27- OH. Redução da inflamação		(HENDRIKX et al., 2015)
Cyp46	Cyp46 superexpressão no cérebro/ Cyp46 ^{+/+}	Aumento da produção de 24- OH cerebral		(MAIOLI et al., 2013)

Busca na base de dados Pubmed em 20/02/2021. Foram incluídos estudos de interesse para esta tese.

1.10 EFEITOS DOS OXIESTERÓIS NO SNC E NA MEMÓRIA: ESTARÍAMOS IGNORANDO AS DIFERENÇAS SEXUAIS?

A produção de oxisteróis no SNC ocorre desde o desenvolvimento, sendo que já foram identificadas algumas moléculas como 7 α -, 7 β -, 22R-, 24S-, 25- e 27-hidroxicolesterol no córtex e na medula espinal em embriões de camundongos (WANG et al., 2009). Devido a sua diversidade química, os oxisteróis podem exercer diferentes efeitos no SNC, sendo que no presente estudo serão destacados os efeitos do 27-OH no SNC (DUANE; JAVITT, 1999).

O 27-OH tem sido postulado como uma possível conexão entre o colesterol periférico e o aumento da susceptibilidade para prejuízos cognitivos e a doença de Alzheimer (GHRIBI, 2008). Estudos clínicos relataram níveis aumentados do 27-OH tanto no fluido cerebrospinal (LEONI et al., 2004; WANG et al., 2016) como em tecido cerebral (HEVERIN et al., 2004) de indivíduos com a doença de Alzheimer em comparação a indivíduos controle da mesma faixa etária. Estudos *in vitro* utilizando células da linhagem SH-SY5Y demonstraram que o 27-OH promove o aumento da produção da proteína beta-amiloide (A β 42) através do aumento dos níveis da proteína precursora amiloide (APP), bem como da enzima beta-secretase (BACE-1), responsável pela clivagem de APP nos peptídeos beta-amiloides (PRASANTHI et al., 2009). Em fatias hipocâmpais de coelho foi observado um resultado semelhante, além da observação do aumento do peptídeo A β 40 e da fosforilação

da proteína tau, outro marcador neuropatológico da doença de Alzheimer (MARWARHA et al., 2010).

Tem sido postulado que o 27-OH estimula o tráfego de colesterol produzido pelos astrócitos para os neurônios, aumentando a concentração de colesterol na membrana plasmática e também a conversão do excesso de colesterol intracelular em 24-OH. Reforçando a ideia de que o 27-OH periférico interfere no metabolismo do colesterol no SNC, levando ao acúmulo da molécula em neurônios causando disfunção dessas células. (WANG et al., 2020a). Staurenghi e colaboradores demonstraram em cultura primária que oxisteróis promovem a ativação de astrócitos, aumentando a liberação de mediadores inflamatórios. Adicionalmente, foi demonstrada uma sinaptotoxicidade em consequência da ativação astrocitária induzida pelos oxisteróis (STAURENGHI et al., 2021).

De interesse para este trabalho, diversos estudos têm demonstrado ação dessas moléculas na memória. Animais com deleção da enzima CYP27A1 que produz o 27-OH, quando submetidos a uma dieta que induz aumento de colesterol, não apresentaram os prejuízos de memória como os observados em animais selvagens (MAIOLI et al., 2013). Em contrapartida, o aumento da expressão da CYP27A1 induz *per se* prejuízo na performance de camundongos em testes de memória (CEDAZO-MÍNGUEZ et al., 2017). As alterações que acompanham esses efeitos sobre a memória são principalmente alterações moleculares e morfológicas a nível sináptico (MERINO-SERRAIS et al., 2019). Uma descrição mais detalhada destas evidências científicas sobre os efeitos dos oxisteróis na memória pode ser visualizada na Tabela 4.

Tabela 4- Evidências obtidas em modelos animais genético dos efeitos dos oxisteróis na memória.

Modelo	Sexo	Característica	Observações comportamentais	Alterações moleculares	Referência
<i>Cyp46a1</i> superexpressão	Fêmeas e Machos	Aumento nos níveis de 24-OHC	Melhora da memória espacial no teste do labirinto aquático	Aumento nos níveis de proteínas sinápticas GluA1, PSD 95, sinapsina-1 e sinaptofisina no hipocampo	(MAIOLI et al., 2013)

<i>Cyp46a1</i> ^{-/-}	Macho	Redução significativa de 24-OHC	Prejuízo em memória espacial e associativa	Prejuízo da LTP	(KOTTI et al., 2006)
<i>Cyp27a1</i> <i>superexpressão</i>	Não descrito	Aumento nos níveis de 27-OHC	Prejuízo de memória	Diminuição da expressão de ARC e GLUT4 no hipocampo	(CEDAZO-MÍNGUEZ et al., 2017)
<i>Cyp27a1</i> ^{-/-}	Macho	Redução significativa de 27-OHC	A deleção do gene previne os prejuízos de memória induzidos por uma dieta rica em colesterol	A deleção do gene previne a redução da proteína ARC	(HEVERIN et al., 2015)

Busca realizada na base de dados Pubmed em 20/02/2021. A busca foi realizada utilizando as palavras-chave: *oxisterols+memory*. Foram incluídos estudos relevantes para esta tese.

Nota-se que a maior parte dos estudos (Tabela 4) utilizou apenas animais machos, e nenhum estudo realizado até o momento comparou a influência do sexo dos animais. Entretanto, evidências clínicas apontam que o metabolismo de oxisteróis é diferente entre homens e mulheres. Dzeletovic e colaboradores (1995) reportaram uma concentração mais alta de 27-OH no plasma de homens do que de mulheres. Além da diferença de concentração periférica desse metabólito, o 27-OH apresenta um maior influxo cerebral em homens do que em mulheres (BERTOLOTTI et al., 2012; DZELETOVIC et al., 1995; PARRADO-FERNANDEZ et al., 2020). Em humanos saudáveis, utilizando análise de espectrometria de massa, homens apresentam uma média mais elevada de 27-OH (0,2 µg/mL) e 25-OH (7,5 ng/mL) do que as mulheres (0,14 µg/mL e 6,4 ng/mL, respectivamente) (WUOLIKAINEN et al., 2014). Diante dessas observações em humanos, investigar tais diferenças sexuais em modelos animais, torna-se imperativo.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A HF consiste em um dos distúrbios metabólicos mais comuns em todo o mundo. Além do aumento da predisposição para doenças cardiovasculares, evidências clínicas apontam para os problemas neurológicos como consequência do quadro de HF, com destaque para os prejuízos de memória. Além da HF em particular, distúrbios no metabolismo do colesterol têm sido considerados como um gatilho para demência e a doença de Alzheimer. O metabólito oxidado do colesterol 27-OH representa uma possível conexão entre os efeitos deletérios no SNC em consequência dos altos níveis periféricos de colesterol, uma vez que este, ao contrário do colesterol, atravessa a BHE. Adicionalmente, estudos em humanos mostraram que o influxo do 27-OH para o cérebro difere significativamente entre homens e mulheres.

Corroborando os resultados em humanos, estudos pré-clínicos têm revelado prejuízos em processos de aprendizado e memória em modelos animais da HF. As alterações que acompanham este perfil comportamental estão principalmente relacionadas à ativação de vias inflamatórias e apoptóticas, com aumento da ativação astrocitária na região do hipocampo. A grande maioria dessas observações foi obtida em estudos utilizando roedores machos, desconsiderando a possibilidade da existência de particularidades sexuais.

Neste sentido, esta tese apresenta como hipótese a existência de dimorfismo sexual quanto ao impacto da hipercolesterolemia sobre os processos de memória e plasticidade sináptica e às alterações moleculares subjacentes em camundongos, sendo que a sinalização do 27-OH estaria envolvida nestas diferenças observadas entre machos e fêmeas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a existência de dimorfismo sexual quanto ao impacto da hipercolesterolemia sobre processos de memória e plasticidade sináptica hipocampal em camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas, bem como avaliar o envolvimento dos oxisteróis em tais parâmetros.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da deleção do receptor LDLr em camundongos machos e fêmeas, sobre:
 - i. Desempenho em testes de memórias dependentes do hipocampo;
 - ii. A plasticidade sináptica hipocampal;
 - iii. O imunoconteúdo de proteínas sinápticas no hipocampo;
 - iv. A ativação astrocitária no hipocampo;
 - v. Os níveis periféricos de 27-OH.
- Avaliar a influência da deleção do gene LDLr em cultura primária de neurônios sobre:
 - vi. A expressão de genes relacionados a proteínas plasmáticas.
- Avaliar os efeitos de altos níveis periféricos de 27-OH em camundongos machos e fêmeas Cyp27Tg sobre:
 - vii. A expressão de genes relacionados a síntese de colesterol no hipocampo e córtex;
 - viii. A expressão de genes relacionados ao metabolismo do colesterol no hipocampo e córtex;
 - ix. O imunoconteúdo de proteínas relacionadas a síntese de colesterol.
- Avaliar a influência do tratamento de cultura primária de neurônios com 27-OH sobre:
 - x. A expressão de genes relacionados a síntese de colesterol no SNC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e nocautes para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}), desenvolvidos previamente por Ishibashi e colaboradores em 1993 (ISHIBASHI et al., 1993), foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Brasil) e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica no Centro de Ciências Biológicas. Os progenitores foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA). Neste trabalho foram usados animais com idade entre 4 e 5 meses, machos e fêmeas, com peso aproximado de 25 g, os quais foram alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm – 4 animais por gaiola), com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (7:00 às 19:00 h), e com livre acesso à bebida e ração padrão. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC, protocolo 6725220321).

Em experimentos realizados no Instituto Karolinska foram também utilizados camundongos transgênicos machos e fêmeas da linhagem CYP27A1Tg que superexpressam a enzima CYP27A1, responsável por converter colesterol em 27-OH, com 4-5 meses de idade. Esses animais apresentam níveis 5-6 vezes maiores de 27-OH no soro e no cérebro em comparação a animais selvagens (CEDAZO-MÍNGUEZ et al., 2017). Como controle foram utilizados os animais da mesma ninhada sem a mutação (selvagens). Além disso, foram utilizados camundongos nocaute para a enzima CYP7B1 machos com 5 meses de idade. Esses animais apresentam uma redução significativa na produção de 7-HOCA acompanhada por um aumento de 3-4 vezes nos níveis de 27-OH e 25-OH (LI-HAWKINS et al., 2000). Todos os animais foram originados da linhagem C57BL/6 J. Os animais foram alimentados com dieta padrão e água *ad libitum*, alojados em grupos de 4-5 por caixa em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com a regulação Européia e aprovados pelo comitê de ética do Instituto Karolinska (número de permissão ética ID S33-13).

4.2 CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS CÓRTICO-HIPOCAMPAIS E SILENCIAMENTO DO LDLR

As culturas primárias de neurônios córtico-hipocampal foram preparadas a partir de cérebro de embriões (E18) C57Bl6 como previamente descrito (MATEOS et al., 2009). Para diminuir a expressão endógena do receptor LDLr foi utilizado RNA de interferência (siRNA, do inglês, *small interference RNA*) disponível comercialmente direcionado para diferentes regiões do gene do LDLr (ON-TARGETplus SMARTpool, Cat. No. L048572-00-0005, Dharmacon) e como reagente de transfecção Lipofectamina 3000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Após 1 e 7 dias *in vitro* (DIV), as culturas de neurônios cortico-hipocampais (70% de confluência) foram incubadas com 50 nM de siRNA para o gene LDLr e siRNA sem alvo específico por 48 horas e então coletadas para análises de qPCR. Os experimentos com cultura primária foram conduzidos a partir da aprovação do comitê de ética regional do Instituto Karolinska (Suécia).

4.3 DESENHOS EXPERIMENTAIS

Os desenhos experimentais foram elaborados com base nas perguntas experimentais descritas abaixo. As técnicas e protocolos escolhidos para responder tais perguntas estão descritos detalhadamente na sessão seguinte.

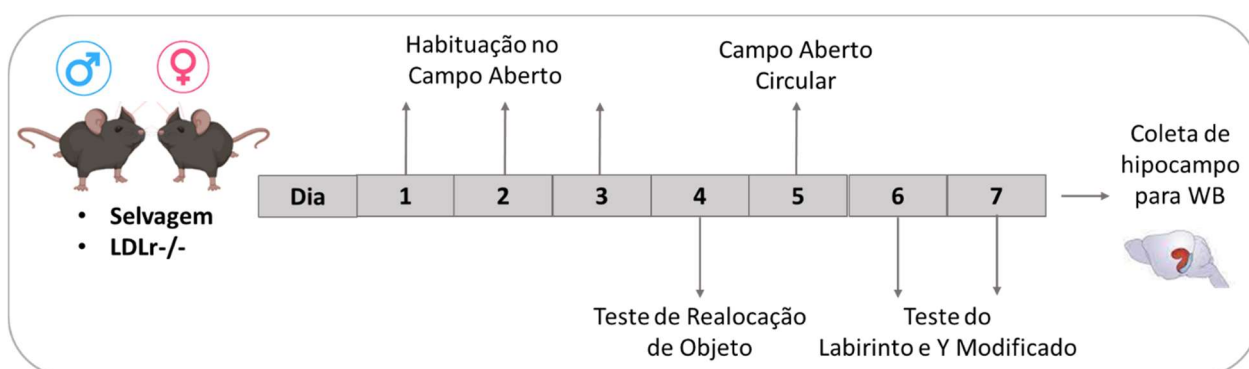
4.3.1 Pergunta experimental 1: Camundongos LDLr^{-/-} apresentam diferenças sexuais no desempenho de testes comportamentais de memória?

Com o objetivo de comparar o desempenho de camundongos machos e fêmeas LDLr^{-/-} em testes comportamentais para a avaliação de diferentes tipos de memórias, foram realizados dois protocolos experimentais. O primeiro protocolo foi proposto para avaliar o desempenho dos animais em tarefas de memória dependentes de hipocampo e consistiu em: 3 dias de habituação no aparato de campo aberto, seguido do teste de realocação de objeto, em seguida, os animais foram submetidos a avaliação locomotora no campo aberto circular e, por fim, ao teste do labirinto em Y modificado. Ao final do protocolo, o hipocampo foi

coletado para a realização da técnica de *Western blotting*. Um esquema representativo é ilustrado na Figura 7.

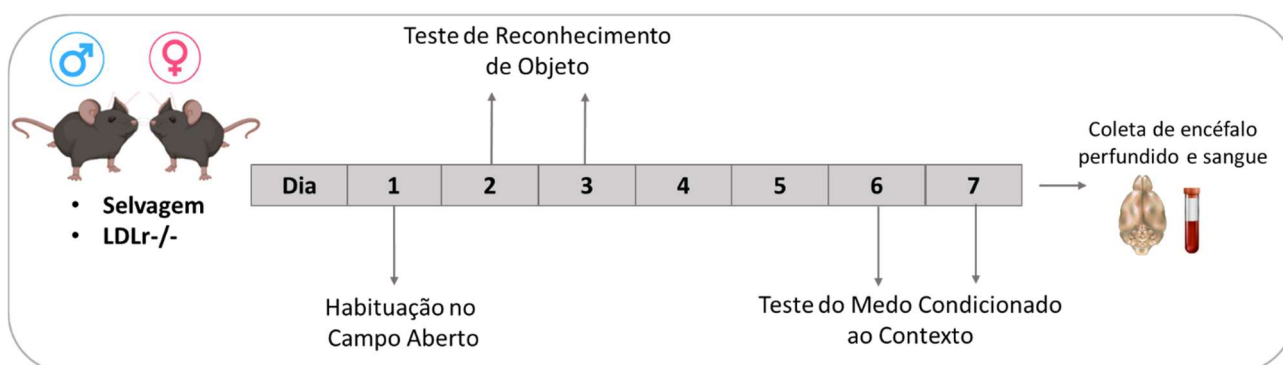
O segundo protocolo comportamental foi proposto para avaliar a memória de reconhecimento e a memória aversiva de longo prazo. Este protocolo consistiu em: habituar os animais no aparato do campo aberto no primeiro dia, em seguida os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objeto, após dois dias de intervalo, os animais foram submetidos ao teste do medo condicionado ao contexto. Por fim, os animais foram perfundidos com salina seguido de paraformaldeído e o encéfalo foi coletado para posterior realização de técnicas de imunofluorescência e coloração por hematoxilina eosina. Um esquema representativo deste desenho experimental é ilustrado na Figura 8. Os testes comportamentais foram realizados por ordem crescente de aversividade.

Figura 7. Esquema representativo do protocolo comportamental 1.



Legenda: WB: *Western blotting*.

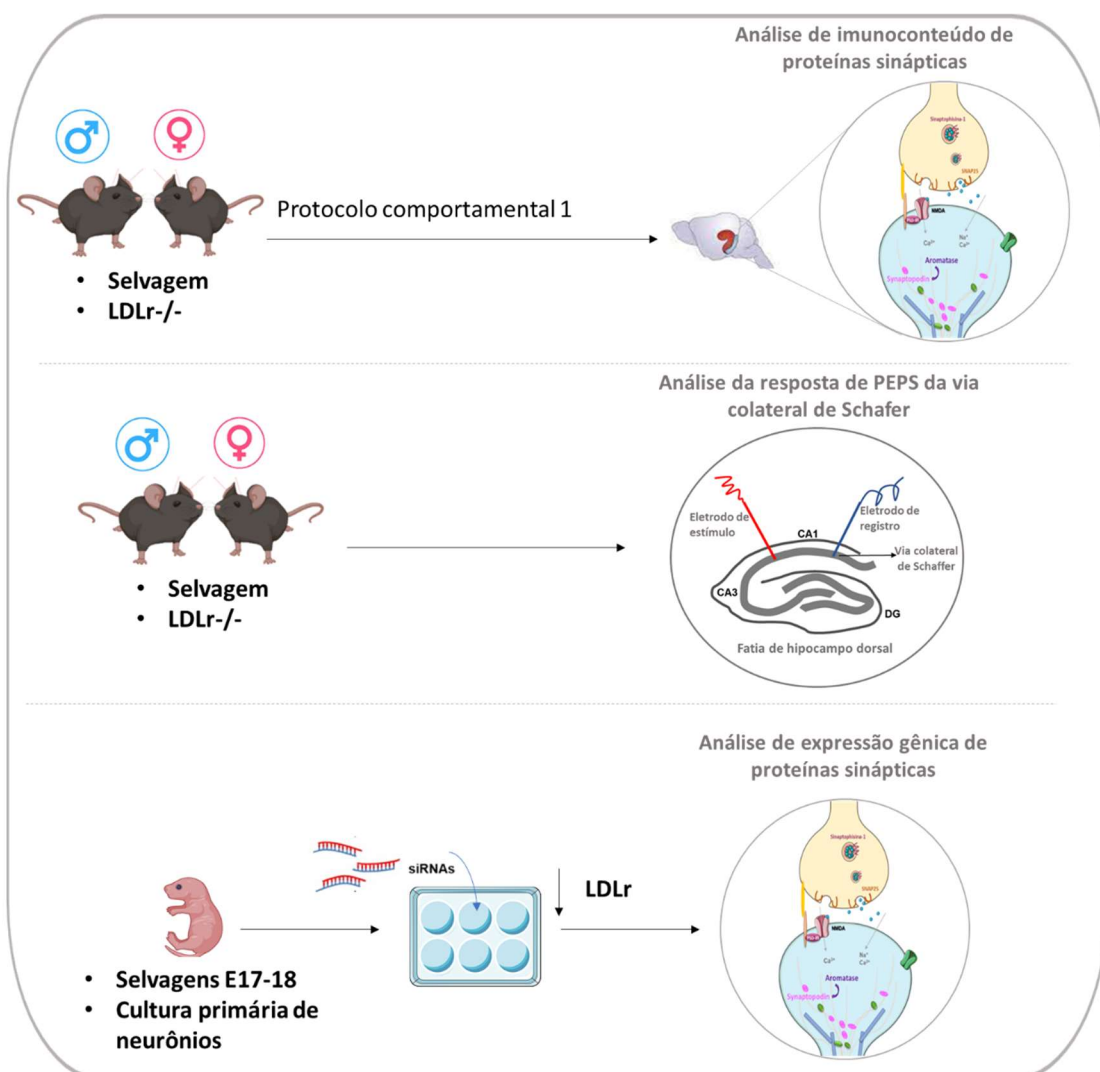
Figura 8. Esquema representativo do protocolo comportamental 2.



4.3.2 Pergunta experimental 2: A deleção do receptor LDL leva a redução da plasticidade hipocampal em camundongos machos e fêmeas?

Para responder tal pergunta, grupos independentes de animais C57Bl6 e LDLr^{-/-} machos e fêmeas foram destinados a análise de eletrofisiologia no hipocampo, onde um protocolo de estímulos de alta frequência foi aplicado e o potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) foi registrado. Além disso, o imunocontéudo de proteínas sinápticas foi mensurado no hipocampo de animais provenientes do protocolo comportamental 1. Por fim, utilizando a técnica de RNA de interferência em cultura primária de neurônios, foi testado *in vitro* o impacto da redução da expressão do LDLr sobre a expressão de genes que controlam a expressão de proteínas sinápticas. A Figura 9 ilustra um esquema representativo da avaliação do impacto da deleção do LDLr na plasticidade sináptica hipocampal.

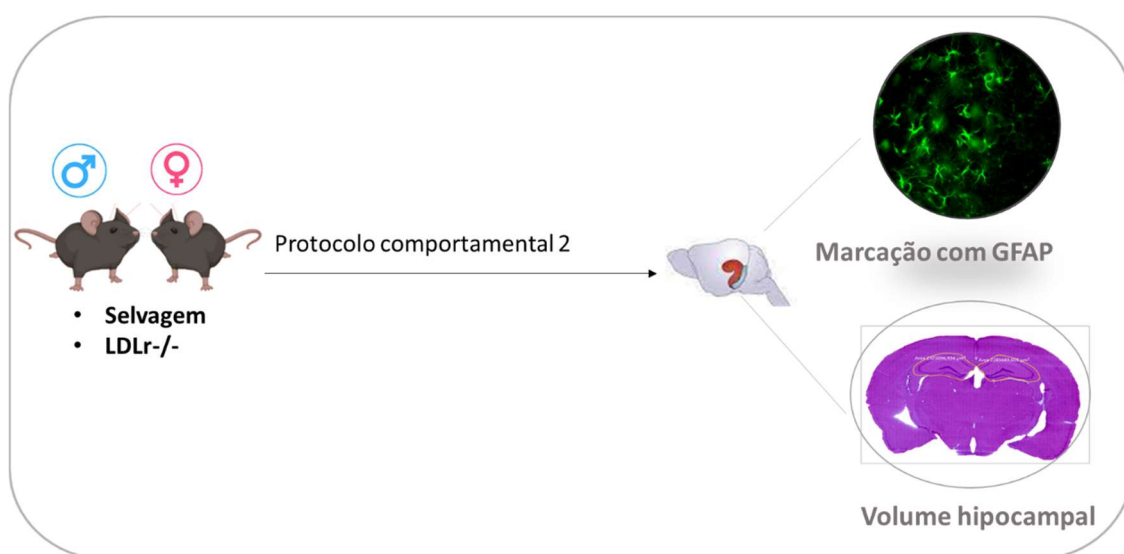
Figura 9. Esquema de experimentos utilizados para avaliação do PEPS hipocampal e imunocontéudo e expressão gênica de proteínas sinápticas.



4.3.3 Pergunta experimental 3: A ativação astrocitária e a atrofia hipocampal estão relacionadas com os prejuízos cognitivos observados em camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas?

Para responder esta questão foram realizadas análises histológicas da região do hipocampo, a imunomarcagem para GFAP (astroglíose) e coloração com hematoxilina eosina a partir dos animais que passaram pelo protocolo comportamental 2.

Figura 10. Esquema de experimentos utilizados para avaliação da astroglíose e volume hipocampal em camundongos C57Bl6 e LDLr^{-/-} machos e fêmeas.



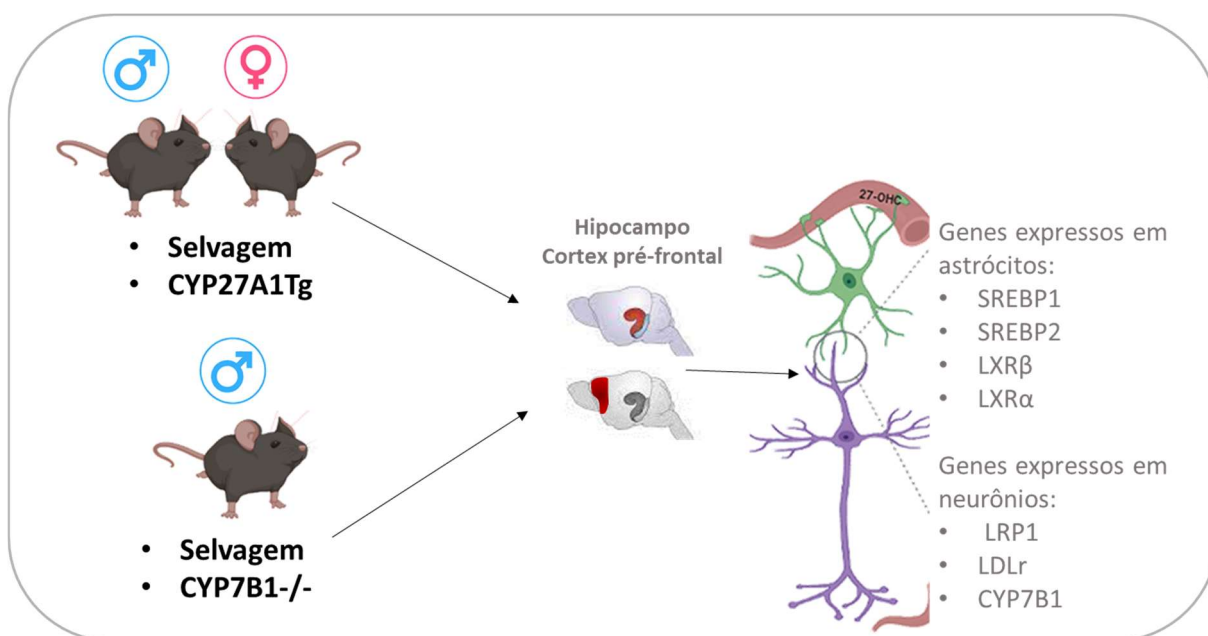
4.3.4 Pergunta experimental 4: O 27-hidroxicolesterol representa a conexão entre os altos níveis periféricos de colesterol e as alterações cerebrais e comportamentais observadas em camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas?

Para elucidar tal questão foi realizada a dosagem periférica do principal oxisterol periférico, o 27-OH, no plasma de animais C57Bl6 e LDLr^{-/-} machos e fêmeas através da técnica de Elisa.

4.3.5 Pergunta experimental 5: Os altos níveis circulantes de 27-hidroxicolesterol causa diferente impacto na homeostase cerebral do colesterol em camundongos machos e fêmeas?

Para elucidar tal questionamento, animais C57Bl6 e CYP27A1Tg machos e fêmeas foram sacrificados e regiões cerebrais relacionadas ao processamento de memórias, como o hipocampo e o córtex pré-frontal, foram dissecadas para análise posterior. Foi avaliada a regulação de genes que estão envolvidos na homeostase cerebral do colesterol nas regiões cerebrais citadas. Adicionalmente, a fim de investigar se o metabólito cerebral do 27-OH, o 7-HOCA, poderia ser o mediador envolvido nos efeitos observados, foram também utilizados animais machos nocaute para a enzima CYP7B1. Um esquema representativo dos experimentos utilizados para a avaliação da influência do aumento da produção de 27-OH periférico sobre o metabolismo cerebral de colesterol está ilustrado abaixo (Figura 11).

Figura 11. Esquema de experimentos utilizados para avaliação dos genes relacionados à homeostase cerebral em camundongos com expressão aumentada de 27-OH.



4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Uma hora antes de todos os testes comportamentais, os animais foram aclimatados na sala de experimentação comportamental. Os testes comportamentais foram realizados no

período claro entre 9:00 e 17:00 h. Ao final do teste de cada animal, os aparatos foram limpos com solução de etanol 10%. Todos os testes comportamentais foram gravados por um sistema de câmeras e posteriormente analisados. Os testes para avaliação de locomoção foram analisados com o software *Any maze*®, e os parâmetros de memória foram quantificados manualmente.

4.4.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora dos animais. Neste trabalho utilizamos: i) o campo aberto quadrado, o qual consiste em uma caixa de acrílico transparente (30 x 40 x 40 cm), sem cobertura e com assoalho cinza, ii) o campo aberto circular, o qual consiste em uma base (50 x 50 cm), com delimitação de 30 cm de diâmetro e paredes transparentes de acrílico de 30 cm. Em ambos, cada camundongo foi colocado no centro da arena, permitindo sua movimentação livremente no aparato durante o período de 5 minutos. A movimentação do animal no aparato foi gravada com um sistema de câmeras e a distância total percorrida foi medida com os auxílio do software *Anymaze*®.

4.4.2 Teste de realocação de objeto

Este teste baseia-se na tendência espontânea de roedores, previamente expostos a dois objetos idênticos, a posteriormente explorar um dos objetos (realocado para uma nova localização espacial) por um tempo maior do que o objeto não deslocado. É um teste utilizado na avaliação de memórias dependentes do hipocampo (ASSINI; DUZZIONI; TAKAHASHI, 2009; FERGUSON; SAPOLSKY, 2007). O aparato utilizado para o teste da realocação de objeto é o mesmo utilizado no teste do campo aberto. Os objetos consistiram em peças de Lego® montadas de maneira idêntica (3 cm lado x 4,5 cm lado x 4,5 cm altura) os quais foram colados no chão de maneira equidistante (7 cm) de dois lados do campo aberto. O procedimento consistiu em três sessões de habituação ao campo aberto em dias consecutivos com duração de 5 minutos, quando o animal foi colocado no aparato para explorá-lo livremente. Após 24 horas, os animais foram reexpostos ao campo aberto por 5 minutos, contudo nesta apresentação (treino) dois objetos idênticos foram apresentados aos animais. Neste momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos

colocados no aparato. Após a sessão de treino, os animais retornaram as suas caixas moradia e aguardaram até o momento do teste, 180 minutos após o treino. Na sessão de teste um dos objetos foi alterado de posição no aparato. Neste momento registrou-se novamente o tempo de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou se aproximar do objeto a menos de 1 cm de distância. Os tempos de exploração dos objetos nas sessões de treino e teste foram utilizados para o cálculo do índice de localização de objetos, usado como parâmetro de memória. Foi calculado o índice de discriminação - $[t(s) A2 \times 100 / \{t(s) A2 + t(s) A1\}]$, onde A2 é o tempo gasto pelos animais explorando o objeto realocado e A1 é o tempo gasto pelos animais explorando o objeto não realocado (ASSINI et al., 2009).

4.4.3 Teste do labirinto em Y modificado

Este teste baseia-se na preferência inata dos roedores em explorar ambientes novos. O aparato do labirinto em Y consiste em três braços iguais, elevados a 50 cm do chão, feito de madeira coberto com plástico impermeável cinza. Os três braços são randomicamente denominados: “início”, no qual o animal é colocado e inicia a exploração, “outro” braço, que se mantém aberto durante as duas sessões, e o braço “novo”, o qual é mantido fechado durante a sessão de treino e aberto somente durante a sessão de teste. O teste consistiu em duas sessões, treino e teste, com intervalo de 120 minutos entre as sessões. Durante a primeira sessão, o animal pode explorar livremente os dois braços abertos (“início” e o “outro”) por 8 minutos, sendo que o braço “novo” permaneceu fechado. Após o intervalo de 120 minutos, uma segunda sessão foi executada sendo que nesta os três braços estavam abertos. Novamente, o animal pode explorar livremente o aparato. O número de entradas, o tempo gasto em cada braço e em ambas as sessões foram mensurados. A entrada em um braço foi considerada quando o animal entrou no braço com as quatro patas. Os dados foram calculados e expressos como percentual de tempo ou número de entradas no braço novo $(T_{novo} \times 100) / (Total)$, onde o T_{novo} é o tempo/número de entradas no braço novo, e o Total é a soma de tempo/entradas nos três braços (KASTER et al., 2015; MATHEUS et al., 2016).

4.4.4 Teste de reconhecimento de objeto

É um teste utilizado para avaliação da memória de reconhecimento de objetos. No dia anterior ao teste, os animais foram habituados por 5 minutos no aparato do campo aberto. Os animais foram submetidos a duas sessões, na primeira (treino - aquisição), os animais foram expostos a dois objetos idênticos no campo aberto e sua atividade exploratória foi registrada. Após 90 minutos, a segunda sessão (teste) foi realizada, onde os animais foram expostos a dois objetos não similares, um objeto familiar do primeiro ensaio e um objeto novo. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração dos objetos: cheirar, tocar ou se aproximar do objeto a menos de 1 cm de distância. Foi calculado o índice de discriminação - $[t(s) A2 \times 100 / \{t(s) A2 + t(s) A1\}]$, onde A2 é o tempo gasto pelos animais explorando o objeto novo e A1 é o tempo gasto pelos animais explorando o objeto conhecido.

4.4.5 Medo condicionado ao contexto

O condicionamento de medo contextual foi realizado em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm) com paredes laterais de alumínio, parede frontal e teto de acrílico, e piso gradeado (barras de aço inoxidável de 3 mm de diâmetro, espaçadas por 9 mm de distância) conectado a um gerador de choques elétricos (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). O teste consistiu em duas sessões, com intervalo de 24 horas. A primeira sessão (treino-contextualização) consistiu em colocar os animais dentro da caixa para explorar por 4 minutos. Aos 3 minutos, um choque de 0,4 mA com duração de 3 segundos foi aplicado e aos 3:30 minutos o mesmo estímulo foi repetido. Aos 4 minutos o animal foi retirado do aparato e retornou a sua caixa moradia. No dia seguinte, o animal foi novamente colocado na mesma caixa por 4 minutos (teste), sem a aplicação de nenhum choque, e o comportamento de congelamento (completa imobilidade do animal) foi quantificado como um parâmetro de memória (FANSELOW, 1980; MACHADO et al., 2018).

4.5 EXPERIMENTOS EX VIVO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.5.1 Eletrofisiologia

Os registros de eletrofisiologia foram realizados de acordo com trabalhos prévios (BORTOLOTTI et al., 2011). Camundongos machos e fêmeas da linhagem C57Bl6 e LDLr^{-/-} foram rapidamente decapitados. Os encéfalos foram rapidamente removidos e mantidos em uma solução padrão de fluido cerebrospinal artificial (aCSF) gaseado com uma mistura de gases de 95% de O₂ e 5% de CO₂, contendo 124 mM de NaCl, 4,5 mM de KCl, 2mM de CaCl₂, 1mM de MgCl₂, 26 mM de NaHCO₃, 1,2 mM de NaH₂PO₄ e 10 mM de D-glicose e mantida em gelo. Fatias do hipocampo com 400 µm de espessura foram obtidas utilizando um vibrátomo manual (*World Precision Instruments*, Reino Unido) e mantidas em solução aCSF oxigenada por pelo menos 60 minutos para estabilização antes de iniciar o protocolo. Em seguida, individualmente, as fatias foram transferidas para uma câmara de registros e perfundidas com aCSF oxigenado a 30°C em um fluxo de 2 mL/min. Eletrodos bipolares de níquel-cromo foram posicionados nas fibras colaterais de Schaffer (região CA1 do hipocampo) e os estímulos foram entregues por meio de uma unidade de isolamento de estímulos (A395, *WPI instruments*, Reino Unido) a uma frequência de 0,06 Hz. Microeletrodos de vidro (2-8 MΩ) preenchidos com aCSF foram usados para registrar os PEPS no *stratum radiatum* da região CA1 do hipocampo. Os registros foram obtidos utilizando um amplificador MutilClamp700B (*Molecular Devices*, EUA) e digitalizados utilizando uma placa de aquisição de dados PCI (*National Instruments*, EUA).

Primeiramente, foi realizada uma curva de *input-output* (i/o) para avaliar o limiar para a resposta máxima, o estímulo escolhido para trabalhar foi ajustado para evocar PEPS com metade da amplitude máxima (50%). Após 20 minutos de registros basais, um estímulo tetânico (100Hz, 1 s) foi usado para induzir a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*). Após o estímulo, os PEPS foram registrados por mais 60 minutos. O *slope* e a amplitude média dos PEPS durante os registros basais foram estabelecidos como 100%, e as mudanças nos PEPS após o estímulo foram expressos como percentual de diferença em relação ao basal.

4.5.2 Western blotting

A técnica de *Western Blotting* foi utilizada para quantificação das proteínas PSD95, SNAP25, sinaptopodina, aromatase, proteínas envolvidas na manutenção e plasticidade sináptica, e também do LDLr, no hipocampo dos animais. Os animais foram anestesiados com isoflurano e rapidamente ortotansados por decapitação. Os hipocampus dos animais foram dissecados a 4°C, colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a realização das análises. Para preparo das amostras, os tecidos foram homogeneizados mecanicamente em 300 µL do tampão de homogeneização (Tris 50 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; NaF 100 mM; PMSF 0,1 mM; Na₃VO₄ 2 mM; Triton X-100 1%; glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases, Sigma-Aldrich, EUA). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min a 4°C) para eliminar os restos celulares, e os sobrenadantes foram diluídos 1/1 (v/v) em solução contendo Tris 100 mM, pH 6,8; EDTA 4 mM e SDS 8% e aquecidos a 100°C por 5 minutos. A seguir, foram adicionados nas amostras o tampão de diluição (Tris 100 mM, glicerol 40% e azul de bromofenol, pH 6,8) 25:100 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%). A dosagem de proteínas foi determinada através do método descrito por Peterson (PETERSON, 1977).

As amostras de hipocampo obtidas do protocolo experimental 1 foram homogeneizadas em um tampão 50 mM de Tris, contendo 1 mM de Na₃VO₄, 1% de triton X-100, 10% de glicerol 100% e coquetel inibidor de proteases (*Sigma-Aldrich*, EUA). Para eliminação de resíduos, as amostras foram centrifugadas (3.000 rpm por 10 min a 4°C). Para a eletroforese, 50 µg de proteína total em tampão composto por ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (1mM), 100 mM de fluoreto de sódio (NaF), 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 2 mM de ortovanadato de sódio foram separados em gel de eletroforese composto por 12% de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno, que foi bloqueada com uma solução de albumina 5%. Após as devidas lavagens com tampão Tris 10 mM, 0,075% de Tween-20 (TBST), as membranas foram incubadas a 4°C durante a noite com os seguintes anticorpos primários: anti-PSD95 (Abcam, 1:1000, ab2723), anti-SNAP25 (Abcam, 1:500, ab41455), anti-sinaptopodina (Sigma, 1:500, S9442) anti-aromatase (Sigma, 1:200, SAB4500606), anti-LDLr (Abcam, 1:500, ab52818). Na sequência, as membranas foram incubadas com os seus respectivos anticorpos secundários (Licor, 1:1000, IgG IRDye® 800CW ou 680CW) por 2 horas em temperatura ambiente. Para controle de carregamento, utilizou-se a detecção da proteína β-actina ou β-

tubulina. A densidade óptica (D.O.) das bandas detectadas foi obtida através do programa ImageJ. Os valores apresentados foram expressos como % do controle, derivados da divisão da D.O. da banda da proteína de interesse pela respectiva D.O. da banda de β -actina ou β -tubulina.

4.5.3 Dosagem de colesterol total e 27-OH

A dosagem de colesterol total foi realizada pelo método colorimétrico utilizando kit comercial *LabTest*®. O ensaio de Elisa (do inglês, *Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*), foi realizado utilizando kit comercial *Abbexa*®. O teste é baseado em um ensaio competitivo, a concentração de 27-OH foi calculada baseada na curva padrão fornecida pelo fabricante.

4.5.4 PCR quantitativo

Após disseção do hipocampo e córtex cerebral, as amostras foram homogeneizadas em água miliQ contendo inibidores de proteases e fosfatases. Posteriormente, o RNA foi extraído utilizando um kit comercial (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante. Os ensaios de amplificação de transcriptase reversa e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foram realizados usando *primers* específicos para os genes alvo (PSD95, SNAP25, Arc, LDLr, SREBP1, SREBP2, LXR β , LXR α , LRP1 e CYP7B1, Life Technologies). O número de cópias do mRNA de todos os alvos foi ajustada pelo número de cópias do mRNA do GAPDH e os valores foram calculados em relação aos respectivos controles (definido como 100%).

4.6 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

4.6.1 Perfusão

Logo após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 40% e submetidos à perfusão cardíaca com solução salina 0,9%, seguido

de solução de paraformaldeído 4% (PFA). Em seguida, o encéfalo foi removido da calota craniana (GIL-MOHAPÉL et al., 2013; PAZINI et al., 2016a).

4.6.2 Processamento do Tecido

Após serem removidos, os encéfalos foram mantidos por 24 horas em solução PFA 4% e então transferidos para uma solução de sacarose 30%. Após a saturação do tecido em sacarose, cortes coronais seriados com espessura de 30 μm foram obtidos utilizando o Vibrátomo (*Series®* 1000, St. Louis, MO, USA). As fatias foram coletadas em 1/6 séries e armazenadas em solução tampão fosfato (PBS) contendo 0,5% de azida sódica e mantidas em temperatura de 4°C.

4.6.3 Imunofluorescência para GFAP

A densidade da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um marcador astrocitário, foi avaliada através do ensaio de imunofluorescência. Os cortes da região do hipocampo foram primeiramente bloqueados com 5% de albumina, diluído em PBS 0,1 M contendo 2% de Triton X-100, durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados durante a noite a 4°C com o anticorpo de coelho anti-GFAP (Abcam, 1:300, Ab7260), em 1% de albumina diluído em PBS 0,1 M contendo 0,5% de Triton X-100. Após três lavagens em PBS 0,1 M, os cortes de tecido foram incubados com o anticorpo anti-coelho Alexa fluor 488 (Invitrogen, 1:1000, A32731) 1% de albumina em PBS 0,1 M contendo 0,5% de Triton X-100, durante 2 horas à temperatura ambiente, protegidos da luz. Os cortes foram lavados três vezes com PBS 0,1 M e, então, incubados com DAPI 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS 0,1 M durante 10 minutos. Por fim, os cortes foram novamente lavados três vezes com PBS 0,1 M e montados em lâminas com meio de montagem ProLong Gold Antifade cobertos com lamínulas. As imagens dos cortes de hipocampo foram capturadas em um microscópio confocal Orion e examinadas com o software ImageJ.

4.6.4 Coloração hematoxilina-eosina e avaliação do volume hipocampal

A análise do volume hipocampal foi realizada utilizando fatias dessa região coradas com hematoxilina-eosina (HE). Após montagem das fatias em lâminas gelatinizadas, essas foram submetidas a dois banhos de xilol puro por 10 minutos, seguidos de sucessivos banhos

de 5 minutos de álcool em concentração decrescente (100%-50%) e posterior hidratação das amostras com água. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 5 minutos com o corante Hematoxilina de Meyer, seguida de lavagem com água corrente e incubação de 5 minutos com Eosina amarelada, seguida de lavagem com água corrente. Por fim, sucessivas desidratações das amostras com incubações de 2-3 minutos com álcool e xilol foram executadas. Após o protocolo de coloração, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e a lamínula foi colocada utilizando como o meio de montagem o Entelan. As imagens foram capturadas com um escaneador de lâminas ZEISS Axio Scan.Z1 (Jena, Alemanha), equipado com objetivas de 2,5x, 10x, 20x e 40x, com auxílio do programa ZEN Wildfield 2012 Blue Edition. A área da formação hipocampal foi medida em cada seção coronal usando o princípio de Cavalieri. O volume foi estimado utilizando a seguinte fórmula: $\Sigma A \times T \times I$, onde ΣA é a soma das áreas de cada região de interesse (hipocampo total), T é a espessura da seção (30 μm), e I é o número de intervalos de seção.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

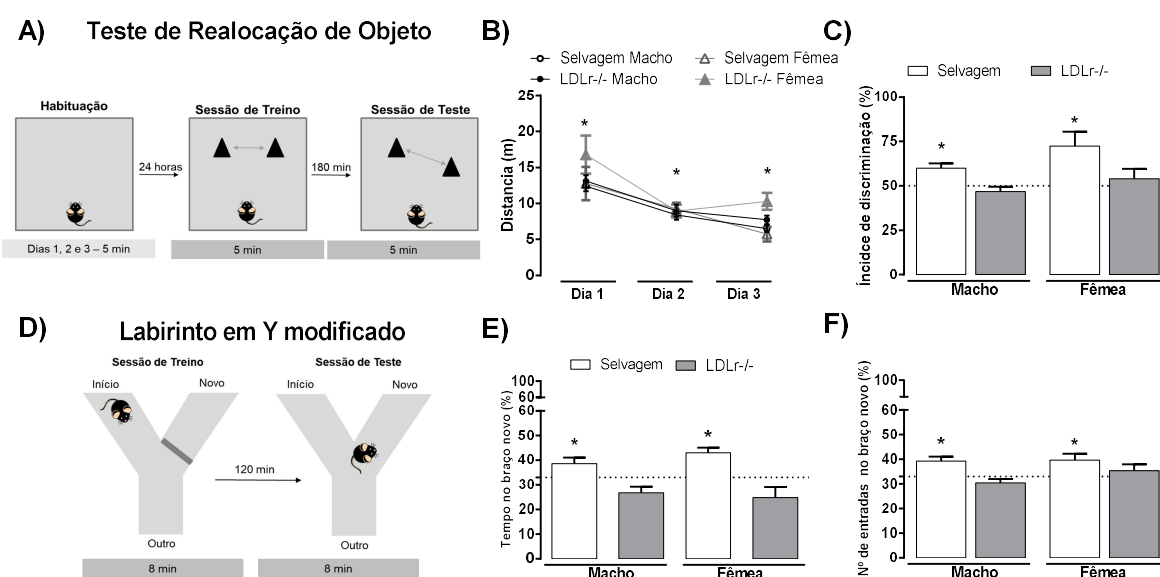
Os dados foram analisados utilizando o software STATISTICA 7.0. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados passaram pelo teste de normalidade de Grubb's e todos apresentaram uma distribuição normal ($p > 0,05$). A significância estatística foi determinada utilizando o teste T de Student para amostras independentes (nos testes de labirinto em Y modificado e teste de reconhecimento do objeto) ou análise de variância (ANOVA) de duas vias quando comparando grupos (campo aberto, *Western Blotting*, PCR). Quando analisado apenas um fator experimental (genótipo ou cultura celular), ANOVA de uma via foi aplicada. Quando o animal foi exposto ao mesmo contexto mais de uma vez, ANOVA com medidas repetidas foi utilizada (campo aberto com consecutivas exposições). Quando adequado, comparação entre múltiplos grupos foi realizada através do teste post-hoc de Newman-Keuls. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 PERGUNTA EXPERIMENTAL 1: CAMUNDONGOS LDLR^{-/-} APRESENTAM DIFERENÇAS SEXUAIS NO DESEMPENHO DE TESTES COMPORTAMENTAIS DE MEMÓRIA?

Como primeira etapa neste estudo, foi avaliado o desempenho de camundongos LDLR^{-/-} machos e fêmeas em diferentes testes comportamentais que avaliam memórias dependentes do hipocampo. A Figura 12 apresenta os efeitos da HF sobre a memória espacial, avaliada através dos testes de realocação de objeto e labirinto em Y modificado (Figura 12A e 12B, respectivamente). Foi observado que camundongos LDLR^{-/-} machos e fêmeas apresentaram prejuízos na tarefa de reconhecer o objeto realocado (Figura 12 C) e também o braço novo (Figura 12 E e F), indicando um prejuízo na memória espacial desses animais. O teste T de Student foi utilizado para a análise dos resultados do teste de realocação do objeto e labirinto em Y modificado para determinar se o índice de localização e a porcentagem de exploração diferiam significativamente de um valor teórico de 50% e 30%, respectivamente. A ANOVA com medidas repetidas indicou um efeito significativo do fator repetição na locomoção dos animais no campo aberto [$F(2,42)=37,617$, $p<0,0001$], indicando uma habituação ao aparato.

Figura 12. Efeitos da deleção do LDLr sobre a memória dependente do hipocampo em camundongos machos e fêmeas.

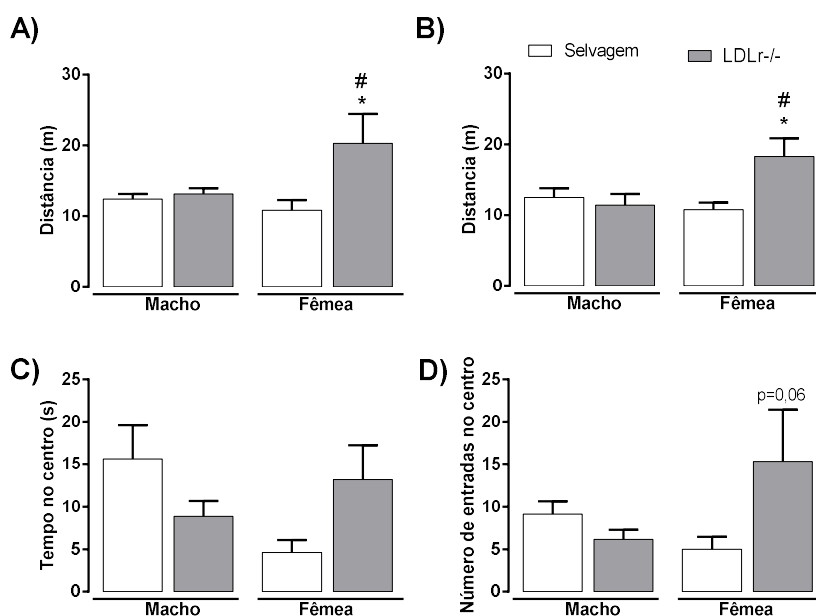


Legenda: Para a avaliação da memória espacial dos camundongos C57Bl6 e LDLR^{-/-} machos e fêmeas foi realizado o teste de realocação de objeto (A-C) e o teste do labirinto em Y modificado (D-F). Os valores estão

expressos em média + erro padrão da média (8-12 animais/grupo). * $p \leq 0,05$ fator tempo (B), * $p \leq 0,05$ versus 50% (C), * $p \leq 0,05$ 33% (E e F).

Nesta primeira bateria de testes comportamentais foi avaliada também a locomoção dos animais no teste do campo aberto utilizando os aparatos quadrangular e circular. A Figura 13A apresenta o perfil locomotor avaliado no primeiro dia de habituação para o teste de realocação de objeto no campo aberto quadrado, enquanto a Figura 13B representa a locomoção avaliada no campo aberto circular. Neste último, o tempo no centro (Figura 13C) e número de entradas no centro (Figura 13D) foram também mensurados. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo da interação genótipo vs. sexo na distância percorrida no aparato quadrado [$F(1, 35)=4,1970$; $p=0,04805$] e no aparato circular [$F(1, 28)=5,6242$; $p=0,02483$], e uma tendência no número de entradas no centro [$F(1, 30)=3,6352$; $p=0,06619$]. Posteriormente, o teste pos-hoc de Newman-Keuls revelou que apenas as fêmeas LDLr-/- apresentaram aumento significativo na distância percorrida ($p < 0,05$), o que também levou a uma tendência ao aumento no número de entradas no centro ($p = 0,06$).

Figura 13. Efeitos da deleção do LDLr sobre a atividade locomotora em camundongos machos e fêmeas.



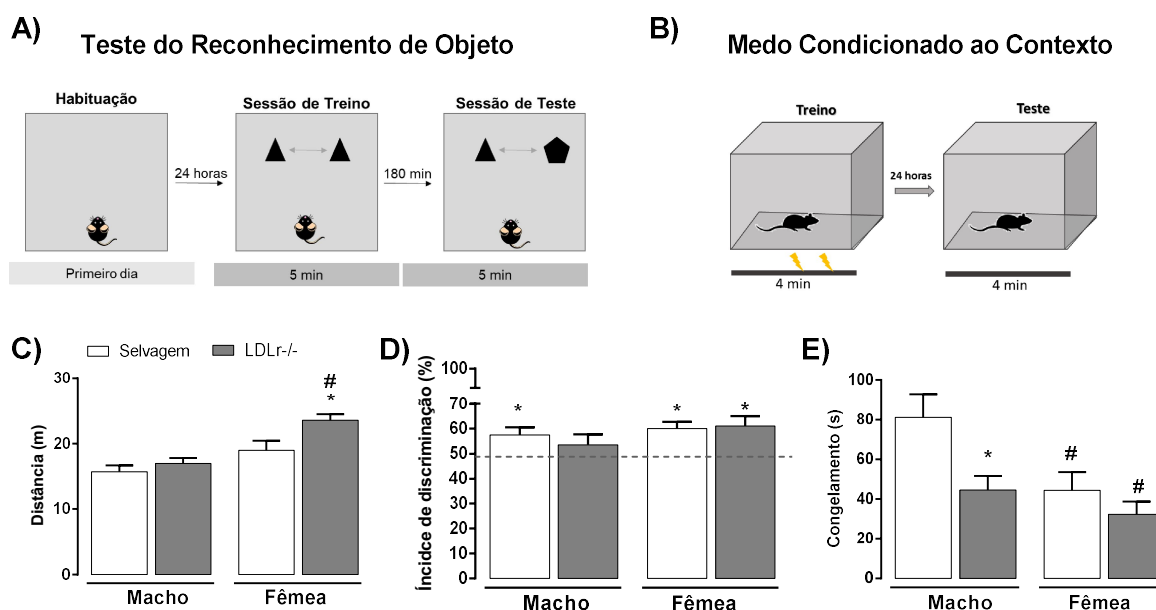
Legenda: Para a avaliação da atividade locomotora dos animais C57Bl6 e LDLr-/- machos e fêmeas foi realizado o teste do campo aberto, onde foi avaliado a distância percorrida no aparato quadrado (A) e no aparato circular (B), assim como o tempo gasto (C) e o número de entradas (D) no centro do aparato. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (8-12 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem do mesmo sexo. # $p < 0,05$ comparado com camundongos LDLr-/- do outro sexo.

No segundo protocolo comportamental foi avaliado o desempenho dos animais no teste de realocação de objeto e no teste do medo condicionado ao contexto. A figura 14 ilustra os resultados obtidos no teste de reconhecimento de objeto e no teste do medo condicionado ao contexto (Figura 14A e B, respectivamente).

Na habituação ao aparato do campo aberto o mesmo perfil hiperlocomotor observado anteriormente foi reproduzido em camundongos LDLr^{-/-} fêmeas (Figura 14C). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo dos fatores genótipo [$F(1, 40)=7,4668$; $p=0,00931$] e sexo [$F(1, 40)=21,131$; $p=0,00004$] na atividade locomotora do campo aberto. Posteriormente, o post-hoc Newman Keuls revelou aumento significativo da locomoção no grupo LDLr^{-/-} fêmeas ($p<0,05$).

Para avaliação da memória de reconhecimento (Figura 14D) o teste T de Student foi utilizado para determinar se o índice de localização e a porcentagem de exploração diferiam significativamente do valor teórico de 50%. Os camundongos LDLr^{-/-} machos não foram capazes de reconhecer o objeto novo na sessão teste, enquanto que as fêmeas do mesmo genótipo não apresentaram esse prejuízo. Quando foi avaliada a memória aversiva de longa duração (Figura 14E), a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo dos fatores genótipo [$F(1, 40)=7,8783$; $p=0,00769$] e sexo [$F(1, 40)=8,0208$; $p=0,00721$] sobre o tempo de congelamento na sessão de teste. O teste pos-hoc de Newman-Keuls revelou que camundongos machos LDLr^{-/-} apresentaram redução significativa do tempo de congelamento em comparação aos machos selvagens e em comparação às fêmeas LDLr^{-/-} ($p<0,05$). Adicionalmente, foram também observadas diferenças significativas no tempo de congelamento entre os camundongos C57BL6 machos e fêmeas ($p<0,05$).

Figura 14. Efeitos da deleção do LDLr sobre as memórias de reconhecimento e aversiva de longo prazo em camundongos machos e fêmeas.



Legenda: Para avaliação da memória de reconhecimento e a memória aversiva de longo prazo dos animais C57Bl6 e LDLr-/- machos e fêmeas foram realizados os testes de reconhecimento de objeto (A, C e D) e medo condicionado ao contexto (B e E). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (10-12 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem do mesmo sexo. # $p < 0,05$ comparado com camundongos LDLr-/- do outro sexo. * $p < 0,05$ versus 50%.

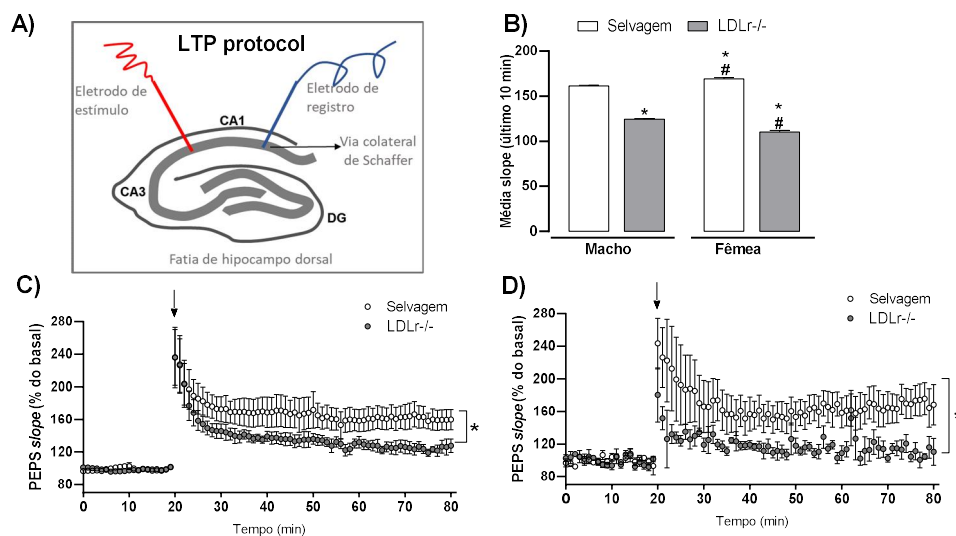
5.2 PERGUNTA EXPERIMENTAL 2: A DELEÇÃO DO RECEPTOR LDL LEVA A REDUÇÃO DA PLASTICIDADE HIPOCAMPAL EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS?

Para avaliar se os prejuízos de memória dependente de hipocampo observados poderiam ser causados por um prejuízo funcional nesta estrutura, primeiramente foi realizado o protocolo de eletrofisiologia. Um estímulo de alta frequência foi aplicado na via colateral de Schaffer, na sub-região CA1 do hipocampo dorsal (Figura 15A), e PEPS foi claramente reduzido em animais LDLr-/- machos (Figura 15C) e fêmeas (Figura 15D) quando comparado aos animais selvagens do mesmo sexo. O teste T de Student revelou que *slope* do PEPS foi significativamente reduzido em camundongos LDLr-/-, tanto em machos (C) quanto em fêmeas (D) ($p < 0,0001$, para ambos).

Ao avaliar a média de resposta de todos os grupos, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo no fator interação genótipo vs. sexo [$F(1, 40) = 69,464$; $p < 0,00001$]. Posteriormente, o teste pos-hoc de Newman Keuls indicou uma diferença sexual tanto entre os animais selvagens quanto entre os animais LDLr-/-, sendo que as fêmeas selvagens

apresentaram aumento do PEPS quando comparada aos machos selvagens ($p < 0,05$), enquanto que nas fêmeas LDLr-/- a resposta está significativamente reduzida em relação aos machos do mesmo genótipo ($p < 0,05$) (Figura 15B).

Figura 15. Efeitos da HF sobre a resposta excitatória pós-sináptica no hipocampo de camundongos machos e fêmeas.

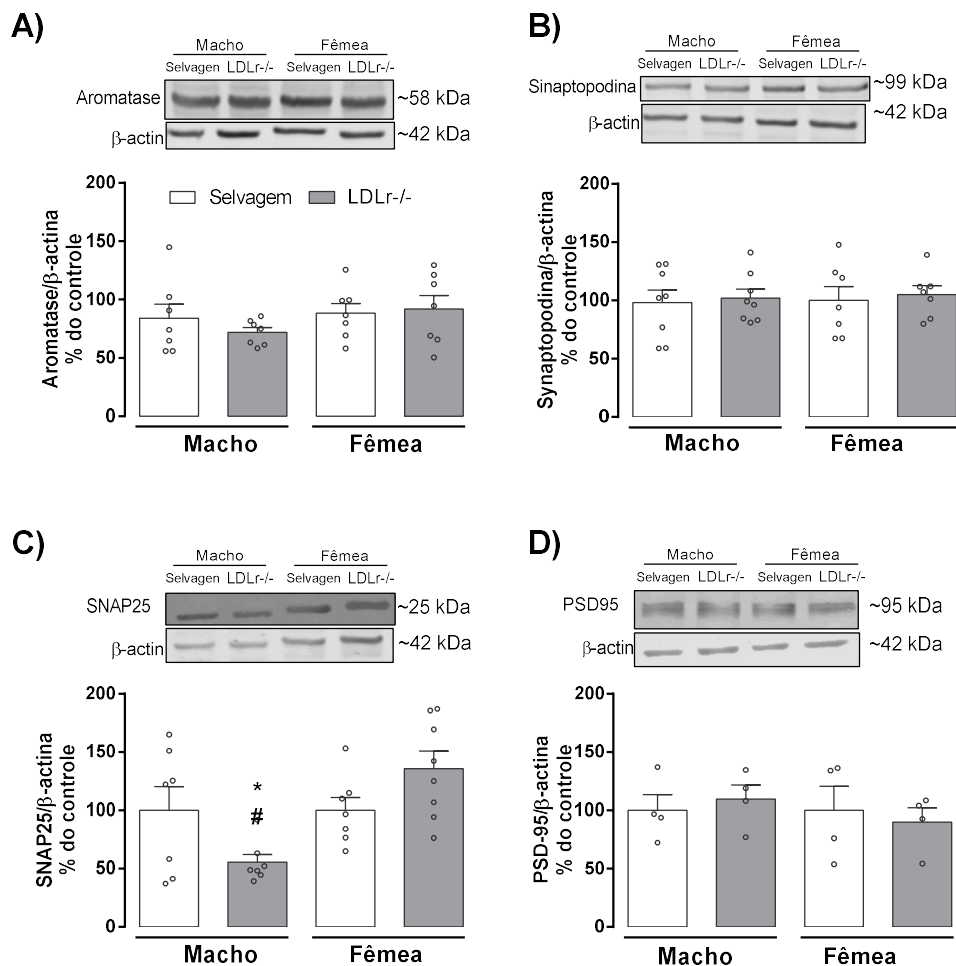


Legenda: Para avaliação funcional do hipocampo dos animais C57Bl6 e LDLr-/- machos e fêmeas foi aplicado o protocolo de eletrofisiologia (A). A média do *slope* dos 10 últimos minutos de registro (B) foi utilizada para comparar todos os grupos. O *slope* do PEPS foi significativamente reduzido tanto em machos (C) quanto em fêmeas (D). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 5$ animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem do mesmo sexo. # $p < 0,05$ comparado com camundongos LDLr-/- do outro sexo.

Além da avaliação funcional do hipocampo, foi avaliado o imunocontéudo de proteínas sinápticas envolvidas com a LTP, ilustradas na figura 16. A ANOVA de duas vias indicou ausência efeito (fatores isoladamente ou interação genótipo vs. sexo) no imunocontéudo de sinaptopodina [$F(1,28) = 0,00550$; $p = 0,94139$, Figura 16B] ou de sua enzima regulatória aromatase [$F(1,24) = 0,67943$; $p = 0,41790$, Figura 16A]. Quando foi avaliada a proteína pós-sináptica PSD95 também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos [$F(1, 12) = 0,42735$; $p = 0,52562$, Figura 16D]. Por outro lado, a ANOVA indicou um efeito significativo para a interação sexo vs. genótipo no imunocontéudo da proteína pré-sináptica SNAP25 [$F(1,26) = 8,9232$; $p = 0,006607$, Figura 16C]. Posteriormente, o teste pos-hoc de Neuman Keuls revelou uma redução significativa neste

marcador nos animais LDLr^{-/-} machos ($p < 0,05$) em comparação a linhagem controle e a animais LDLr^{-/-} fêmeas.

Figura 16. Efeitos da HF sobre o imunoconteúdo de proteínas sinápticas no hipocampo de camundongos machos e fêmeas.

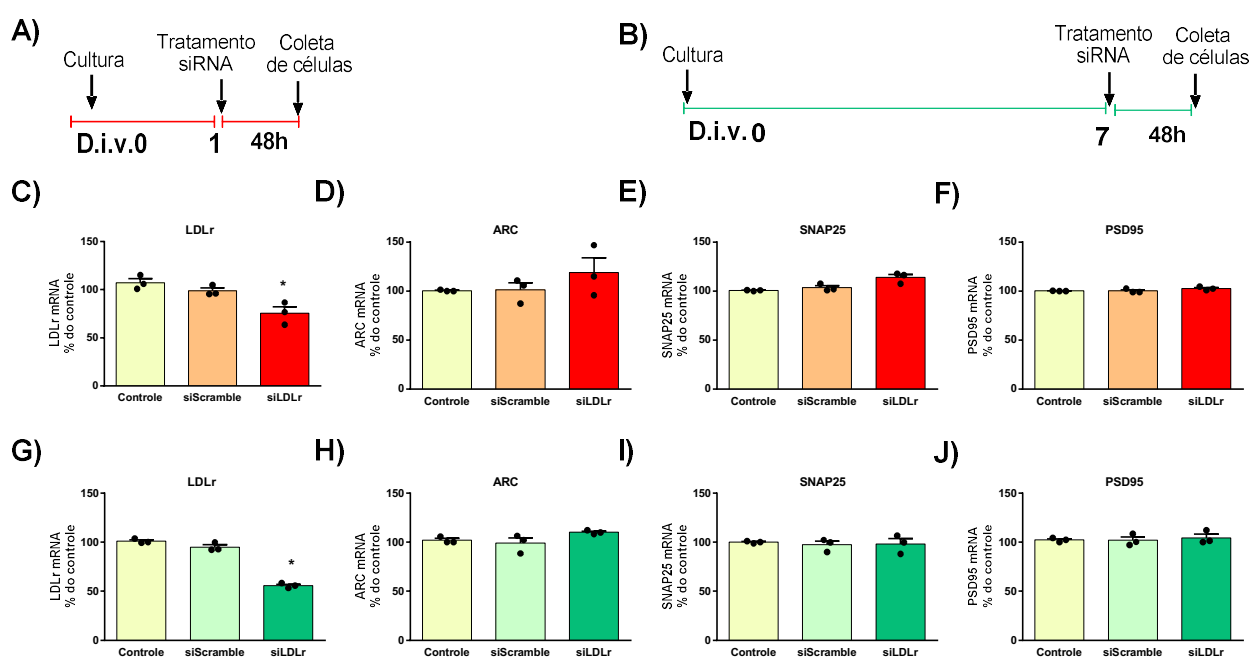


Legenda: A avaliação do imunoconteúdo das proteínas aromatase (A), sinaptopodina (B), SNAP25 (C) e PSD95 (D) no hipocampo dos animais C57Bl6 e LDLr^{-/-} machos e fêmeas foi realizada através da técnica de *Western Blotting*. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (4-8 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem do mesmo sexo. # $p < 0,05$ comparado com camundongos LDLr^{-/-} do outro sexo.

Para investigar a influência do LDLr em neurônios sobre a expressão de proteínas sinápticas, foi induzida a redução na expressão de LDLr utilizando a técnica de siRNA em cultura primária de neurônios. A ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc de Newman Keuls indicou um efeito significativo do tratamento com siLDLr, levando a uma redução na expressão do receptor LDLr de 25% em neurônios imaturos [$F(2, 6) = 11,299$; $p = 0,00924$,

Figura 17A e C], e 45% em neurônios maduros [F(2, 3)=263,04; p=0,00043, Figura 17B e G]. A ANOVA de uma via indicou ausência de efeito da redução da expressão do LDLr sobre o imunocntéudo das proteínas sinápticas ARC [F(2, 6)=1,2131; p=0,36103], SNAP25 [F(2, 6)=2,6266; p=0,15158] e PSD95 [F(2, 6)=2,1985, p=0,19219] em neurônios imaturos (Figura 17D, E e F, respectivamente). Resultados semelhantes foram obtidos em neurônios maduros: ARC [F(2, 6)=2,9145; p=0,13050], SNAP25 [F(2, 6)=0,11830; p=0,89046] e PSD95 [F(2, 6)=0,20814; p=0,81772] (Figura 17H, I e J, respectivamente).

Figura 17. Efeito da redução da expressão do LDLr sobre a expressão gênica de proteínas sinápticas em cultura primária de neurônios de camundongos.



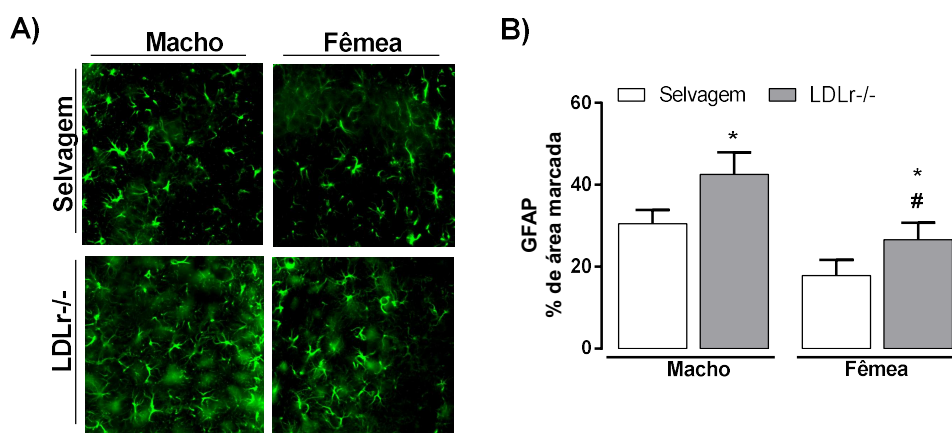
Legenda: Efeitos do tratamento de cultura primária de neurônios com siRNA no dia *in vitro* 1 (A) e no dia *in vitro* 7 (B) sobre a expressão de proteínas sinápticas ARC (D e H), SNAP25 (E e I) e PSD95 (F e J). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (n biológico = 3 animais/tratamento). *p < 0,05 em relação ao grupo controle.

5.3 PERGUNTA EXPERIMENTAL 3: A ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA E A ATROFIA HIPOCAMPAL ESTÃO RELACIONADAS COM OS PREJUÍZOS COGNITIVOS OBSERVADOS EM CAMUNDONGOS LDLR^{-/-} MACHOS E FÊMEAS?

Com o propósito de avaliar se a ativação astrocitária poderia ser um dos fatores envolvidos na disfunção de memória em ambos os sexos, foi analisada a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um marcador de astrogliose, especificamente na região

CA1 do hipocampo. A figura 18 ilustra o percentual de área marcada com GFAP. A ANOVA de duas vias indicou efeitos significantes dos fatores genótipo [$F(1, 20)=6,0708$; $p=0,022930$] e sexo [$F(1, 20)=11,489$; $p=0,00291$] no percentual de área marcada com GFAP. Posteriormente, o teste pos-hoc de Newman Keuls revelou que camundongos machos e fêmeas LDLr^{-/-} apresentam um aumento significativo na imunomarcação para GFAP no hipocampo em relação aos seus controles selvagens ($p<0,05$, Figura 18B). Além disso, foi observada uma diferença significativa entre os sexos, sendo que as fêmeas LDLr^{-/-} apresentaram redução neste parâmetro em comparação aos machos do mesmo genótipo ($p<0,05$).

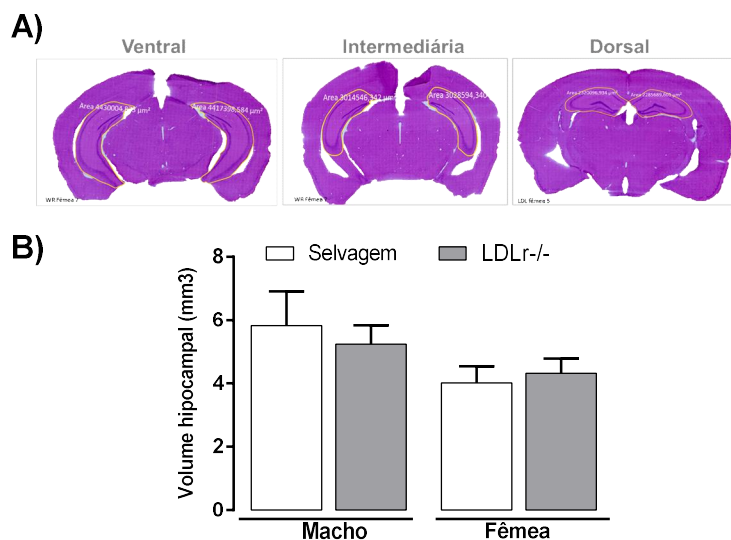
Figura 18. Efeitos da HF sobre a ativação astrocitária na região CA1 do hipocampo de camundongos machos e fêmeas.



Legenda: Para avaliação da ativação astrocitária dos animais C57Bl6 e LDLr^{-/-} machos e fêmeas, foi realizado os a marcação com GFAP na região CA1 do hipocampo (A). Foi utilizado o percentual da área marcada como parâmetro de densidade de marcação (B). Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (6 animais/grupo) * $p<0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem do mesmo sexo. # $p<0,05$ comparado com camundongos LDLr^{-/-} do outro sexo.

Adicionalmente, foi avaliado se os prejuízos de memória poderiam estar relacionados com uma atrofia da região hipocampal, sendo realizada a técnica coloração hematoxilina-eosina e calculou-se o volume desta estrutura utilizando o princípio de Cavalieri. A ANOVA de duas vias indicou ausência de diferenças significativas entre os grupos [$F(1, 17)=0,41504$; $p=0,52802$, Figura 19].

Figura 19. Efeitos da HF sobre o volume do hipocampo de camundongos machos e fêmeas.

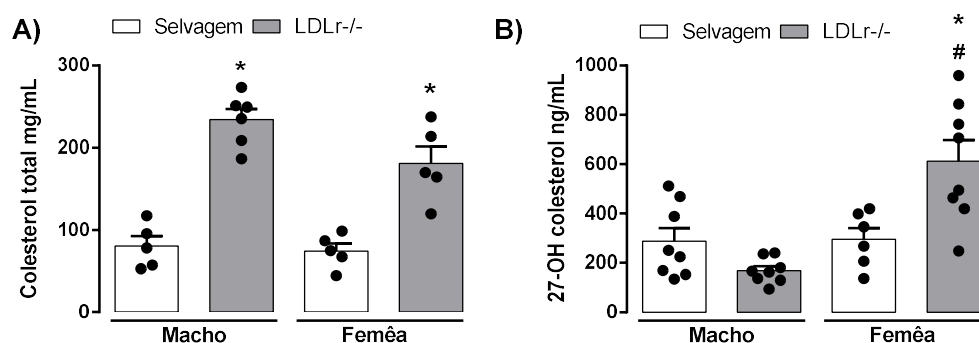


Legenda: Para avaliação do volume hipocampal dos animais C57Bl6 e LDLr-/- machos e fêmeas, foi realizado a coloração de hematoxilina-eosina (A) e o volume hipocampal foi estimado através do princípio de Cavalieri (B). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (4-6 animais/grupo).

5.4 PERGUNTA EXPERIMENTAL 4: O 27-HIDROXICOLESTEROL REPRESENTA A CONEXÃO ENTRE OS ALTOS NÍVEIS PERIFÉRICOS DE COLESTEROL E AS ALTERAÇÕES CEREBRAIS E COMPORTAMENTAIS OBSERVADAS EM CAMUNDONGOS LDLR-/- MACHOS E FÊMEAS?

A figura 20 ilustra os níveis de colesterol e de 27-OH (avaliados em grupos independentes de animais) em camundongos machos e fêmeas das linhagens controle e LDLr-/. A ANOVA indicou efeito significativo do fator genótipo [$F(1, 17)=83,82$; $p<0,05$] nos níveis de colesterol total e um efeito significativo do fator interação genótipo vs. sexo [$F(1, 26)=14,083$; $p=0,00089$] nos níveis de 27-OH. A análise pos-hoc de Newman-Keuls revelou que ambos sexos apresentaram aumento significativo nos níveis de colesterol total (cerca de 2-3x superiores) do que os animais selvagens ($p<0,05$, Figura 20A), um resultado já esperado para esse modelo animal. Entretanto, quando analisamos os níveis do metabólito 27-OH, ocorreu um aumento significativo apenas nas fêmeas LDLr-/- ($p<0,05$, Figura 20B). Esse resultado sugere a existência de diferenças quanto ao sexo no metabolismo periférico do colesterol.

Figura 20. Concentração plasmática de colesterol total e 27-OH em camundongos machos e fêmeas LDLr^{-/-}.



Legenda: Efeitos do modelo de HF nos níveis periféricos de colesterol (A) e 27-OH (B) em camundongos C57B16 e LDLr^{-/-} machos e fêmeas de 4-5 meses de idade. Os dados estão representados como média ± EPM. (n=5-8 animais/grupo) *p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem do mesmo sexo. #p<0,05 comparado com camundongos LDLr^{-/-} do outro sexo.

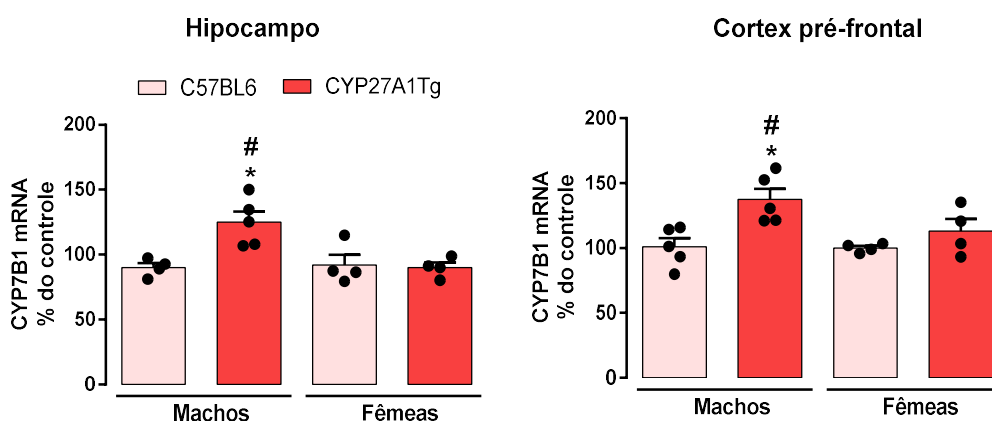
O cérebro possui um mecanismo efetivo para eliminação do excesso de 27-OH através da sua metabolização à 7-HOCA pela ação da enzima CYP7B1. Entretanto, até o momento não se sabe exatamente quais são os efeitos desse metabólito no SNC. Diante da diferença nas concentrações periféricas previamente observada, investigamos se a metabolização cerebral do 27-OH poderia diferir entre os sexos.

5.5 PERGUNTA EXPERIMENTAL 5: OS ALTOS NÍVEIS CIRCULANTES DE 27-HIDROXICOLESTEROL CAUSAM DIFERENTE IMPACTO NA HOMEOSTASE CEREBRAL DO COLESTEROL EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS?

Esta questão foi respondida utilizando animais com a expressão aumentada da CYP27A1 (CYP27A1Tg). Uma vez que a CYP27A1 converte o colesterol em 27-OH, os camundongos transgênicos CYP27A1Tg apresentam concentrações 3-5 vezes maiores do metabólito 27-OH na circulação quando comparados a animais não mutados (283 ± 11 x 48 ± 2 ng/mL, respectivamente), uma característica reproduzida tanto em machos quanto em fêmeas (MEIR et al., 2002). Foi avaliada a expressão gênica da enzima CYP7B1 no córtex pré-frontal e hipocampo (Figura 21A e B), duas regiões importantes para o processamento de memórias, em camundongos C57B16 e CYP27A1Tg comparando machos e fêmeas. A ANOVA indicou um efeito significativo da interação genótipo vs. sexo [F(1, 13)=7,7735; p=0,01538] no hipocampo e efeito significativo do genótipo [F(1, 14)=11,437; p=0,00447]

no córtex pré-frontal. Posteriormente, o teste post-hoc de Newman-Keuls indicou um aumento significativo da expressão da CYP7B1 apenas nos animais CYP27A1Tg machos, tanto no hipocampo ($p < 0,05$) quanto no córtex-pré-frontal ($p < 0,05$).

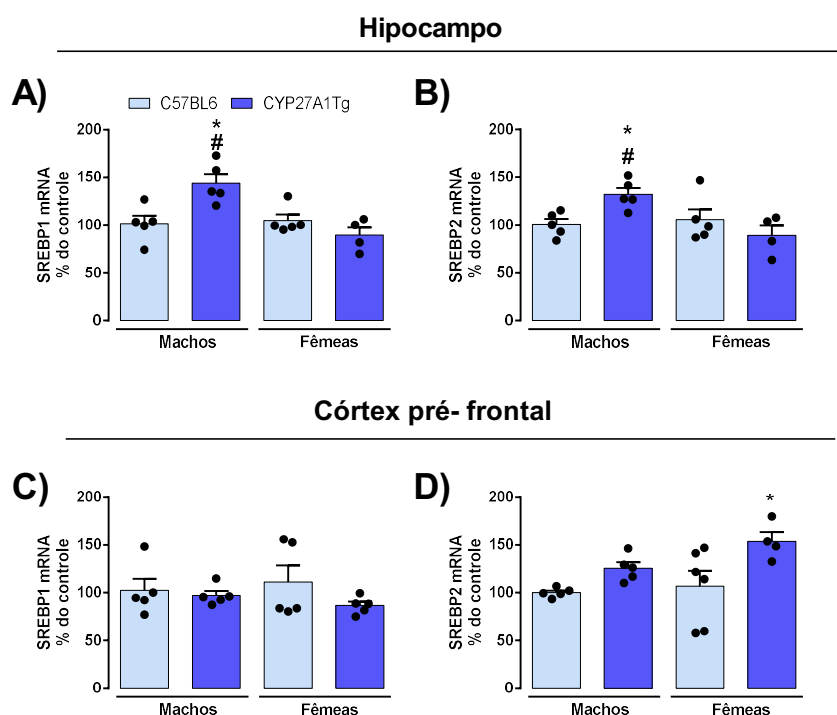
Figura 21. Expressão gênica da enzima CYP7B1 no cérebro de camundongos machos e fêmeas CYP27A1.



Avaliação da expressão gênica de CYP7B1 no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) em camundongos C57BL/6 e CYP27A1Tg machos e fêmeas de 4-5 meses de idade. Os dados estão representados como média \pm EPM. (n=4-5 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem do mesmo sexo. # $p < 0,05$ comparado com camundongos CYP27A1Tg do outro sexo.

Diante da diferença sexual observada na metabolização do 27-OH no cérebro, avaliamos se a expressão de genes relacionados a homeostase de colesterol no cérebro estaria sendo afetada por essas diferenças. Para isto, foi avaliada expressão dos genes SREBP1 e SREBP2 envolvidos no controle da expressão do receptor LDL e expressos nos astrócitos. No hipocampo, a ANOVA indicou efeito significativo da interação genótipo vs. sexo para SREBP1 [$F(1, 15)=12,244$; $p=0,00323$, Figura 22A] e para SREBP2 [$F(1, 15)=7,8037$; $p=0,01364$, Figura 22B]. Posteriormente, o teste post-hoc de Newman-Keuls revelou um aumento na expressão destes marcadores no hipocampo e córtex pré-frontal em machos CYP27A1Tg (Figura 22A e B, $p < 0,05$). No córtex pré-frontal, a ANOVA indicou ausência de efeito para o na expressão de SREBP1 [$F(1, 3)=0,38982$; $p=0,57665$], e um efeito significativo do fator genótipo na expressão do SREBP2 [$F(1, 16)=15,933$, $p=0,00105$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou aumento na expressão do SREBP2 em fêmeas CYP27A1Tg (Figura 22D, $p < 0,05$).

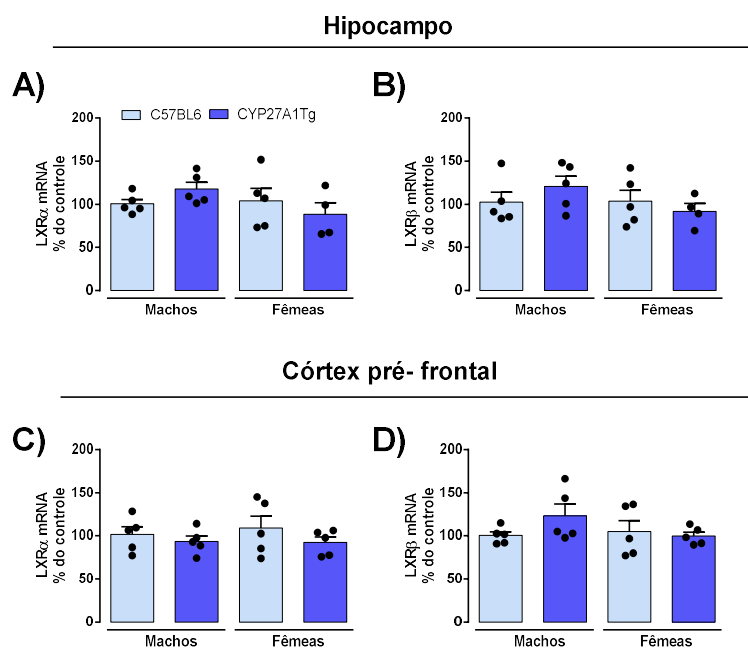
Figura 22. Expressão gênica do fator de transcrição SREBP1 e SREBP2 no cérebro de camundongos machos e fêmeas CYP27A1Tg.



Avaliação da expressão gênica de SREBP1 (A e C) e SREBP2 (B e D) no hipocampo (A e B) e córtex pré-frontal (C e D) em camundongos C57Bl6 e CYP27A1Tg machos e fêmeas de 4-5 meses de idade. Os dados estão representados como média \pm EPM. (n=4-5 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem do mesmo sexo. # $p < 0,05$ comparado com camundongos CYP27A1Tg do outro sexo.

Foi avaliado também a expressão dos genes que controlam os receptores nucleares LXR α e β . Esses receptores medeiam a ativação de outros genes que controlam o efluxo de colesterol a partir dos astrócitos para os neurônios, como dos transportadores ABCA1 e ABCA2 e da ApoE (MOUZAT et al., 2019). A ANOVA indicou ausência de diferenças significativas sobre a expressão LXR α no hipocampo [F(1, 15)=2,3204; $p=0,14849$, Figura 23A] e no córtex pré-frontal [F(1, 16)=0,19985; $p=0,66084$, Figura 23C], bem como para a expressão de LXR β no hipocampo [F(1, 15)=1,6186; $p=0,22265$, Figura 23B] e no córtex pré-frontal [F(1, 16)=1,9804; $p=0,17848$, Figura 23D].

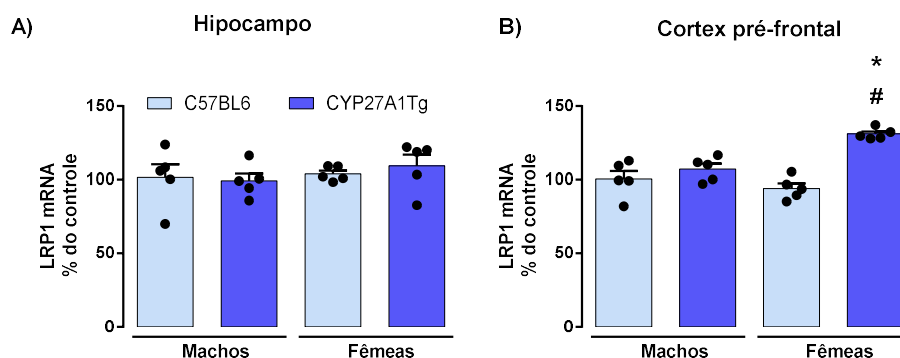
Figura 23. Expressão gênica de LXR α e LXR β no cérebro de camundongos machos e fêmeas CYP27A1.



Avaliação da expressão gênica de LXR α (A e C) e LXR β (B e D) no hipocampo (A e B) e córtex pré-frontal (C e D) em camundongos C57Bl6 e CYP27A1Tg machos e fêmeas de 4-5 meses de idade. Os dados estão representados como média \pm EPM. (n=4-5 animais/grupo).

A seguir, foi avaliada a expressão de genes para receptores responsáveis pela captação de colesterol proveniente dos astrócitos pelos neurônios. Primeiramente no hipocampo, a ANOVA de duas vias indicou ausência de efeito significativo da interação genótipo vs. sexo [F(1, 16)=0,38711; p=0,54259, Figura 24A]. Por outro lado, no córtex pré-frontal foi observado um efeito significativo da interação dos dois fatores [F(1, 16)=16,146; p=0,0002, Figura 24B]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou um aumento na expressão do gene do LRP1 em camundongos CYP21A1 fêmeas no córtex pré-frontal (p<0,05, Figura 24B).

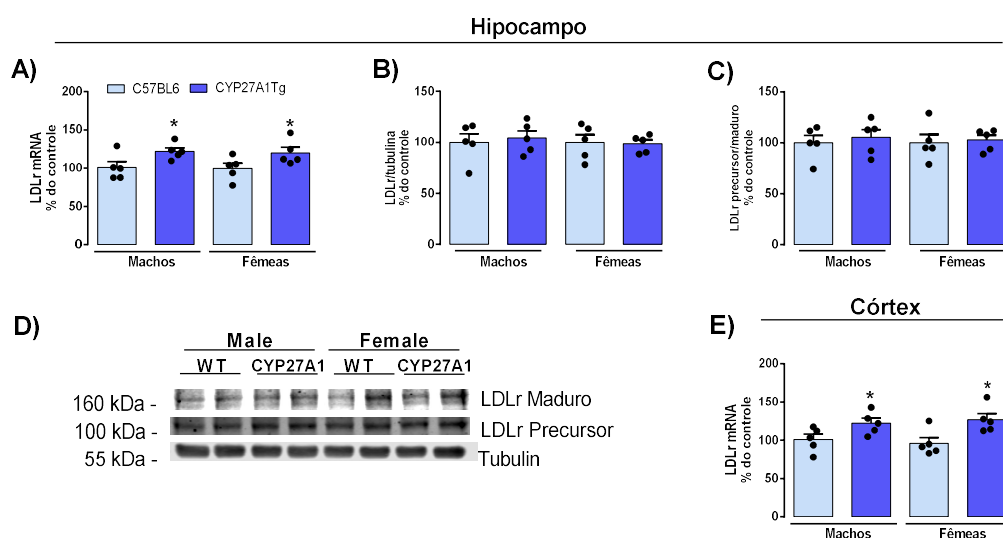
Figura 24. Expressão gênica de LRP1 no cérebro em camundongos machos e fêmeas CYP27A1.



Avaliação da expressão gênica do LRP1 (A) no hipocampo e córtex pré-frontal (B) em camundongos C57BL6 e CYP27A1Tg machos e fêmeas de 4-5 meses de idade. Os dados estão representados como média \pm EPM. (n=4-5 animais/grupo). *p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem do mesmo sexo. #p<0,05 comparado com camundongos CYP27A1Tg do outro sexo.

Adicionalmente, a ANOVA indicou efeito significativo do fator genótipo no hipocampo [F(1, 16)=9,4362; p=0,00730, Figura 25A] e córtex pré-frontal [F(1, 16)=12,952; p=0,00240, Figura 25E] para a expressão gênica do LDLr. O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou um aumento na expressão do LDLr tanto em machos quanto em fêmeas CYP27A1Tg nas duas regiões avaliadas (Figura 25A e E). Contudo, quando analisado o imunoconteúdo do receptor, a análise ANOVA de duas vias indicou ausência de efeito para o precursor [F(1, 16)=,17521, p=0,68108, Figura 25B e D] e para a taxa de maturação [F(1, 16)=,03516, p=0,85363, Figura 25C e D].

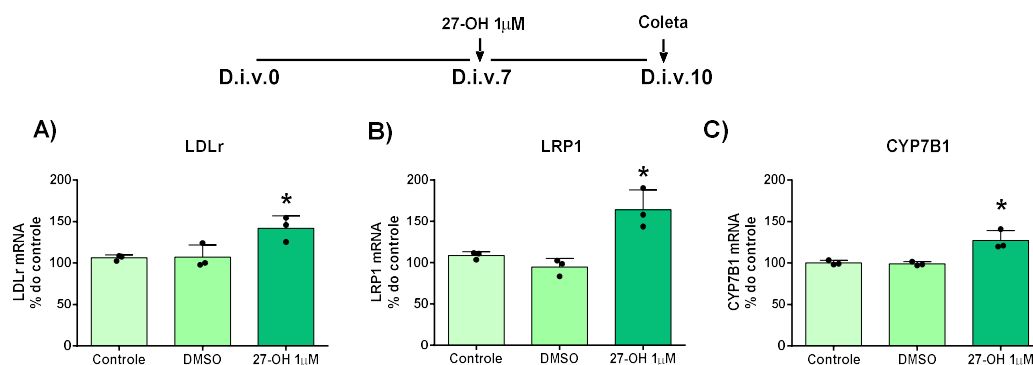
Figura 25. Expressão gênica e imunocontéudo do LDLr no cérebro de camundongos machos e fêmeas CYP27A1.



Avaliação da expressão gênica do LDLr (A) no hipocampo e córtex pré-frontal (E) e do imunocontéudo hipocampal do precursor do LDLr (B e D) bem como a taxa de maturação (C e D) em camundongos C57Bl6 e CYP27A1Tg machos e fêmeas de 4-5 meses de idade. Os dados estão representados como média \pm EPM. (n=4-5 animais/grupo). *p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem do mesmo sexo.

Posteriormente, foi realizado o tratamento de cultura primária de neurônios com 1 μ M de 27-OH. A concentração de 27-OH, bem como o tempo de tratamento e coleta das células foi determinada com base no estudo de Merino-Serrais e colaboradores (2019), com algumas modificações. Neste estudo, foi observado que esta concentração é suficiente para induzir prejuízos sinápticos e alterações morfológicas neuronais (MERINO-SERRAIS et al., 2019). Com o objetivo de confirmar os achados *in vivo*, foi avaliado o efeito desse tratamento sobre a expressão dos receptores LDLr e LRP1 (Figura 26A e B, respectivamente). Adicionalmente, avaliamos também a expressão da enzima responsável pela conversão do 27-OH em 7-HOCA, a CYP7B1 (Figura 26C). A ANOVA de uma via indicou efeito significativo do tratamento com 27-OH sobre a expressão do LDLr [F(2, 6)=8,3142; p=0,01864] e do LRP1 [F(2, 6)=17,252, p=0,00325]. Concomitantemente, nesse mesmo grupo experimental, um aumento na expressão da enzima CYP7B1 [F(2, 6)=14,832, p=,00476] CYP7B1 também foi observado, indicando a metabolização do 27-OH.

Figura 26. Expressão gênica do LDLr, LRP1 e CYP7B1 em cultura primária de neurônios tratados com 27-OH.

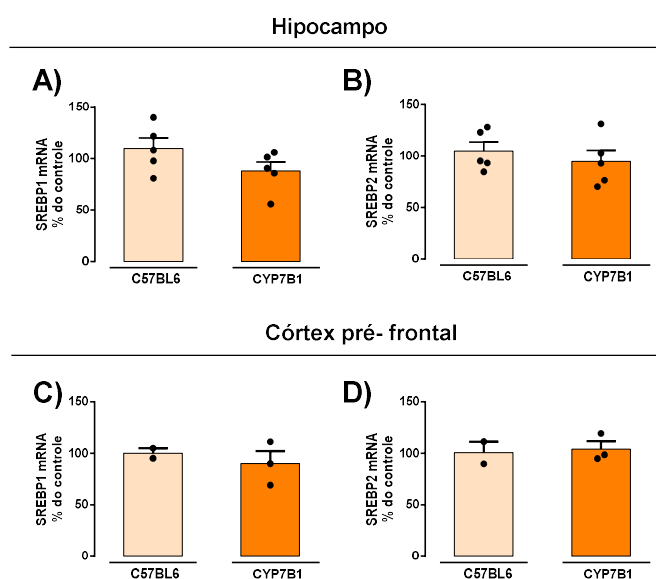


Avaliação da expressão gênica do LDLr (A) LRP1 (B) e da enzima CYP7B1 (C) em cultura primária de neurônios tratadas com 1µM de 27-OH. Os dados estão representados como média ± EPM. (n biológico = 3 animais/tratamento). *p<0,05 comparado com o grupo não tratado e com o controle DMSO.

Investigou-se também o possível envolvimento do 7-HOCA como mediador dos efeitos do 27-OH sobre o a homeostase do colesterol no cérebro de machos. Para isso, foram utilizados animais nocaute para a enzima CYP7B1. Esses animais, quando comparados aos animais selvagens, apresentam altas concentrações de 27-OH no plasma (4 ng/mL x 1 ng/mL) e no cérebro (4,5 ng/mg x 0,5 ng/mg), já a produção de 7-HOCA é drasticamente reduzida (MELJON et al., 2019).

Quando avaliamos os genes envolvidos na homeostase do colesterol, a ANOVA indicou ausência de efeitos significantes para o genótipo sobre a expressão de SREBP1 [F(1, 8)=2,6383, p=0,1429, Figura 27A] e SREBP2 [F(1, 8)=0,53078; p=0,48706, Figura 27B] no hipocampo. Resultados semelhantes foram observados para a expressão de SREBP1 [F(1, 3)=0,38982, p=0,57665, Figura 27C] e SREBP2 [F(1, 3)=0,08372, p=0,79116, Figura 27D] no córtex pré-frontal.

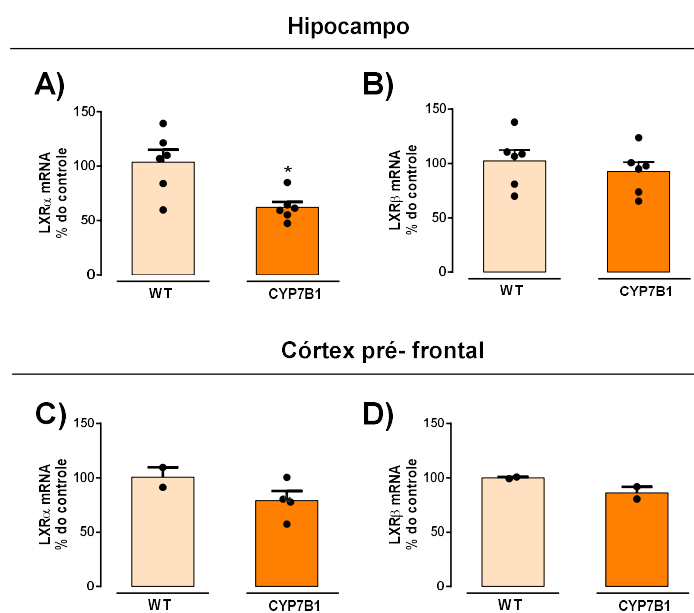
Figura 27. Expressão gênica do fator de transcrição SREBP1 e SREBP2 no cérebro de camundongos nocaute para a CYP7B1 machos.



Avaliação da expressão gênica de SREBP1 (A e C) e SREBP2 (B e D) no hipocampo (A e B) e córtex pré-frontal (C e D) em camundongos C57Bl6 e nocaute para CYP7B1 machos 5 meses de idade. Os dados estão representados como média \pm EPM. (n = 2-5 animais/grupo).

Quando avaliamos genes que controlam a expressão de LXR α e β no hipocampo, a análise de ANOVA de uma via indicou efeito significativo do genótipo para a expressão do LXR α [F(1, 10)=10,823, p=0,00815, Figura 28A] e ausência de efeito para LXR β [F(1, 10)=0,56112, p=0,47106, Figura 28B]. No córtex pré-frontal, ANOVA indicou ausência de efeito para o LXR α [F(1, 4)=2,2358, p=0,20917, Figura 28C] e LXR β [F(1, 2)=5,9722, p=0,13448, Figura 28D].

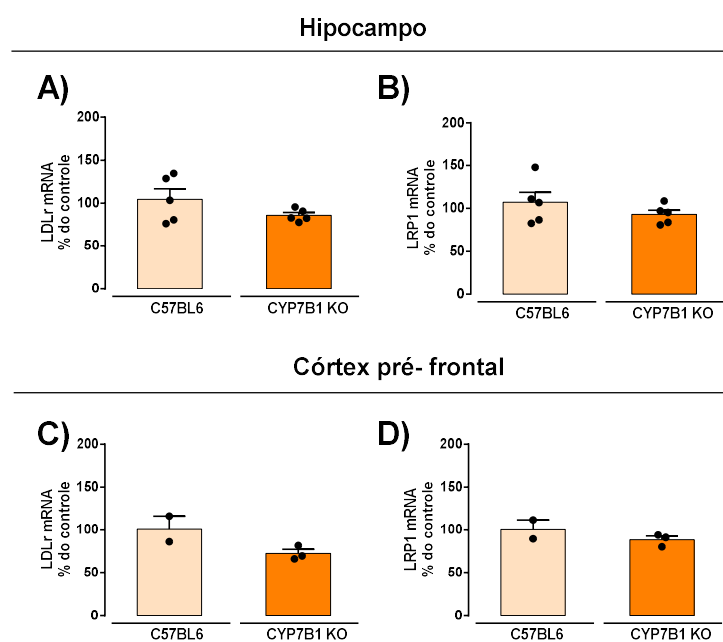
Figura 28. Expressão gênica do fator do gene LXR α e LXR β no cérebro de camundongos nocaute para a CYP7B1 machos.



Avaliação da expressão gênica de LXR α (A e C) e LXR β (B e D) no hipocampo (A e B) e córtex pré-frontal (C e D) em camundongos C57Bl6 e nocaute para CYP7B1 machos 5 meses de idade. Os dados estão representados como média \pm EPM. (n = 2-5 animais/grupo). *p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem.

Quando avaliamos os receptores que captam colesterol para o interior dos neurônios, a ANOVA de uma via indicou ausência de efeitos significantes do genótipo sobre a expressão de LDLr [F(1, 8)=2,3225; p=0,16602, Figura 29A] e LRP1 [F(1, 8)=1,2055; p=0,30416, Figura 29A] no hipocampo. Resultados semelhantes foram observados para a expressão do LDLr [F(1, 3)=5,1142; p=0,10878, Figura 29C] e LRP1 [F(1, 3)=1,4810; p=0,31062, Figura 29D] no córtex pré-frontal.

Figura 29. Expressão gênica do fator do gene LDLr e LRP1 no cérebro de camundongos nocaute para a CYP7B1 machos.



Avaliação da expressão gênica de LDLr (A e C) e LRP1 (B e D) no hipocampo (A e B) e córtex pré-frontal (C e D) em camundongos C57Bl6 e nocaute para CYP7B1 machos 5 meses de idade. Os dados estão representados como média \pm EPM. (n = 2-5 animais/grupo).

6. DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas uma crescente linha de evidências tem suportado que distúrbios no metabolismo do colesterol poderiam ser um gatilho precoce para o surgimento de alterações do funcionamento do SNC, culminando com o desenvolvimento de demência ou da doença de Alzheimer (LOERA-VALENCIA et al., 2019; PAPPOLLA et al., 2003). Nesta perspectiva, a HF é um distúrbio do metabolismo do colesterol altamente prevalente em todo o mundo que possibilita estudar os efeitos da exposição prolongada à altos níveis de colesterol no SNC desde o nascimento (MYTILINAIYOU et al., 2018). Na sua primeira descrição realizada em 1938, a HF foi caracterizada pela alta taxa de doenças cardiovasculares, especialmente o infarto agudo do miocárdio em pacientes muito jovens (MÜLLER, 1938). Somente em 2008 foi reportado pela primeira vez os efeitos da HF sobre a memória (CRUZ-SANCHEZ et al., 2008). Estes achados foram posteriormente confirmados em um estudo publicado por Zambón e colaboradores (2010), o qual demonstrou que portadores de HF de meia-idade apresentaram uma elevada incidência de comprometimento cognitivo moderado em comparação com indivíduos controle (ZAMBÓN et al., 2010). Além disso, o comprometimento cognitivo ocorre precocemente nesses pacientes, surgindo antes dos 50 anos de idade (ARIZA et al., 2016; SUÁREZ BAGNASCO, 2017).

Um padrão distinto é observado quando se olha para as duas principais consequências da HF em relação ao sexo. Quanto ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, homens portadores de HF são mais susceptíveis do que mulheres (COUTINHO et al., 2021; PÉREZ GARCÍA, 2018), apesar de que em um amplo estudo clínico com crianças e adolescentes (0-19 anos) portadoras de HF foi demonstrado que os indivíduos do sexo feminino apresentam maiores níveis de colesterol total e LDL do que os do sexo masculino (HOLVEN et al., 2018). Por outro lado, quando se trata de demências e da doença de Alzheimer, as mulheres apresentam maior prevalência do que homens (BEAM et al., 2018; VIÑA; LLORET, 2010). Apesar da dualidade observada, não existem estudos em humanos investigando possíveis diferenças entre homens e mulheres quanto ao impacto da HF sobre a memória.

É importante destacar que na população em geral, as mulheres que se encontram em estágio pré-menopausa também apresentam menor incidência de doenças cardiovasculares, quando comparadas a homens da mesma idade. Porém, a queda dos níveis de estrogênio após a menopausa é a associada ao aumento do risco para tais doenças, ao passo que a reposição destes hormônios precocemente, no período pós-menopausa, previne esse evento

(CHELLA KRISHNAN; MEHRABIAN; LUSIS, 2018; SPETH et al., 2018). De maneira similar, a piora cognitiva também surge com a queda dos níveis de estrogênio e pode ser prevenida ou amenizada pela reposição do mesmo (CLEGG et al., 2017; IMTIAZ et al., 2017). De fato, existem diversos estudos apontando o estrogênio como um fator neuroprotetor (MERCENTHALER; DELLOVADE; SHUGHRUE, 2003). Contudo, conforme reportado por Ariza (2016) e Suárez Bagnasco (2017), o declínio cognitivo nos portadores de HF inicia-se precocemente (antes dos 50 anos), precedendo o período do decaimento hormonal.

No que diz respeito à estudos pré-clínicos, o modelo animal de deleção do receptor LDL tem sido amplamente utilizado como ferramenta para o estudo dos efeitos da HF no cérebro, especialmente da sua relação com prejuízos no aprendizado e na memória. Estudos utilizando camundongos LDLr^{-/-} machos mostraram prejuízos de aprendizagem, memória espacial e aversiva, sendo este efeito independente da dieta (padrão x hipercolesterolêmica) e da idade (jovens x idosos) (MOREIRA et al., 2012b, 2013; MULDER et al., 2004; WANG et al., 2014). Entretanto, conforme apresentado na seção de Introdução desta tese, poucos trabalhos utilizaram fêmeas para avaliar tais parâmetros, tão pouco investigaram possíveis diferenças entre os sexos. Neste sentido, a primeira pergunta respondida nesta tese foi: *Camundongos LDLr^{-/-} apresentam diferenças sexuais no desempenho de testes comportamentais de memória?*

Para responder esta questão foram realizadas duas baterias de testes comportamentais visando a avaliação de diferentes tipos de memória. No primeiro protocolo, os animais LDLr^{-/-} machos e fêmeas não foram capazes de reconhecer o objeto realocado ou o braço novo nos testes de realocação de objetos e labirinto em Y modificado, respectivamente. Os resultados obtidos nestes testes mostram, de maneira qualitativa, que os animais LDLr^{-/-} de ambos sexos não foram capazes de lembrar da localização dos objetos ou do ambiente que haviam sido previamente expostos, diferente dos animais selvagens que foram capazes de desempenhar satisfatoriamente estas tarefas. Já no segundo protocolo comportamental foi observado que apenas camundongos machos LDLr^{-/-} apresentaram prejuízos na memória de reconhecimento, pois não foram capazes de reconhecer o objeto novo no teste de reconhecimento de objeto, enquanto que fêmeas do mesmo genótipo e os animais da linhagem controle não apresentam este prejuízo. Ao avaliar a memória aversiva de longa duração, observou-se que os camundongos machos LDLr^{-/-} não foram capazes de lembrar do choque aplicado naquele contexto, em relação aos animais selvagens machos. De maneira interessante, as fêmeas apresentaram um menor tempo de congelamento em relação aos

machos, sendo que a mesma diferença sexual foi previamente descrita por Hwang e colaboradores no teste de medo condicionado ao contexto em animais selvagens (HWANG et al., 2010).

Este conjunto de resultados comportamentais corroboram estudos clínicos que descrevem prejuízo precoce de memória em pacientes com HF (ARIZA et al., 2016; ZAMBÓN et al., 2010). Além disso, confirmam resultados prévios que demonstraram o desenvolvimento precoce de comprometimento cognitivo em animais LDLr^{-/-} adultos jovens (3-6 meses de idade) (DE OLIVEIRA et al., 2011, 2013; ENGEL et al., 2019; MOREIRA et al., 2012b, 2014).

De maneira geral, os testes do primeiro protocolo são utilizados para avaliação de memórias dependentes de hipocampo (ASSINI; DUZZIONI; TAKAHASHI, 2009; FERGUSON; SAPOLSKY, 2007), especialmente da região CA1 do hipocampo dorsal, que está sabidamente envolvida com a consolidação de memórias espaciais (HARLAND et al., 2021). Neste aspecto, observou-se no presente trabalho que o modelo animal de HF utilizado é caracterizado por prejuízos de memórias espaciais de maneira independente do sexo, sendo que estes prejuízos estão associados tanto aos efeitos deletérios da hipercolesterolemia quanto à deleção do receptor LDL. Destaca-se que em testes como o medo condicionado ao contexto e o reconhecimento de objeto, que envolvem outras áreas cerebrais além do hipocampo, como o córtex pré-frontal e o córtex pré-límbico (DA SILVA et al., 2020; TANIMIZU; KONO; KIDA, 2018), apenas camundongos LDLr^{-/-} machos apresentaram prejuízos. Estes resultados nos levam a especular que estas áreas seriam menos comprometidas ou seriam afetadas mais tardiamente em animais LDLr^{-/-} fêmeas, sendo que estudos adicionais são necessários para investigar esta importante questão.

Cabe destacar uma diferença sexual que foi reproduzida nos dois protocolos comportamentais, a hiperlocomotoção das fêmeas LDLr^{-/-}. O aumento da atividade locomotora é evidente tanto em relação ao grupo dos animais selvagens quanto em relação aos camundongos LDLr^{-/-} machos. Estes resultados estão de acordo com resultados prévios do nosso grupo de pesquisa avaliando a atividade locomotora de camundongos LDLr^{-/-} fêmeas com 3 meses de idade (SZCZEPANIK et al., 2016). Essa clara diferença comportamental observada entre camundongos machos e fêmeas da linhagem LDLr^{-/-} indica que diferentes regiões cerebrais (como o estriado e o córtex pré-frontal) envolvidas com o controle motor podem ser afetadas de maneira diferente em cada sexo numa situação de hipercolesterolemia.

Existem estudos prévios relatando que camundongos LDLr^{-/-} machos (3-5 meses de idade) também apresentaram hiperlocomoção quando comparados aos controles selvagens. Contudo, Oliveira et al. (2020) e Elder et al. (2008) mostraram que essa hiperlocomoção é exacerbada por uma dieta rica em colesterol, indicando que esse efeito pode ser relacionado aos níveis de colesterol (DE OLIVEIRA et al., 2020a; ELDER et al., 2008). Enquanto que, De Paula e colaboradores (2020) não observaram alteração na atividade locomotora no campo aberto ou na latência para a queda no teste do *rotarod* em camundongos LDLr^{-/-} machos (DE PAULA et al., 2020). A atividade locomotora é controlada por muitas áreas cerebrais além do hipocampo (BEVAN, 2021) e que não foram exploradas aqui, o que é uma limitação deste trabalho. Desta forma, a investigação de possíveis alterações cerebrais relacionadas com a diferença sexual observada na atividade locomotora deverá ser melhor explorada em estudos futuros.

Com base nas respostas comportamentais obtidas a partir da primeira pergunta desse estudo, fica claro que o hipocampo é uma região comprometida em ambos os sexos no presente modelo de HF. Os mecanismos do padrão de separação de memória espacial e temporal dependem de modificações nas sinapses pré-existentes na via colateral de Schaffer na região CA1 após a aplicação de estímulos de alta frequência (BLISS; COLLINGRIDGE; MORRIS, 2014; BLISS; GARDNER-MEDWIN, 1973; CAJIGAS; WILL; SCHUMAN, 2010; GILBERT; KESNER; LEE, 2001; POO et al., 2016). Baseado nessa premissa surgiu a segunda pergunta desta tese: *A deleção do receptor LDL leva a redução da plasticidade hipocampal em camundongos machos e fêmeas?*

Os resultados do presente estudo são pioneiros em demonstrar que os prejuízos de memória de camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas são acompanhados por redução da resposta ao protocolo de LTP aplicado na via colateral de Schaffer no hipocampo. Esse prejuízo funcional pode estar relacionado à ausência do receptor LDL no cérebro desses animais, o que pode levar a uma captação ineficiente de colesterol para os neurônios, e redução do colesterol intracelular (BORRONI; VALLÉS; BARRANTES, 2016). Construindo essa linha de evidência, já foi demonstrado que a indução do efluxo do colesterol a partir de neurônios hipocampais (KOUNDINOV; KOUNDINOVA, 2001), assim como redução de colesterol no cérebro em modelos animais genéticos senescência precoce (por exemplo, *senescent-accelerated mice strain 8* -SAMP8) (PÉREZ-CAÑAMÁS et al., 2016) reduz significativamente a resposta pós-sináptica após o estímulo da LTP.

Por outro lado, na hipercolesterolemia esporádica, onde há altos níveis de colesterol circulante, porém uma expressão normal do receptor LDL, também é observado prejuízo na

transmissão sináptica da via colateral de Schafer associado ao dano cognitivo (HWANG et al., 2010). Do mesmo modo, níveis 2-3x superiores de colesterol são encontrados nos animais LDLr^{-/-} desde o nascimento (ISHIBASHI et al., 1993). Apesar do colesterol em condições normais não ser capaz de cruzar a BHE, tanto a hipercolesterolemia esporádica (KALAYCI et al., 2009) como a HF (DE OLIVEIRA et al., 2020a) podem causar aumento na permeabilidade da BHE em animais jovens, o que pode levar ao acúmulo de colesterol nos neurônios piramidais localizados na região CA1 (BUKIYA et al., 2017). Logo, essas evidências apontam que um desbalanço (positivo ou negativo) das concentrações intracelulares do colesterol podem comprometer as funções neuronais.

Cabe destacar que uma diferença no padrão de resposta à LTP foi observada entre os sexos nos animais selvagens. As fêmeas selvagens apresentam um aumento no PEPS quando comparado com os machos selvagens. Isso pode ser explicado porque principalmente durante a fase proestro, quando ocorre um aumento da liberação de estrogênio, ocorre um aumento significativo (30% superior em comparação a fase estro) da densidade de espinhos dendríticos em neurônios piramidais na região CA1 em comparação aos machos (MURAKAMI, et al 2006), o que pode explicar uma maior eficiência sináptica. No presente trabalho, não foi avaliado o período do ciclo em que as fêmeas se encontravam no dia do experimento de eletrofisiologia, logo, assume-se que há esse viés. Contudo, isso reflete uma variação naturalmente presente quando se avalia fêmeas, e mesmo com essa variação inerente ao sexo, foi possível observar diferenças em relação aos machos selvagens.

É sabido que a LTP ocorre mediante alterações a nível molecular e na maquinaria estrutural nos neurônios (NICOLL, 2017; POO et al., 2016). Neste sentido, na busca por alterações moleculares subjacentes aos prejuízos cognitivos e de plasticidade sináptica observados nos animais LDLr^{-/-} avaliou-se o imunocontéudo hipocampal de algumas proteínas envolvidas na plasticidade sináptica. Foi observada uma redução nos níveis da proteína pré-sináptica SNAP25 somente em machos, apesar dos prejuízos funcionais na plasticidade hipocampal terem sido observados em ambos os sexos. Porém, deve ser mencionado que no presente estudo foi quantificada a SNAP25 total, que é composta por duas isoformas. A isoforma “a” está relacionada com o processo de sinaptogênese e crescimento axonal e é dominante durante o desenvolvimento, enquanto que a isoforma “b” é predominante durante a idade adulta e está envolvida com a estabilização do aparato de liberação de vesículas sinápticas (BARK et al., 1995). Foi demonstrado que animais com deleção da SNAP25b apresentam redução da magnitude de resposta à LTP, mesmo sem alteração no conteúdo total dessa proteína (IRFAN et al., 2019). Adicionalmente, nesse

mesmo estudo foi demonstrado que camundongos fêmeas selvagens jovens apresentam predominância na isoforma “a” em relação aos machos, indicando um atraso na maturação/troca da isoforma “a” (presente no desenvolvimento) para a isoforma “b” (IRFAN et al., 2019). Portanto, estas diferenças no balanço entre as isoformas da SNAP25 poderia ser uma das explicações para o fato das fêmeas LDLr^{-/-} não apresentarem alterações no imunocontéudo total de SNAP25, diferentemente dos machos, apesar de apresentarem redução dos PEPS.

A sinaptopodina é uma proteína associada à actina e principalmente encontrada em espinhos dendríticos maduros (DELLER et al., 2000) e é regulada pela enzima aromatase (FESTER et al., 2017). Outra proteína aqui avaliada foi a PSD95, uma proteína de ancoramento de receptores que é amplamente distribuída na porção pós-sináptica e é responsável por manter a eficiência sináptica (BÉÏQUE; ANDRADE, 2003). No presente estudo, apesar dos prejuízos comportamentais e de plasticidade sináptica observados no modelo animal de HF, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais no imunocontéudo das proteínas supracitadas. Estes resultados obtidos em experimentos *ex vivo* foram corroborados por estudos *in vitro*. A deleção parcial do LDLr específica em neurônios (sejam maduros ou imaturos) não alterou a expressão de genes que regulam proteínas envolvidas na plasticidade sináptica, como Arc, PSD95 e SNAP25. Portanto, os resultados obtidos com essa abordagem de deleção pontual do LDLr nos levam a hipotetizar que alguns resultados observados *in vivo* no modelo animal LDL^{-/-} sejam consequência de respostas compensatórias da deleção do LDLr durante o neurodesenvolvimento. Neste sentido, a deleção genética do LDLr em animais jovens (3 meses) parece ser mais prejudicial à plasticidade hipocampal no que diz respeito à proliferação e desenvolvimento de novos neurônios no giro dentado hipocampo (ENGEL et al., 2019), do que a nível sináptico. Corroborando esta visão, dois trabalhos prévios descreveram uma redução nos níveis da proteína sinaptofisina especificamente na região CA1 do hipocampo em camundongos LDLr^{-/-} machos envelhecidos (12 meses de idade) (MULDER et al., 2004, 2007; WANG et al., 2014). Em conjunto, esses resultados sugerem que alterações nos níveis de proteínas sinápticas exercem menor participação na disfunção sináptica em animais jovens (como utilizado no presente estudo), enquanto que em animais LDLr^{-/-} envelhecidos parece ser um fator mais determinante.

Alternativamente, avaliamos se o prejuízo no desempenho de tarefas dependentes do hipocampo e a redução da LTP hipocampal observados em camundongos LDLr^{-/-} poderiam estar relacionados a degeneração e atrofia desta região. Entretanto, no presente estudo não

foi observada alteração de volume da região do hipocampo, indicando que, ao menos em animais jovens, as alterações causadas pela HF não são suficientes para causar uma atrofia dessa região. Por outro lado, estudos prévios demonstraram uma ativação astrocitária e a neuroinflamação no hipocampo de camundongos LDLr^{-/-} machos de 3 meses de idade (DE OLIVEIRA et al., 2020a; DE PAULA et al., 2020). A ativação de astrócitos, juntamente com ativação de micróglia, propicia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β , interferon- γ , interleucina-6 e TNF- α (MCGEER, E.G.; MCGEER, P.L., 2010), e algumas destas moléculas são capazes de inibir a LTP hipocampal (BELLINGER et al., 1995; SCHMID; LYNCH; HERRON, 2009). Entretanto, além de mediar a inflamação no SNC, os astrócitos desempenham um papel primordial no suporte e manutenção da eficiência sináptica (ARAQUE et al., 1999). Conforme citado, dados prévios apontam para um aumento da ativação astrocitária (DE OLIVEIRA et al., 2020a; DE PAULA et al., 2020) no hipocampo dos animais LDLr^{-/-}. No presente estudo nós reforçamos estes achados, demonstrando o aumento da imunomarcção para GFAP especificamente na região CA1. De fato, um prejuízo sináptico hipocampal no que diz respeito a níveis de proteínas parece estar envolvido nos prejuízos cognitivos nos animais LDLr^{-/-} em fases mais tardias, quando os animais estão envelhecidos e já perderam boa parte da capacidade plástica (WANG et al., 2014). Enquanto que em idades mais jovens, em uma fase mais inicial do prejuízo cognitivo, o fator chave para esse gatilho parece ser o estresse oxidativo e a neuroinflamação (DE OLIVEIRA et al., 2014b; MOREIRA et al., 2012b; THIRUMANGALAKUDI et al., 2008).

Apesar do fato do colesterol periférico ligado a lipoproteínas não atravessar a BHE, o 27-OH, o metabólito do colesterol mais abundante na periferia, pode representar a conexão entre o aumento nos níveis periféricos de colesterol e os prejuízos observados no SNC. O 27-OH é formado pela oxidação do colesterol através da enzima CYP27A1 que é expressa na maior parte dos órgãos e tecidos, e o alto nível de colesterol na periferia é associado com aumento na produção de 27-OH na circulação e aumento do transporte desse para o cérebro (HEVERIN et al., 2005). Estudos observacionais já correlacionaram os níveis periféricos de 27-OH com o declínio cognitivo (MATEOS et al., 2011; WANG et al., 2016b). Além disso, foi descrita uma associação positiva entre os níveis de 27-OH e o prejuízo cognitivo moderado (LIU et al., 2016). Estudos clínicos também revelaram níveis elevados do 27-OH, tanto no fluido cerebrospinal (LEONI et al., 2004; WANG et al., 2016a) quanto no tecido cerebral (HEVERIN et al., 2004), em indivíduos com a doença de Alzheimer.

Com base nesses achados, no presente estudo foi investigado se os prejuízos cognitivos observados em camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas seriam uma

consequência da produção exacerbada de 27-OH. Surpreendentemente, embora camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas apresentem aumento de 2-3x do colesterol total, apenas as fêmeas apresentaram aumento significativo nos níveis de 27-OH na periferia.

O transporte de 27-OH do sangue para o cérebro é dependente da taxa do seu metabolismo cerebral, bem como da integridade da BHE (ALI et al., 2013; LEONI et al., 2004). O cérebro possui um sistema eficiente para controlar o excesso de 27-OH, convertendo-o em 7-HOCA e, posteriormente, eliminando-o para a periferia. Este sistema inclui a ação das enzimas CYP27A1 e CYP7B1, sendo esta última restrita a neurônios (MEANEY et al., 2007). Tem sido demonstrado que em indivíduos com doenças neurológicas existe uma correlação positiva entre os níveis desse 7-HOCA no líquido cefalorraquidiano e aumento da permeabilidade da BHE (medida pelo influxo de albumina para cérebro), sendo esta correlação foi mais evidente em mulheres (SAEED et al., 2014). Recentemente, foi reportado por Parrado-Fernandez e colaboradores (2020) que mulheres metabolizam mais rapidamente ou de maneira mais eficiente o 27-OH, convertendo-o em 7-HOCA, enquanto os homens apresentam menor taxa desse metabolismo. Nesse mesmo estudo, uma tendência ao aumento da expressão da enzima CYP7B1, responsável pela conversão de 27-OHC em 7-HOCA, foi reportada em mulheres (PARRADO-FERNÁNDEZ et al., 2018; PARRADO-FERNANDEZ et al., 2020).

Deve ser destacado que, no sentido oposto ao que foi observado no modelo animal utilizado no presente estudo, onde fêmeas apresentaram aumento nos níveis periféricos de 27-OH, em humanos, é reportado que homens apresentam níveis circulantes de 27-OH mais elevados do que as mulheres (WUOLIKAINEN et al., 2014, DZELETOVIC et al., 1995). Entretanto, o influxo de 27-OH para cérebro é aumentado em homens em relação às mulheres (BERTOLOTTI et al., 2012; PARRADO-FERNANDEZ et al., 2020). Esse conjunto de dados, somado ao aumento da permeabilidade da BHE já reportado em camundongos machos LDLr^{-/-} (DE OLIVEIRA et al., 2020a), sugere que pode haver um maior influxo de 27-OH para o cérebro dos machos levando a uma redução periférica desse metabólito. Para confirmar essa hipótese, uma análise da permeabilidade da BHE em fêmeas LDLr^{-/-} e a dosagem de 27-OH no cérebro dos camundongos LDLr^{-/-} é necessária, sendo que estes resultados ainda não foram descritos na literatura.

Cabe ressaltar que os altos níveis de 27-OH encontrados nas fêmeas LDLr^{-/-} coincidem com o aumento da locomoção observado nesse grupo experimental. Fundamentando essa proposição, a injeção intravenosa de 27-OH em altas doses em ratos machos levou a prejuízo de memória acompanhado pelo aumento da distância percorrida no

labirinto aquático (ZHANG et al., 2015). Além disso, animais CYP27A1Tg (com altos níveis circulantes de 27-OH) também apresentam perfil de hiperlocomoção (dados não publicados – Grupo Angel-Cedazo Minguez).

Mesmo o 27-OH sendo um resultado da metabolização do colesterol e apresentar concentrações proporcionais a seu precursor, já foi demonstrado em camundongos CYP27A1Tg (que possuem produção aumentada de 27-OH) que os danos cerebrais causados pelos 27-OH independem dos níveis de colesterol. Neste mesmo estudo, os pesquisadores mostraram tanto em animais quanto em humanos que o 27-OH prejudica o metabolismo cerebral de glicose (CEDAZO-MÍNGUEZ et al., 2017).

O conhecimento disponível até o momento indica que a síntese e o metabolismo do colesterol no cérebro são independentes da periferia, sendo que, especialmente na idade adulta, o principal fornecimento de colesterol para os neurônios provém dos astrócitos (PFRIEGER, 2003). Porém, um estudo *in vitro* apontou para o 27-OH como uma molécula capaz de interferir na comunicação que ocorre entre neurônios e astrócitos durante a síntese de colesterol no SNC (WANG et al., 2020a). Levando em conta tais observações sobre a influência do 27-OH no metabolismo cerebral de colesterol bem como as diferenças sexuais observadas nos níveis desse oxisterol, foi elaborada a última pergunta experimental desta tese: *Altos níveis circulantes de 27-hidroxicolesterol causam diferente impacto na homeostase cerebral do colesterol em camundongos machos e fêmeas?* Para responder esta questão, investigamos a possível existência de alterações na expressão de genes e proteínas envolvidas na síntese cerebral de colesterol em ambos sexos utilizando camundongos CYP27A1Tg que apresentam altos níveis circulantes de 27-OH.

Os resultados do presente estudo indicam que, embora machos e fêmeas apresentem altos níveis periféricos de 27-OH neste modelo animal (MEIR et al., 2002), a expressão da enzima CYP7B1 é aumentada no hipocampo e córtex pré-frontal apenas nos machos transgênicos em relação a seu controle selvagem, o que sugere um aumento na produção de 7-HOCA apenas em machos expostos a uma alta concentração de 27-OH. O mesmo resultado foi observado após a incubação de células neuronais com o 27-OH. Seguindo essa observação, a expressão dos genes envolvidos na síntese cerebral de colesterol como SREBP1 e SREBP2, bem como dos genes que regulam a expressão de receptores que captam o colesterol como LDLr e LRP1, foi aumentada em machos CYP27A1Tg. Nas fêmeas transgênicas, apenas os genes LDLr e LRP1 estão regulados positivamente.

Corroborando estes achados, o aumento na expressão de LDLr e LRP1 também foi observado quando as células neuronais foram expostas ao 27-OH *in vitro*. Particularmente,

esse aumento da expressão do LDLr diante da exposição à altas concentrações de 27-OH nos leva a questionar como essa regulação ocorreria nas fêmeas LDLr^{-/-} que apresentaram altas concentrações de 27-OH porém não dispõem da maquinaria para síntese do receptor. Esta é uma situação factível em portadores de HF onde existem altos níveis de 27-OH circulantes (BAILA-RUEDA et al., 2014). De Oliveira e colaboradores (2021) demonstraram que camundongos LDLr^{-/-} machos de 3 meses apresentam um aumento na expressão do receptor LRP1. Entretanto, esse mecanismo compensatório não é suficiente para reverter os danos de memória observados (DE OLIVEIRA et al., 2020b). Engel e colaboradores (2019) também observaram em cultura de células neuronais que mesmo após a deleção do LDLr essas células ainda são capazes de captar o colesterol (ENGEL et al., 2019). Esses dados evidenciam que os efeitos observados neste estudo não se devam a uma deficiência na captação de colesterol, mas que possivelmente o próprio LDLr desempenha um papel na resposta dos PEPS e o desenvolvimento cerebral com a ausência do receptor também seja um fator importante a ser considerado. Essa hipótese é também reforçada por resultados clínicos, onde observa-se que pacientes que nascem com essa condição apresentam maior declínio cognitivo (ARIZA et al., 2016). Além disso, em ensaios pré-clínicos foi também demonstrado que abordagens capazes de aumentar a plasticidade cerebral, como o enriquecimento ambiental, aplicadas desde o nascimento (quando SNC está ainda se desenvolvendo) é capaz de melhorar alguns parâmetros comportamentais em animais LDLr^{-/-} (MOREIRA et al., 2013).

Fazendo uma análise geral dos genes que regulam a síntese (SREBP1 e 2) e a captação do colesterol cerebral (LDLr e LRP1), é possível inferir que os camundongos machos parecem sofrer maior influência do 27-OH proveniente da periferia sobre homeostase cerebral de colesterol, isso poderia ser devido a duas razões: i) uma maior permeabilidade da BHE; ii) uma maior síntese de 7-HOCA e este por sua vez estaria mediando os demais efeitos.

Neste sentido, foi também avaliado o possível envolvimento do metabólito 7-HOCA como mediador nessas alterações observadas em machos. Para isso, utilizamos animais com deleção do gene da CYP7B1 e avaliamos os respectivos genes envolvidos na homeostase do colesterol. Nesses animais com inibição da produção de 7-HOCA não foram observadas alterações na regulação dos genes, trazendo um forte indício de que os efeitos do 27-OH sobre a homeostase do colesterol no cérebro de machos expostos a altas concentrações desse oxisterol são mediadas pelo 7-HOCA.

Os efeitos do 7-HOCA no cérebro não estão bem elucidados, sendo assim, este trabalho trás as primeiras evidências de que esse pode ser o mediador dos efeitos do 27-OH sobre a homeostase cerebral de colesterol em machos. Além de elevadas concentrações plasmáticas e cerebrais de 27-OH na circulação dos animais nocautes para CYP7B1, são também observadas concentrações elevadas de 25-OH, o que impede que a discussão das diferenças observadas aqui, sejam limitadas apenas ao metabólito 7-HOCA (MELJON et al., 2019). Há muito tempo o 25-OH foi descrito como inibidor da ativação de SREBPs via ligação com o INSIG (gene indutor de insulina), freando a síntese endógena de colesterol. Este é também, possivelmente o mecanismo pelo qual ocorre o controle das concentrações cerebrais de colesterol destes animais dentro da normalidade (RADHAKRISHNAN et al., 2007). Das poucas evidências clínicas disponíveis, é apontado o aumento deste metabólito (7-HOCA) no líquido cefalorraquidiano de pacientes com danos no SNC, indicando um possível envolvimento deste metabólito nesses eventos (SAEED et al., 2014). Os dados aqui obtidos adicionam aos estudos pré-clínicos evidências de que o 7-HOCA possa estar mediando os efeitos do 27-OH sobre a homeostase do colesterol no cérebro. Porém, uma limitação desta etapa do presente estudo é que as avaliações foram realizadas somente em animais machos, o que nos impede de afirmar que isso é um achado dependente do sexo.

Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que camundongos selvagens machos e fêmeas, os quais apresentaram níveis normais de colesterol (cerca de 100 mg/dL) e de 27-OH (cerca de 300ng/mL), ausência de ativação astrocitária exacerbada e um adequado funcionamento da circuitaria hipocampal o que resulta em uma resposta excitatória pós-sináptica (PEPS) suficiente para uma boa resposta comportamental nos testes de memória. Em contraste, os camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas, os quais apresentam aumento nos níveis circulantes de colesterol (cerca de 200-250 mg/dL) associado a ativação astrocitária e a redução da plasticidade sináptica hipocampal observada através da redução (cerca de 50% em relação aos camundongos selvagens) no registro do PEPS o que resulta em um prejuízo comportamental nos testes de memória. Essa alteração funcional, está possivelmente relacionada à ausência do receptor LDL desde o neurodesenvolvimento ou, alternativamente, de um papel do receptor em si na sustentação da LTP, uma vez que sua deleção aguda em células neuronais não causou perturbações na maquinaria sináptica.

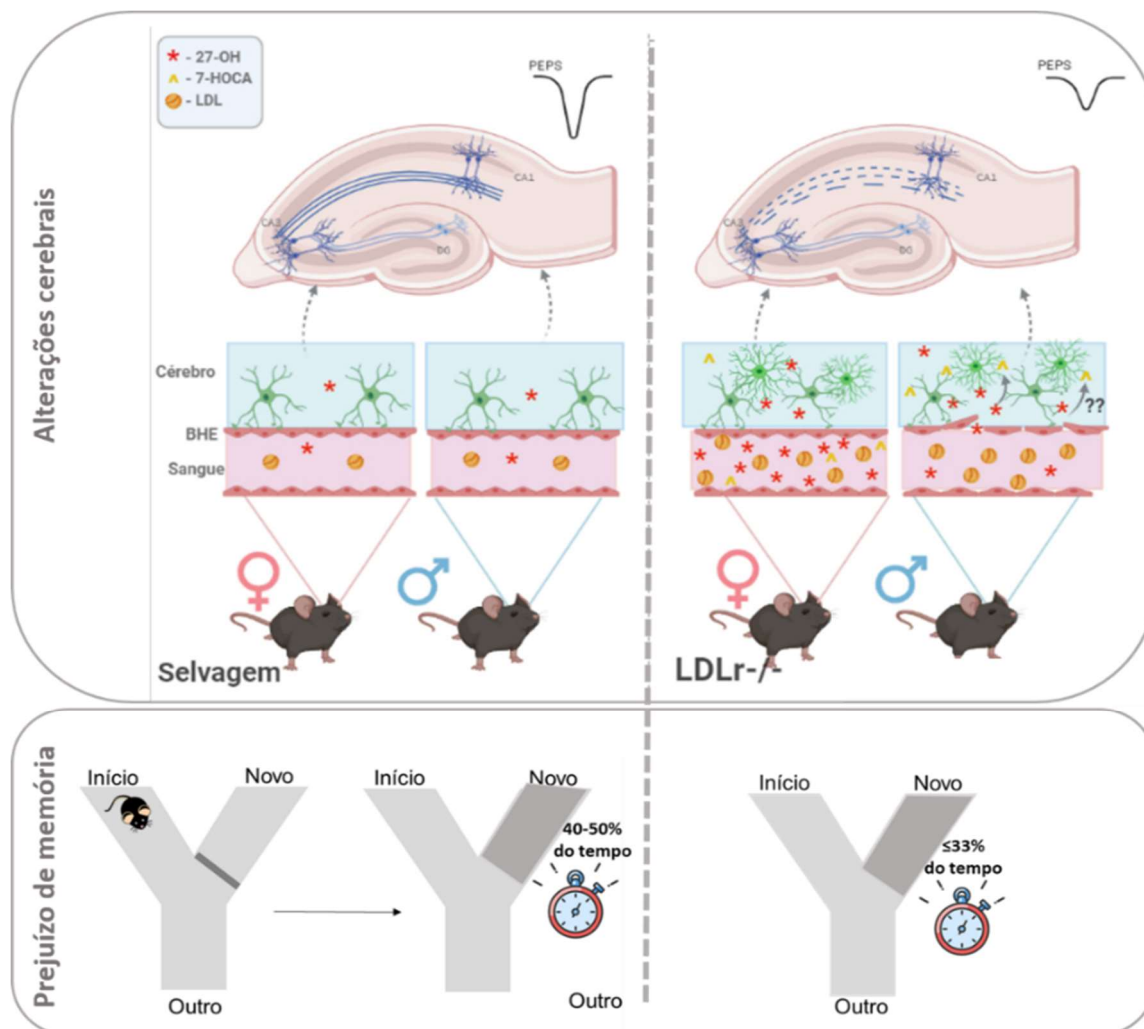
Os animais LDLr^{-/-} fêmeas apresentaram aumento significativo de 27-OH (cerca de 600 ng/mL) em relação aos demais grupos. Ademais, o prejuízo da BHE representado em machos LDLr^{-/-} foi previamente demonstrado (DE OLIVEIRA et al., 2020a), o que sugere que nesses animais, assim como observado na clínica, o influxo de 27-OH para o cérebro em

machos em situações de aumento de colesterol ou de 27-OH pode estar facilitado (Figura 30, lado direito). Ainda, utilizando camundongos CYP27A1Tg foi observado que machos parecem ser mais afetados, no que diz respeito a homeostase cerebral de colesterol, e apresentaram aumento na expressão da enzima CYP7B1, indicando aumento na conversão do 27-OH em 7-HOCA, o que sugere que diferenças sexuais na metabolização ou influxo de 27-OH para o cérebro. Esses dados permitem uma visão geral das diferenças sexuais sobre o controle que os oxisteróis exercem sobre a homeostase do colesterol. Entretanto, estudos adicionais são necessários para identificar alvos moleculares responsáveis essas diferenças e suas consequências.

O presente trabalho adiciona à literatura novas evidências de que animais LDLr^{-/-} de ambos os sexos apresentam prejuízos de memória, especialmente aquelas que dependem do funcionamento da circuitaria hipocampal. Nesse modelo animal, os níveis periféricos de 27-OH não são suficientes para explicar os prejuízos de funcionalidade hipocampal observados, e parecem estar mais relacionados à própria ausência do LDLr e/ou à exposição do colesterol desde o nascimento (Figura 30). Além disso, de maneira pioneira, foi reportado aqui que quando se analisa isoladamente o efeito de altos níveis de 27-OH em machos e fêmeas, observou que os genes envolvidos no metabolismo cerebral de colesterol em machos são mais afetados.

O esclarecimento das diferenças no metabolismo cerebral do colesterol entre machos e fêmeas pode indicar novos alvos para abordagens terapêuticas, representando um tratamento mais adequado de acordo com as particularidades sexuais.

Figura 30. Resumo ilustrado simplificado dos principais achados desta tese.



7. SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Camundongos LDLr^{-/-} machos apresentaram prejuízos de memória espacial, de reconhecimento e memória aversiva, quando comparados com o grupo controle selvagem. Enquanto que as fêmeas LDLr^{-/-} apresentaram apenas prejuízos de memória espacial.
- Camundongos LDLr^{-/-} fêmeas apresentaram aumento da atividade locomotora em comparação aos seus respectivos controles selvagens e também em comparação aos camundongos machos LDLr^{-/-}.
- Camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas apresentaram prejuízo no PEPS na via colateral de Schafer na região CA1 do hipocampo. Esta alteração não foi relacionada com alterações no imunoconteúdo de proteínas envolvidas na manutenção e estruturação sináptica (sinaptopodina, aromatase, SNAP25, PSD95) em fêmeas LDLr^{-/-}, porém uma redução da proteína SNAP25 foi observada no hipocampo de LDLr^{-/-} machos.
- A redução na expressão do gene LDLr^{-/-} em cultura primária de neurônios não alterou a regulação de genes das proteínas SNAP25, PSD95 e Arc.
- Camundongos machos e fêmeas LDLr^{-/-} apresentaram aumento da imunomarcção para GFAP na região CA1 do hipocampo, mas não apresentaram alterações do volume hipocampal total.
- Camundongos machos e fêmeas LDLr^{-/-} apresentaram aumento significativo do colesterol total circulante quando comparado com seus respectivos controles. Entretanto, apenas as fêmeas LDLr^{-/-} apresentaram aumento significativo no metabólito oxidado do colesterol, 27-OH.
- Camundongos machos CYP27A1 apresentaram aumento na expressão de genes CYP7B1, SREBP1, SREBP2, LDLr e LRP1. Enquanto que camundongos fêmeas CYP27A1 apresentaram aumento da expressão de genes LDLr e LRP1.
- Camundongos CYP7B1^{-/-} apresentaram alterações nos genes SREBP1, SREBP2, LDLr e LRP1.

8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas apresentam prejuízo de memória dependente de hipocampo associado a prejuízo funcional nessa estrutura, o que não está relacionado a mudanças no imunoconteúdo de proteínas sinápticas. Em conjunto, com os resultados obtidos no modelo animal de deleção do LDLr e os resultados obtidos com a deleção parcial do receptor especificamente em neurônios nos permitem inferir que o prejuízo funcional pode ser decorrente da ausência do receptor desde o neurodesenvolvimento ou do papel do próprio receptor no PEPS.

Com os dados aqui encontrados reforçamos a ideia de que a ausência do LDLr associado à altos níveis de colesterol periférico desde o nascimento na condição da HF, é determinante para observação dos prejuízos cognitivos e independe dos níveis periféricos de 27-OH, uma vez que apenas fêmeas apresentaram altas concentrações periféricas deste metabólito contudo ambos apresentaram prejuízos cognitivos. Por outro lado, isso não exclui o 27-OH como a conexão entre o colesterol periférico e o SNC em outros contextos (que não a HF). Aqui observamos em camundongos com altas concentrações circulantes de 27-OH que os genes relacionados à homeostase cerebral do colesterol no hipocampo e córtex pré-frontal são mais afetados em machos. Esse dado abre um leque de possibilidades para explorar o impacto dos oxisteróis sobre o cérebro de machos e fêmeas e como isso pode estar relacionado a alterações de memória.

9. REFERÊNCIAS

- ALI, Z. et al. On the regulatory role of side-chain hydroxylated oxysterols in the brain. Lessons from CYP27A1 transgenic and Cyp27a1 ^{-/-} mice 1. 2013. *Journal of Lipid Research* 54(4):1033-43. doi: 10.1194/jlr.M034124
- ANDERSON, R. G. W.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. 1977. *Cell* 10(3):351-64. doi: 10.1016/0092-8674(77)90022-8.
- ANDERSON, R. G. W.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. 1976. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Jul;73(7):2434-8. doi: 10.1073/pnas.73.7.2434.
- ANDRÉ ARPAD FALUDI et al. Atualização Da Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose - 2017. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. Disponível em: http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02_DIRETRIZ_DE_DISLIPIDEMIAS.pdf
- ARAQUE, A. et al. Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. 1999. *Trends in Neurosciences* 22(5):208-15. doi: 10.1016/s0166-2236(98)01349-6.
- ARIZA, M. et al. Neuropsychological performance of young familial hypercholesterolemia patients. 2016. *European Journal of Internal Medicine* 34:e29-e31. doi: 10.1016/j.ejim.2016.05.009.
- ARNOLDUSSEN, I. A. C. et al. Butyrate restores HFD-induced adaptations in brain function and metabolism in mid-adult obese mice. 2017. *International Journal of Obesity* 41(6):935-944. doi: 10.1038/ijo.2017.52.
- ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. 2009. *Behavioural Brain Research* 204(1):206-11. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.005.
- BABIKER, A. et al. Patients with atherosclerosis may have increased circulating levels of 27-hydroxycholesterol and cholestenic acid. 2005. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 65(5):365-75. doi: 10.1080/00365510510025746.

- BAHIA, L. R. et al. Estimated costs of hospitalization due to coronary artery disease attributable to familial hypercholesterolemia in the Brazilian public health system. 2018. *Archives of Endocrinology and Metabolism* 62(3):303-308. doi: 10.20945/2359-3997000000030.
- BAILA-RUEDA, L. et al. Bile acid synthesis precursors in familial combined hyperlipidemia: The oxysterols 24S-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol. 2014. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446(3):731-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.131.
- BALAKUMAR, P.; MAUNG-U, K.; JAGADEESH, G. Prevalence and prevention of cardiovascular disease and diabetes mellitus. 2016. *Pharmacological Research* (113) 600-609. doi:10.1016/j.phrs.2016.09.040.
- BALLA, S. et al. Women Living with Familial Hypercholesterolemia: Challenges and Considerations Surrounding Their Care. 2020. *Current Atherosclerosis Reports* 22(10):60. doi: 10.1007/s11883-020-00881-5.
- BARK, C. I. et al. Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development. 1995. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(5):1510-4. doi: 10.1073/pnas.92.5.1510.
- BASU, S. K. et al. Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts. 1981. *Cell* 24(2):493-502. doi: 10.1016/0092-8674(81)90340-8.
- BEAM, C. R. et al. Differences between Women and Men in Incidence Rates of Dementia and Alzheimer's Disease. 2018. *Journal of Alzheimer's Disease* 64(4):1077-1083. doi: 10.3233/JAD-180141.
- BÉÏQUE, J. C.; ANDRADE, R. PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. 2003. *Journal of Physiology* 546(Pt 3):859-67. doi: 10.1113/jphysiol.2002.031369.
- BELLINGER, F. P. et al. Reduced long-term potentiation in the dentate gyrus of transgenic mice with cerebral overexpression of interleukin-6. 1995. *Neuroscience Letters* 198(2):95-8. doi: 10.1016/0304-3940(95)11976-4.
- BENARROCH, E. E. Brain cholesterol metabolism and neurologic disease. 2008. *Neurology* 71(17):1368-73. doi: 10.1212/01.wnl.0000333215.93440.36.

- BENITO-VICENTE, A. et al. Replacement of cysteine at position 46 in the first cysteine-rich repeat of the LDL receptor impairs apolipoprotein recognition. 2018. *PLoS ONE* 13(10):e0204771. doi: 10.1371/journal.pone.0204771.
- BERBERICH, A. J.; HEGELE, R. A. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. 2019. *Nature Reviews Cardiology*. 16(1):9-20. doi: 10.1038/s41569-018-0052-6.
- BERTOLOTI, M. et al. Increased appearance rate of 27-hydroxycholesterol in vivo in hypercholesterolemia: A possible compensatory mechanism. 2012. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(10):823-30. doi: 10.1016/j.numecd.2011.02.009.
- BEVAN, M. D. Motor Control: A Basal Ganglia Feedback Circuit for Action Suppression. 2021. *Current Biology* 31(4):R191-R193. doi: 10.1016/j.cub.2020.11.067.
- BJÖRKHEM, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? 2008. *Journal of Clinical Investigation* 110(6):725-30. doi: 10.1172/JCI16388.
- BJÖRKHEM, I.; DICZFALUSY, U.; LÜTJOHANN, D. Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms. 1999. *Current Opinion in Lipidology* 10(2):161-5. doi: 10.1097/00041433-199904000-00010.
- BJÖRKHEM, I.; LEONI, V.; MEANEY, S. Genetic connections between neurological disorders and cholesterol metabolism. 2010. *Journal of Lipid Research* 51(9):2489-503. doi: 10.1194/jlr.R006338.
- BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L.; MORRIS, R. G. M. Synaptic plasticity in health and disease: Introduction and overview. 2014. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369(1633):20130129. doi: 10.1098/rstb.2013.0129.
- BLISS, T. V. P.; GARDNER-MEDWIN, A. R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. 1973. *The Journal of Physiology* 232(2):357-74. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010274.
- BODIN, K. et al. Metabolism of 4 β -hydroxycholesterol in humans. 2002. *Journal of Biological Chemistry* 277(12):2130-5. doi: 10.1074/jbc.M200293-jlr200.
- BORRONI, M. V.; VALLÉS, A. S.; BARRANTES, F. J. The lipid habitats of neurotransmitter receptors in brain. 2016. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*

1858(11):2662-2670. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.07.005.

BORTOLOTTO, Z. A. et al. Synaptic plasticity in the hippocampal slice preparation. 2011. *Current Protocols in Neuroscience* (6) 6.13. doi: 10.1002/0471142301.ns0613s54.

BROWN, M. S.; ANDERSON, R. G. W.; GOLDSTEIN, J. L. Recycling receptors: The round-trip itinerary of migrant membrane proteins. 1983. *Cell* 32(3):663-7. doi: 10.1016/0092-8674(83)90052-1.

BROWN, M. S.; DANA, S. E.; GOLDSTEIN, J. L. Regulation of 3 hydroxy 3 methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. 1973. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(7):2162-6. doi: 10.1073/pnas.70.7.216.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3 hydroxy 3 methylglutaryl coenzyme A reductase activity. 1974. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71(3):788-92. doi: 10.1073/pnas.71.3.788.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. 1975. *Cell*, 6(3):307-16. doi: 10.1016/0092-8674(75)90182-8.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. 1986. *Science* 232(4746):34-47. doi: 10.1126/science.3513311.

BUKIYA, A. N. et al. Cholesterol up-regulates neuronal G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channel activity in the hippocampus. 2017. *Journal of Biological Chemistry* 292(15):6135-6147. doi: 10.1074/jbc.M116.753350.

CAJIGAS, I. J.; WILL, T.; SCHUMAN, E. M. Protein homeostasis and synaptic plasticity. 2010. *EMBO Journal* 29(16):2746-52. doi: 10.1038/emboj.2010.173.

CAO, Q. et al. The Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2020. *Journal of Alzheimer's disease* 73(3):1157-1166. doi: 10.3233/JAD-191092.

CEDAZO-MÍNGUEZ, A. et al. 27-Hydroxycholesterol impairs neuronal glucose uptake through an IRAP/GLUT4 system dysregulation. 2017. *The Journal of Experimental Medicine* 214(3):699-717. doi: 10.1084/jem.20160534.

- CHELLA KRISHNAN, K.; MEHRABIAN, M.; LUSIS, A. J. Sex differences in metabolism and cardiometabolic disorders. 2018. *Current opinion in lipidology* 29(5):404-410. doi: 10.1097/MOL.0000000000000536.
- CHIANG, J. Y. L.; LI, T. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. 2009. *PPAR Research* 501739. doi: 10.1155/2009/501739.
- CLEGG, D. et al. Sex hormones and cardiometabolic health: Role of estrogen and estrogen receptors. 2017. *Endocrinology* 158(5):1095-1105. doi: 10.1210/en.2016-1677.
- COOPER, A. D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. 1997. *Journal of Lipid Research* 38(11):2173-92.
- COUTINHO, E. R. et al. Familial hypercholesterolemia and cardiovascular disease in older individuals. 2021. *Atherosclerosis* 318:32-37. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.12.012.
- CRUZ-SANCHEZ, F. et al. Cognitive impairment in heterozygous familial hypercholesterolemia. 2008. *Alzheimer's & Dementia*. 01-01-08.
- CUCHEL, M. et al. Homozygous familial hypercholesterolaemia: New insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. 2014. *European Heart Journal* 35(32):2146-57. doi: 10.1093/eurheartj/ehu274.
- DA SILVA, T. R. et al. The role of prelimbic and anterior cingulate cortices in fear memory reconsolidation and persistence depends on the memory age. 2020. *Learning and Memory* 27(8):292-300. doi: 10.1101/lm.051615.120.
- 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. 2011. *Neuroscience* 197:99-106. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.09.009.
- DE OLIVEIRA, J. et al. Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. 2013. *Neurochemical Research* 38(10):2028-36. doi: 10.1007/s11064-013-1110-4.

- DE OLIVEIRA, J. et al. Increased susceptibility to amyloid- β -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. 2014a. *Journal of Alzheimer's Disease* 41(1):43-60. doi: 10.3233/JAD-132228.
- DE OLIVEIRA, J. et al. Increased susceptibility to amyloid- β -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. 2014b. *Journal of Alzheimer's Disease* 41(1):43-60. doi: 10.3233/JAD-132228.
- DE OLIVEIRA, J. et al. High Cholesterol Diet Exacerbates Blood-Brain Barrier Disruption in LDLr^{-/-} Mice: Impact on Cognitive Function. 2020a. *Journal of Alzheimer's Disease* 78(1):97-115. doi: 10.3233/JAD-200541.
- DE OLIVEIRA, J. et al. LDL Receptor Deficiency Does not Alter Brain Amyloid- β Levels but Causes an Exacerbation of Apoptosis. 2020b. *Journal of Alzheimer's Disease* 73(2):585-596. doi: 10.3233/JAD-190742.
- DE PAULA, G. C. et al. Red wine consumption mitigates the cognitive impairments in low-density lipoprotein receptor knockout (LDLr^{-/-}) mice. 2020. *Nutritional Neuroscience* 1-11. doi: 10.1080/1028415X.2019.1704472.
- DELLER, T. et al. Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: Localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. 2000. *Journal of Comparative Neurology* 418(2):164-81. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(20000306)418:2<164::aid-cne4>3.0.co;2-0.
- DUANE, W. C.; JAVITT, N. B. 27-Hydroxycholesterol: Production rates in normal human subjects. 1999. *Journal of Lipid Research* 40(7):1194-9. doi: 10.1016/S0022-2275(20)33481-7
- DZELETOVIC, S. et al. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. 1995. *Analytical Biochemistry* 225(1):73-80. doi: 10.1006/abio.1995.1110.
- MCGEER., E.G.,; MCGEER.,P.L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A field in its infancy. 2010. *Journal of Alzheimer's Disease* 19(1):355-61. doi: 10.3233/JAD-2010-1219.
- ELDER, G. A. et al. Elevated plasma cholesterol does not affect brain A β in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. 2007. *Journal of Neurochemistry* 102(4):1220-31.

doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04614.x.

ELDER, G. A. et al. Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. 2008. *Behavioural Brain Research* 191(2):256-65. doi: 10.1016/j.bbr.2008.03.036.

ENGEL, D. F. Evidências experimentais da associação entre a Hipercolesterolemia e a depressão: Envolvimento da neurogênese hipocampal adulta. 2016. Tese, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ENGEL, D. F. et al. Impaired adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of familial hypercholesterolemia: A role for the LDL receptor and cholesterol metabolism in adult neural precursor cells. 2019. *Molecular Metabolism* 30:1-15. doi: 10.1016/j.molmet.2019.09.002.

ESTERBAUER, H. et al. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. 1989. *Free Radical Research* 6(1):67-75. doi: 10.3109/10715768909073429.

FANSELOW, M. S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. 1980. *The Pavlovian Journal of Biological Science : Official Journal of the Pavlovian* 15(4):177-82. doi: 10.1007/BF03001163.

FERGUSON, D.; SAPOLSKY, R. Mineralocorticoid Receptor Overexpression Differentially Modulates Specific Phases of Spatial and Nonspatial Memory. 2007. *Journal of Neuroscience* 27(30):8046-52. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1187-07.2007.

FESTER, L. et al. Synaptopodin is regulated by aromatase activity. 2017. *Journal of Neurochemistry* 140(1):126-139. doi: 10.1111/jnc.13889.

FRANCIS, G. A. et al. Cerebral cholesterol granuloma in homozygous familial hypercholesterolemia. 2005. *Canadian Medical Association or its licensors*. 172(4):495-7. doi: 10.1503/cmaj.1041152.

FRYER, J. D. et al. The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice. 2005. *Journal of Biological Chemistry* 280(27):25754-9. doi: 10.1074/jbc.M502143200.

GABCOVA-BALAZIOVA, D. et al. Molecular-genetic aspects of familial

hypercholesterolemia. 2015. *Endocrine Regulations* 49(3):164-81. doi: 10.4149/endo_2015_03_164.

GAO, H. et al. Effects of Oat Fiber Intervention on Cognitive Behavior in LDLR^{-/-}Mice Modeling Atherosclerosis by Targeting the Microbiome-Gut-Brain Axis. 2020. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68(49):14480-14491. doi: 10.1021/acs.jafc.0c05677.

GAROLERA, M. et al. Episodic memory performance in young adults with familial hypercholesterolemia. 2016. *Atherosclerosis* 252 (32) doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.336.

GHRIBI, O. Potential mechanisms linking cholesterol to Alzheimer's disease-like pathology in rabbit brain, hippocampal organotypic slices, and skeletal muscle. 2008. *Journal of Alzheimer's Disease* 15(4):673-84. doi: 10.3233/jad-2008-15412.

GILBERT, P. E.; KESNER, R. P.; LEE, I. Dissociating hippocampal subregions: A double dissociation between dentate gyrus and CA1. 2001. *Hippocampus* 11(6):626-36. doi: 10.1002/hipo.1077.

GOLDBERG, A. C. et al. Familial hypercholesterolemia: Screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients: Clinical guidance from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. 2011. *Journal of Clinical Lipidology* 5(3 Suppl):S1-8. doi: 10.1016/j.jacl.2011.04.003.

GOLDSTEIN, J. L.; ANDERSON, R. G. W.; BROWN, M. S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. 1979. *Nature* 279(5715):679-85. doi: 10.1038/279679a0.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3 hydroxy 3 methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. 1973. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(10):2804-8. doi: 10.1073/pnas.70.10.2804.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. 1974b. *Journal of Biological Chemistry* 25;249(16):5153-62.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. 2009. *Arteriosclerosis,*

Thrombosis, and Vascular Biology 29(4) doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179564.

HADJIPHILIPPOU, S.; RAY, K. K. Lipids and Lipoproteins in Risk Prediction. 2018. *Cardiology Clinics* 36(2):213-220. doi: 10.1016/j.ccl.2017.12.002.

HARADA, P. H. et al. Familial hypercholesterolemia prevalence in an admixed racial society: Sex and race matter. The ELSA-Brasil. 2018. *Atherosclerosis*. 277:273-277. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.021.

HARLAND, B. C. et al. Dorsal CA1 Hippocampal Place Cells Form a Multi-Scale Representation of Megaspaces. 2021. *Current Biology* 31(10):2178-2190.e6. doi: 10.1016/j.cub.2021.03.003.

HENDRIKX, T. et al. Hematopoietic overexpression of Cyp27a1 reduces hepatic inflammation independently of 27-hydroxycholesterol levels in Ldlr / mice. 2015. *Journal of Hepatology* 62(2):430-6. doi: 10.1016/j.jhep.2014.09.027.

HEVERIN, M. et al. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. 2004. *Journal of Lipid Research* 45(1):186-93. doi: 10.1194/jlr.M300320-JLR200.

HEVERIN, M. et al. Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. 2005. *Journal of Lipid Research* 46(5):1047-52. doi: 10.1194/jlr.M500024-JLR200.

HEVERIN, M. et al. 27-Hydroxycholesterol mediates negative effects of dietary cholesterol on cognition in mice. 2015. *Behavioural Brain Research* 278:356-9. doi: 10.1016/j.bbr.2014.10.018.

HEVERIN, M. et al. On the regulatory importance of 27-hydroxycholesterol in mouse liver. 2017. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 169:10-21. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.02.001.

HOFF, H. F. et al. Modification of low density lipoprotein with 4-hydroxynonenal induces uptake by macrophages. 1989. *Arteriosclerosis* 9(4):538-49. doi: 10.1161/01.atv.9.4.538.

HOKKANEN, K.; TIRRONEN, A.; YLÄ-HERTTUALA, S. Intestinal lymphatic vessels and their role in chylomicron absorption and lipid homeostasis. 2019. *Current Opinion in Lipidology*, 30(5):370-376. doi: 10.1097/MOL.0000000000000626.

- HOLVEN, K. B. et al. Sex differences in cholesterol levels from birth to 19 years of age may lead to increased cholesterol burden in females with FH. 2018. *Journal of Clinical Lipidology* 12(3):748-755.e2. doi: 10.1016/j.jacl.2018.02.021.
- HUANG, S. et al. Mechanism of LDL binding and release probed by structure-based mutagenesis of the LDL receptor. 2010. *Journal of Lipid Research* 51(2):297-308. doi: 10.1194/jlr.M000422.
- HUR, S. J.; PARK, G. B.; JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. 2007. *Food Control*. 18(8): 939-947. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.05.008
- HWANG, L. L. et al. Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. 2010. *Obesity* 18(3):463-9. doi: 10.1038/oby.2009.273.
- HYTTINEN, L. et al. Long-term statin therapy is associated with better episodic memory in aged familial hypercholesterolemia patients in comparison with population controls. 2010. *Journal of Alzheimer's Disease* 21(2):611-7. doi: 10.3233/JAD-2010-091381.
- IMTIAZ, B. et al. Postmenopausal hormone therapy and Alzheimer disease: A prospective cohort study. 2017. *Neurology* 88(11):1062-1068. doi: 10.1212/WNL.0000000000003696.
- IRFAN, M. et al. SNAP-25 isoforms differentially regulate synaptic transmission and long-term synaptic plasticity at central synapses. 2019. *Scientific Reports* 9(1):6403. doi: 10.1038/s41598-019-42833-3.
- ISHIBASHI, S. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. 1993. *Journal of Clinical Investigation* 92(2):883-93. doi: 10.1172/JCI116663.
- IULIANO, L. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. 2011. *Chemistry and Physics of Lipids* 164(6):457-68. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2011.06.006.
- JAHRLING, J. B. et al. mTOR drives cerebral blood flow and memory deficits in LDLR^{-/-} mice modeling atherosclerosis and vascular cognitive impairment. 2018. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 38(1):58-74. doi: 10.1177/0271678X17705973.
- JAKOBSSON, T. et al. Liver X receptor biology and pharmacology: New pathways,

- challenges and opportunities. 2012. *Trends in Pharmacological Sciences* 33(7):394-404. doi: 10.1016/j.tips.2012.03.013.
- JOHNSON, L. A. et al. Apolipoprotein E-low density lipoprotein receptor interaction affects spatial memory retention and brain ApoE levels in an isoform-dependent manner. 2014. *Neurobiology of Disease* 64:150-62. doi: 10.1016/j.nbd.2013.12.016.
- JÜRGENS, G. et al. Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation - Characterization and pathophysiological implications. 1987. *Chemistry and Physics of Lipids* 45(2-4):315-36. doi: 10.1016/0009-3084(87)90070-3.
- KALAYCI, R. et al. Influence of hypercholesterolemia and hypertension on the integrity of the blood-brain barrier in rats. 2009. *International Journal of Neuroscience* 119(10):1881-904. doi: 10.1080/14647270802336650.
- KASTER, M. P. et al. Caffeine acts through neuronal adenosine A_{2A} receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(25):7833-8. doi: 10.1073/pnas.1423088112.
- KOTTI, T. J. et al. Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. 2006. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(10):3869-74. doi: 10.1073/pnas.0600316103.
- KOUDINOV, A. R.; KOUDINOVA, N. V. Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. 2001. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(10):1858-60. doi: 10.1096/fj.00-0815fje.
- KRAFT, P. et al. Hypercholesterolemia induced cerebral small vessel disease. 2017. *PLoS ONE* 2(8):e0182822. doi: 10.1371/journal.pone.0182822.
- KRÄMER-ALBERS, E. M. et al. Perturbed interactions of mutant proteolipid protein/DM20 with cholesterol and lipid rafts in oligodendroglia: Implications for dysmyelination in spastic paraplegia. 2006. *Journal of Neuroscience* 26(45):11743-52. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3581-06.2006.
- KURODA, T. et al. Increased Presence of Cerebral Microbleeds Correlates With Ventricular Enlargement and Increased White Matter Hyperintensities in Alzheimer's Disease. 2020. *Frontiers in Aging Neuroscience* 12:13. doi: 10.3389/fnagi.2020.00013.

- LANGBEIN, H. et al. Impact of high-fat diet and voluntary running on body weight and endothelial function in LDL receptor knockout mice. 2015. *Atherosclerosis Supplements* 18:59-66. doi: 10.1016/j.atherosclerosissup.2015.02.010.
- LAPPANO, R. et al. The cholesterol metabolite 25-Hydroxycholesterol activates estrogen receptor α -Mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes. 2011. *PLoS ONE* 6(1):e16631. doi: 10.1371/journal.pone.0016631.
- LEONI, V. et al. Diagnostic use of cerebral and extracerebral oxysterols. 2004. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 42(2):186-91. doi: 10.1515/CCLM.2004.034.
- LI-HAWKINS, J. et al. Disruption of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene in mice. 2000. *Journal of Biological Chemistry* 275(22):16536-42. doi: 10.1074/jbc.M001811200.
- LI, H. et al. Rare intracranial cholesterol deposition and a homozygous mutation of LDLR in a familial hypercholesterolemia patient. 2015. *Gene* 569(2):313-7. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.071.
- LINDGREN, F. T.; ELLIOTT, H. A.; GOFMAN, J. W. The ultracentrifugal characterization and isolation of human blood lipids and lipoproteins, with applications to the study of atherosclerosis. 1951. *Journal of Physical and Colloid Chemistry* 55(1):80-93. doi: 10.1021/j150484a010.
- LOERA-VALENCIA, R. et al. Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. 2019. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 190:104-114. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.03.003.
- LOPES, J. B. et al. Efficacy of Donepezil for Cognitive Impairments in Familial Hypercholesterolemia: Preclinical Proof of Concept. 2015. *CNS Neuroscience and Therapeutics* 21(12):964-6. doi: 10.1111/cns.12479.
- MABUCHI, H. et al. Serum lipids and coronary heart disease in heterozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku district of Japan. 1977. *Atherosclerosis* 28(4):417-23. doi: 10.1016/0021-9150(77)90068-5.
- MACHADO, A. E. et al. Hypercholesterolemia impairs contextual fear conditioning memory formation in female mice: Evidence for cholinergic dysfunction. 2018. *NeuroReport* 29(13):1140-1143. doi: 10.1097/WNR.0000000000001091.

- MAIOLI, S. et al. Is It Possible to Improve Memory Function by Upregulation of the Cholesterol 24S-Hydroxylase (CYP46A1) in the Brain? 2013. *PLoS ONE* 8(7):e68534. doi: 10.1371/journal.pone.0068534.
- MARTÍNEZ-OLIVÁN, J. et al. The closed conformation of the LDL receptor is destabilized by the low Ca⁺⁺ concentration but favored by the high Mg⁺⁺ concentration in the endosome. 2015. *FEBS Letters* 589(23):3534-40. doi: 10.1016/j.febslet.2015.10.014.
- MARWARHA, G. et al. Leptin reduces the accumulation of A β and phosphorylated tau induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit organotypic slices. 2010. *Journal of Alzheimer's Disease* 19(3):1007-19. doi: 10.3233/JAD-2010-1298.
- MATEOS, L. et al. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein in rodent brain is down-regulated by high fat diet in vivo and by 27-hydroxycholesterol in vitro. 2009. *Brain Pathology* 19(1):69-80. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00174.x.
- MATEOS, L. et al. Upregulation of brain renin angiotensin system by 27-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease. 2011. *Journal of Alzheimer's Disease* 24(4):669-79. doi: 10.3233/JAD-2011-101512.
- MATHEUS, F. C. et al. Decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory deficits in 6-OHDA-lesioned rats. 2016. *Behavioural Brain Research* 301:43-54. doi: 10.1016/j.bbr.2015.12.011.
- MATHEWS, E. S. et al. Mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase I reveals requirements for isoprenoid and cholesterol synthesis in oligodendrocyte migration arrest, axon wrapping, and myelin gene expression. 2014. *Journal of Neuroscience* 34(9):3402-12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4587-13.2014.
- MAUCH, D. H. et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. 2001. *Science* 294(5545):1354-7. doi: 10.1126/science.294.5545.1354.
- MEANEY, S. et al. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: Critical importance of the position of the oxygen function. 2002. *Journal of Lipid Research* 43(12):2130-5. doi: 10.1194/jlr.m200293-jlr200.
- MEIR, K. et al. Human sterol 27-hydroxylase (CYP27) overexpressor transgenic mouse model. Evidence against 27-hydroxycholesterol as a critical regulator of cholesterol homeostasis. 2002. *Journal of Biological Chemistry* 277(37):34036-41. doi:

10.1074/jbc.M201122200.

MELJON, A. et al. Mining for oxysterols in *cyp7b1*^{-/-} mouse brain and plasma: Relevance to spastic paraplegia type 5. 2019. *Biomolecules* 9(4):149. doi: 10.3390/biom9040149.

MERCHENTHALER, I.; DELLOVADE, T. L.; SHUGHRUE, P. J. Neuroprotection by Estrogen in Animal Models of Global and Focal Ischemia. 2003. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1007:89-100. doi: 10.1196/annals.1286.009.

MERINO-SERRAIS, P. et al. 27-Hydroxycholesterol Induces Aberrant Morphology and Synaptic Dysfunction in Hippocampal Neurons. 2019. *Cerebral cortex* 29(1):429-446. doi: 10.1093/cercor/bhy274.

MOREIRA, E. L. et al. Does methylmercury-induced hypercholesterolemia play a causal role in its neurotoxicity and cardiovascular disease? 2012a. *Toxicological Sciences*. 130(2):373-82. doi: 10.1093/toxsci/kfs252.

MOREIRA, E. L. G. et al. Age-Related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}): Evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. 2012b. *Journal of Alzheimer's Disease* 32(2):495-511. doi: 10.3233/JAD-2012-120541.

MOREIRA, E. L. G. et al. Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia. 2013. *Neuroscience Letters* 541:193-8. doi: 10.1016/j.neulet.2013.02.043.

MOREIRA, E. L. G. et al. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: Up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? 2014. *Journal of Neural Transmission* 121(4):415-26. doi: 10.1007/s00702-013-1107-9.

MOUZAT, K. et al. Regulation of brain cholesterol: What role do liver X receptors play in neurodegenerative diseases? 2019. *International Journal of Molecular Sciences* 20(16):3858. doi: 10.3390/ijms20163858.

MOZAFFARIAN, D. et al. Executive summary: Heart disease and stroke statistics-2016 update: A Report from the American Heart Association 2016. *Circulation* 133(4):447-54. doi: 10.1161/CIR.0000000000000366.

- MULDER, M. et al. Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. 2004. *Neurobiology of Disease* 16(1):212-9. doi: 10.1016/j.nbd.2004.01.015.
- MULDER, M. et al. LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. 2007. *Neuroscience Research* 59(3):251-6. doi: 10.1016/j.neures.2007.07.004.
- MÜLLER, C. Xanthomata, Hypercholesterolemia, Angina Pectoris. 1938. *Acta Medica Scandinavica* 95(S89): 75-84. doi: 10.1111/j.0954-6820.1938.tb19279.x.
- MUTEMBEREZI, V.; GUILLEMOT-LEGRIS, O.; MUCCIOLI, G. G. Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. 2016. *Progress in Lipid Research* 64:152-169. doi: 10.1016/j.plipres.2016.09.002.
- MYTILINAIIOU, M. et al. Familial hypercholesterolemia: New horizons for diagnosis and effective management. 2018. *Frontiers in Pharmacology* 9:707. doi: 10.3389/fphar.2018.00707.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 2013. *Regulation* 6 ed.
- NEVIUS, E. et al. Oxysterols and EB12 promote osteoclast precursor migration to bone surfaces and regulate bone mass homeostasis. 2015. *Journal of Experimental Medicine* 212(11): 1931–1946. doi: 10.1084/jem.20150088
- NICOLL, R. A. A Brief History of Long-Term Potentiation. 2017. *Neuron* 93(2):281-290. doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.015.
- NUTHIKATTU, S. et al. Lipotoxic injury differentially regulates brain microvascular gene expression in male mice. 2020. *Nutrients* 12(6):1771. doi: 10.3390/nu12061771.
- OREHEK, A. J. Dementia Improvement after Plasma Exchange for Familial Hypercholesterolemia. 2016. *Case Reports in Neurological Medicine* 6121878. doi: 10.1155/2016/6121878.
- PALINSKI, W. et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. 1989. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(4):1372-6. doi: 10.1073/pnas.86.4.1372.

- PAPPOLLA, M. A. et al. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. 2003. *Neurology* 61(2):199-205. doi: 10.1212/01.wnl.0000070182.02537.84.
- PARRADO-FERNANDEZ, C. et al. Sex-difference in flux of 27-hydroxycholesterol in the brain. 2020. *British Journal of Pharmacology* doi: 10.1111/bph.15353.
- PÉREZ-CAÑAMÁS, A. et al. A diet enriched with plant sterols prevents the memory impairment induced by cholesterol loss in senescence-accelerated mice. 2016. *Neurobiology of Aging* 48:1-12. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.009.
- PÉREZ GARCÍA, L. Familial hypercholesterolemia: Experience in the Lipid Clinic of Alava. 2018. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis* 30(5):224-229. doi: 10.1016/j.arteri.2018.04.007.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. 1977. *Analytical Biochemistry* 83(2):346-56. doi: 10.1016/0003-2697(77)90043-4.
- PFRIEGER, F. W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. 2003. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60(6):1158-71. doi: 10.1007/s00018-003-3018-7.
- PFRIEGER, F. W.; UNGERER, N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. 2011. *Progress in Lipid Research* 50(4):357-71. doi: 10.1016/j.plipres.2011.06.002.
- PIKULEVA, I. A. et al. Activities of recombinant human cytochrome P450c27 (CYP27) which produce intermediates of alternative bile acid biosynthetic pathways. 1998. *Journal of Biological Chemistry* 273(29):18153-60. doi: 10.1074/jbc.273.29.18153.
- POLI, G.; BIASI, F.; LEONARDUZZI, G. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. 2013. *Redox Biology* 1(1):125-30. doi: 10.1016/j.redox.2012.12.001.
- POO, M. MING et al. What is memory? The present state of the engram. 2016. *BMC Biology* 14:40. doi: 10.1186/s12915-016-0261-6.
- PRASANTHI, J. R. P. et al. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on β -amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. 2009. *Molecular Neurodegeneration* 4:1. doi: 10.1186/1750-1326-4-1.

- PRUNET, C. et al. Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. 2006. *Cytometry Part A* 69(5):359-73. doi: 10.1002/cyto.a.20272.
- RACCOSTA, L. et al. The oxysterol-cxcr2 axis plays a key role in the recruitment of tumor-promoting neutrophils. 2013. *Journal of Experimental Medicine* 210(9):1711-28. doi: 10.1084/jem.20130440.
- RADHAKRISHNAN, A. et al. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. 2007. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(16):6511-8. doi: 10.1073/pnas.0700899104.
- RUDENKO, G. et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. 2002. *Science* 298(5602):2353-8. doi: 10.1126/science.1078124.
- RUSSELL, D. W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. 2003. *Annual Review of Biochemistry* 72:137-74. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712.
- SAEED, A. et al. 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid in cerebrospinal fluid reflects the integrity of the blood-brain barrier. 2014. *Journal of Lipid Research* 55(2):313-8. doi: 10.1194/jlr.P044982.
- SALONEN, J. T. et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. 1992. *The Lancet* 339(8798):883-7. doi: 10.1016/0140-6736(92)90926-t.
- SAMADI, A. et al. Oxysterol species: reliable markers of oxidative stress in diabetes mellitus. 2019. *Journal of Endocrinological Investigation* 42(1):7-17. doi: 10.1007/s40618-018-0873-5.
- SANDEBRING-MATTON, A. et al. 27-Hydroxycholesterol, cognition, and brain imaging markers in the FINGER randomized controlled trial. 2021. *Alzheimer's Research & Therapy* 13(1):56. doi: 10.1186/s13195-021-00790-y.
- SCHMID, A. W.; LYNCH, M. A.; HERRON, C. E. The effects of IL-1 receptor antagonist on beta amyloid mediated depression of LTP in the rat CA1 in vivo. 2009. *Hippocampus* 19(7):670-6. doi: 10.1002/hipo.20542.

- SCHNEIDER, W. J. et al. Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. 1982. *Journal of Biological Chemistry* 10;257(5):2664-73.
- SCHWARZ, M. et al. Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7 α -hydroxylase. 1996. *Journal of Biological Chemistry* 271(30):18024-31. doi: 10.1074/jbc.271.30.18024.
- SEFTEL, H. C. et al. Prevalence of familial hypercholesterolemia in Johannesburg Jews. 1989. *American Journal of Medical Genetics* 34(4):545-7. doi: 10.1002/ajmg.1320340418.
- SETCHELL, K. D. R. et al. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: Mutation of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. 1998. *Journal of Clinical Investigation* 102(9):1690-703. doi: 10.1172/JCI2962.
- SHAFATI, M. et al. Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation. 2011. *Journal of Lipid Research* 52(5):1004-10. doi: 10.1194/jlr.M014548.
- SIGURDARDOTTIR, V.; FAGERBERG, B.; HULTHE, J. Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study). 2002. *Journal of Internal Medicine* 252(5):440-7. doi: 10.1046/j.1365-2796.2002.01054.x.
- SIMONS, K.; IKONEN, E. How cells handle cholesterol. 2000. *Science* 290(5497):1721-6. doi: 10.1126/science.290.5497.1721.
- SIRI-TARINO, P. W.; KRAUSS, R. M. The early years of lipoprotein research: From discovery to clinical application. 2016. *Journal of Lipid Research* 57(10):1771-1777. doi: 10.1194/jlr.R069575.
- SOROOSH, P. et al. Oxysterols are agonist ligands of ROR γ t and drive Th17 cell differentiation. 2014. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(33):12163-8. doi: 10.1073/pnas.1322807111.
- SOUTAR, A. K.; NAOUMOVA, R. P. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. 2007. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 4(4):214-25. doi: 10.1038/ncpcardio0836.
- SPARKS, C. E.; SPARKS, J. D. Hepatic postprandial transition and very low-density

- lipoprotein biogenesis. 2013. *Current Opinion in Lipidology* 24(5):450-2. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283654ed0.
- SPETH, R. C. et al. A heartfelt message, estrogen replacement therapy: Use it or lose it. 2018. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 315(6):H1765-H1778. doi: 10.1152/ajpheart.00041.2018.
- STAURENGHI, E. et al. Oxysterols present in Alzheimer's disease brain induce synaptotoxicity by activating astrocytes: A major role for lipocalin-2. 2021. *Redox Biology* 39:101837. doi: 10.1016/j.redox.2020.101837.
- SUÁREZ BAGNASCO, M. Psychological issues and cognitive impairment in adults with familial hypercholesterolemia. 2017. *Family Practice* 34(5):520-524. doi: 10.1093/fampra/cmz052.
- SÜDHOF, T. C. et al. The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. 1985. *Science* 228(4701):815-22. doi: 10.1126/science.2988123.
- SUN, D. et al. Lipoprotein(a) level associates with coronary artery disease rather than carotid lesions in patients with familial hypercholesterolemia. 2018. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 32(7):e22442. doi: 10.1002/jcla.22442.
- SZCZEPANIK, J. C. et al. Caffeine Mitigates the Locomotor Hyperactivity in Middle-aged Low-density Lipoprotein Receptor (LDLr)-Knockout Mice. 2016. *CNS Neuroscience and Therapeutics* 22(5):420-2. doi: 10.1111/cns.12544.
- TANIMIZU, T.; KONO, K.; KIDA, S. Brain networks activated to form object recognition memory. 2018. *Brain Research Bulletin* 141:27-34. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.05.017.
- TESTA, G. et al. Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. 2018. *Biochimie* 153:220-231. doi: 10.1016/j.biochi.2018.06.006.
- THEOFILOPOULOS, S. et al. Cholestenoic acids regulate motor neuron survival via liver X receptors. 2014. *Journal of Clinical Investigation* 124(11):4829-42. doi: 10.1172/JCI68506.
- THIRUMANGALAKUDI, L. et al. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. 2008. *Journal of Neurochemistry* 106(1):475-85. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05415.x.

- TSAOUSIDOU, M. K. et al. Sequence Alterations within CYP7B1 Implicate Defective Cholesterol Homeostasis in Motor-Neuron Degeneration. 2008. *American Journal of Human Genetics* 82(2):510-5. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.10.001.
- UCHIDA, K. Aldehyde adducts generated during lipid peroxidation modification of proteins. 2015. *Free Radical Research* 49(7):896-904. doi: 10.3109/10715762.2015.1036052.
- ULLIAN, E. M. et al. Control of synapse number by glia. *Science*, 2001. 291(5504):657-61. doi: 10.1126/science.291.5504.657.
- UMETANI, M. et al. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. 2007. *Nature Medicine* 13(10):1185-92. doi: 10.1038/nm1641.
- UMETANI, M. et al. The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol promotes atherosclerosis via proinflammatory processes mediated by estrogen receptor alpha. 2014. *Cell Metabolism* 20(1):172-82. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.013.
- USIFO, E. et al. Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Familial Hypercholesterolemia Variant Database: Update and Pathological Assessment. 2012. *Annals of Human Genetics* 76(5):387-401. doi: 10.1111/j.1469-1809.2012.00724.x.
- VAN SKIKE, C. E. et al. Inhibition of mTOR protects the blood-brain barrier in models of Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment. 2018. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 314(4):H693-H703. doi: 10.1152/ajpheart.00570.2017.
- VEDHACHALAM, C. et al. The C-terminal lipid-binding domain of apolipoprotein E is a highly efficient mediator of ABCA1-dependent cholesterol efflux that promotes the assembly of high-density lipoproteins. 2007. *Biochemistry* 46(10):2583-93. doi: 10.1021/bi602407r.
- VIANA GONÇALVES, I. C. et al. Tempol improves lipid profile and prevents left ventricular hypertrophy in LDL receptor gene knockout (LDLr^{-/-}) mice on a high-fat diet. 2017. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 36(9):629-638. doi: 10.1016/j.repc.2017.02.014.
- VIÑA, J.; LLORET, A. Why women have more Alzheimer's disease than men: Gender and mitochondrial toxicity of amyloid- β peptide. 2010. *Journal of Alzheimer's Disease* 20

(S2):S527-33. doi: 10.3233/JAD-2010-100501.

WANG, H. L. et al. Cholesterol, 24-Hydroxycholesterol, and 27-Hydroxycholesterol as Surrogate Biomarkers in Cerebrospinal Fluid in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. 2016a. *Journal of Alzheimer's Disease* 51(1):45-55. doi: 10.3233/JAD-150734.

WANG, L. M. et al. A dietary polyphenol resveratrol acts to provide neuroprotection in recurrent stroke models by regulating AMPK and SIRT1 signaling, thereby reducing energy requirements during ischemia. 2016b. *European Journal of Neuroscience* 37(10):1669-81. doi: 10.1111/ejn.12162.

WANG, S. H. et al. LDL receptor knock-out mice show impaired spatial cognition with hippocampal vulnerability to apoptosis and deficits in synapses. 2014. *Lipids in Health and Disease* 13:175. doi: 10.1186/1476-511X-13-175.

WANG, X. et al. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. 1994. *Cell* 77(1):53-62. doi: 10.1016/0092-8674(94)90234-8.

WANG, Y. et al. Targeted lipidomic analysis of oxysterols in the embryonic central nervous system. 2009. *Molecular BioSystems* 5(5):529-41. doi: 10.1039/b819502a.

WANG, Y. et al. 27-Hydroxycholesterol Promotes the Transfer of Astrocyte-Derived Cholesterol to Neurons in Co-cultured SH-SY5Y Cells and C6 Cells. 2020a. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:580599. doi: 10.3389/fcell.2020.580599.

WANG, Z. et al. The use of high-resolution MRI to detect thrombosis and lipid-rich carotid artery plaques in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. 2020b. *Revista da Associação Médica Brasileira* 66(3) doi: 10.1590/1806-9282.66.3.385

WATTS, G. F.; LEWIS, B.; SULLIVAN, D. R. Familial hypercholesterolemia: A missed opportunity in preventive medicine. 2007. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 4(8):404-5. doi: 10.1038/ncpcardio0941.

WIELKOSZYŃSKI, T. et al. Oxysterols increase inflammation, lipid marker levels and reflect accelerated endothelial dysfunction in experimental animals. 2018. *Mediators of Inflammation* 2784701. doi: 10.1155/2018/2784701.

WUOLIKAINEN, A. et al. Cholesterol, oxysterol, triglyceride, and coenzyme q homeostasis in als. evidence against the hypothesis that elevated 27-hydroxycholesterol is

- a pathogenic factor. 2014. *PLoS ONE* 9(11):e113619. doi: 10.1371/journal.pone.0113619.
- YAMAMOTO, T. et al. The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. 1984. *Cell* 39(1):27-38. doi: 10.1016/0092-8674(84)90188-0.
- YANG, L. et al. Ordered opening of LDL receptor binding domain of human apolipoprotein E3 revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and fluorescence spectroscopy. 2018. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1866(11):1165-1173. doi: 10.1016/j.bbapap.2018.08.005.
- YUAN, G.; WANG, J.; HEGELE, R. A. Heterozygous familial hypercholesterolemia: An underrecognized cause of early cardiovascular disease. 2006. *CMAJ* 174(8):1124-9. doi: 10.1503/cmaj.051313.
- ZADELAAR, S. et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. 2007. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(8):1706-21. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.142570.
- ZAMBÓN, D. et al. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. 2010. *American Journal of Medicine* 123(3):267-74. doi: 10.1016/j.amjmed.2009.08.015.
- ZETTERSTRÖM, R. The 1964 Nobel Prize for the discovery of the biosynthesis of cholesterol. 2009. *Acta paediatrica* 98(7):1223-7. doi: 10.1111/j.1651-2227.2009.01282.x.
- ZHANG, D. D. et al. 27-Hydroxycholesterol contributes to disruptive effects on learning and memory by modulating cholesterol metabolism in the rat brain. 2015. *Neuroscience* 300:163-73. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.022.