

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

CIBELE MARTINS PINHO

**INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL E TIPO-
ANSIOSO EM CAMUNDONGOS NOCAUTE PARA O
RECEPTOR DE LDL: UM MODELO ANIMAL DE
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR**

FLORIANÓPOLIS
2021

CIBELE MARTINS PINHO

INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL E TIPO-
ANSIOSO EM CAMUNDONGOS NOCAUTE PARA O
RECEPTOR DE LDL: UM MODELO ANIMAL DE
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

Trabalho de conclusão de curso submetido ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel Prediger

Coorientadora: Dra. Gislaine Olescowicz

FLORIANÓPOLIS
2021

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

Pinho, Cibele Martins

Investigação do comportamento social e tipo-ansioso em camundongos nocaute para o receptor de LDL: Um modelo animal de Hipercolesterolemia Familiar / Cibele Martins Pinho ; orientador, Rui Daniel S. Prediger, coorientador, Gislaine Olescowicz, 2021.

69 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Colesterol. 3. Comportamento social. 4. Ansiedade. 5. Animais LDLr-/- . I. S. Prediger, Rui Daniel. II. Olescowicz, Gislaine . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Cibele Martins Pinho

Investigação do comportamento social e tipo-ansioso em camundongos nocaute para o receptor de LDL: Um modelo animal de Hipercolesterolemia Familiar

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Licenciada em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 20 de agosto de 2021.

Prof. Dr^o Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof^o Dr. Rui Daniel S. Prediger
Orientador – UFSC

Dra. Gislaine Olescowicz
Co-orientadora – UFSC

Prof^o Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira
Avaliador - UFSC

Prof^a Dra. Manuella Pinto Kaster
Avaliadora – UFSC

Dedico este trabalho à minha mãe Patrícia Leonor Martins,
que é a pessoa mais guerreira do mundo e meu exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer principalmente a todos os animais que deram suas vidas para que este trabalho fosse possível.

Agradeço ao professor Dr. Rui Daniel Prediger, por ter me aceitado no laboratório e ter me dado um voto de confiança lá no começo, por abrir suas portas, incentivar-me a continuar no meio acadêmico e me dar liberdade para ver o quanto eu gosto de fazer pesquisa. Obrigada por toda orientação neste Trabalho de Conclusão de Curso.

Não tenho nem como agradecer todo o apoio e paciência da minha coorientadora, Dra. Gislaine Olescowicz, que nunca deixou de me ajudar, mesmo estando do outro lado do mundo. Sou grata por todas as discussões e sugestões científicas, ao aprendizado prático de laboratório, por me incentivar a continuar seguindo o caminho da ciência, e por ser um exemplo de pessoa e pesquisadora, muito obrigada!

Ao professor Dr. Eduardo Moreira, por disponibilizar os camundongos LDLr-/- para a realização deste trabalho. À professora Dra. Manuella Kaster por ter concedido seu tempo e me ajudado na eutanásia dos animais, mesmo em meio a pandemia de Covid-19, meu muito obrigada!

A todos os integrantes do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), aos quais tive o contato desde o início de 2019: Ana Elisa, Andreia, Ângela, Bruna, Fernanda, Juliana, Katiane, Marcela, Naiani, Nei Daniel e Samantha, que contribuíram de forma significativa com a minha formação, seja na prática de laboratório ou nas discussões científicas. Um obrigada especial à Dayse, por me aturar nas perguntas chatas e por me ajudar em experimentos. Também aos novos integrantes, que mesmo de forma online, neste período pandêmico, contribuem para a crítica científica, Ana Carolina, Ariadne, Ícaro e Lucas.

Agradeço à minha família pela paciência, pelo apoio nas minhas escolhas, principalmente à minha mãe Patrícia, ao meu pai Ricardo e à minha irmã Janaína, que conviveram com meus desesperos nos anos de graduação. À minha madrinha Jaqueline, que me ajudou muito mais do que eu posso agradecer, principalmente durante a pandemia. Aos meus avós, tias e tios, eu amo muito vocês.

Ao Rafa, que foi a pessoa que mais me apoiou em todos os anos de graduação, desde o incentivo a continuar, ao colo para chorar nos finais de semestre, até a companhia aos finais de semana no laboratório para eu não ficar sozinha, obrigada por acreditar em mim mais do que eu mesma acredito!

Tenho que agradecer às minhas amigas, que foram minhas âncoras no curso de Ciências Biológicas, não sei o que teria sido de mim se eu não tivesse encontrado vocês, agradeço todo o apoio e felicidade que vocês me proporcionaram, mesmo em meio ao caos, Lais Alflen e Agatha Michel. Principalmente à Lais, que, no último um ano e meio de pandemia, partilhou comigo toda minha ansiedade e loucura em relação à pesquisa e esteve comigo para me acalmar, ou surtar junto. Também aos amigos de começo de curso que ficaram, que tenho um carinho enorme e quero também levar para a vida, Ângela Cardoso e Gabriel Van.

Às amigas de mil anos, de vida, de escola, mas também de UFSC: Bruna Veneski, Camila Maia, Juliana Neves e Kamila de Lara, que continuaram do meu lado, mesmo eu estando muitas vezes distante, mas sei que posso contar para tudo, seja para conversas aleatórias, profundas ou só para mandar meme, para beber álcool ou apenas um café, eu amo vocês.

Aos professores da graduação, que foram excelentes no seu ensino e contribuíram para minha formação.

Ao professor Dr. Marcelo Farina, pela primeira oportunidade de pesquisa dentro do curso de Ciências Biológicas e por ter despertado em mim o encantamento pela neurociência, além de disponibilizar a centrífuga de seu laboratório para realização de experimentos feitos neste trabalho.

À minha primeira orientadora, lá do ensino médio, que me influenciou a começar a trilhar o caminho da pesquisa, professora Dra. Nara Caetano, do Colégio de Aplicação da UFSC.

Ao LAMEB e ao corpo técnico pela disposição e o auxílio aos experimentos.

Agradeço imensamente à UFSC, aos 15 anos que tive o prazer de conviver nessa universidade, foram 4 anos de NDI, 5 de Colégio de Aplicação e 6 de graduação. A UFSC não é só uma universidade para mim, é praticamente minha segunda casa, o lugar que mais tenho lembranças, seja de criança, adolescência ou início da vida adulta.

Obrigada ao CNPq pelo financiamento e o incentivo à pesquisa desde o ensino médio.

"I would just like to take this moment to say to all the young girls out there who dream about science as a profession: Go for it. It is the greatest job in the world. And if anybody tells you can't, don't listen."

Amy Farrah Fowler – The Big Bag Theory

RESUMO

O colesterol desempenha um papel primordial na comunicação e sinalização celular no sistema nervoso central (SNC). Embora o cérebro seja o órgão mais rico em colesterol, a síntese de colesterol cerebral ocorre de maneira independente da periferia, sendo os astrócitos as células majoritariamente responsáveis por esta produção. O colesterol secretado pelos astrócitos é internalizado pelos neurônios através do receptor de lipoproteína de baixa densidade (do inglês – *low-density lipoprotein*- LDL), assim como acontece a internalização da LDL nas demais células do corpo. Entretanto, alguns distúrbios metabólicos são caracterizados por defeitos no gene que codifica o receptor LDL (LDLr), como é o caso da hipercolesterolemia familiar (HF), onde é observada a perda da função do LDLr e o conseqüente aumento das concentrações sanguínea de colesterol. Para o estudo pré-clínico da HF, tem sido utilizado, dentre outros modelos, camundongos com deleção gênica do LDLr (LDLr^{-/-}), que apresentam um aumento de 3 a 6 vezes nos níveis de colesterol, além de mimetizarem o perfil genético e de lipoproteínas presentes na doença humana. Classicamente, a HF está relacionada ao surgimento precoce de doenças cardiovasculares, entretanto, nos últimos anos, vêm sendo demonstrado que os pacientes acometidos pela HF apresentam também prejuízos cognitivos, porém a relação com os transtornos de humor e ansiedade ainda é controversa. Trabalhos prévios já demonstraram que a dieta hiperlipídica e o conseqüente aumento do colesterol podem levar ao comportamento do tipo-ansioso em camundongos, enquanto estudos clínicos evidenciaram o aumento dos níveis de colesterol em pacientes com transtornos de ansiedade. Já foi demonstrado que os camundongos LDLr^{-/-} apresentam um aumento nos comportamentos do tipo-depressivo e anedônico, porém, permanecem pouco investigados comportamentos sociais e relacionados à ansiedade nesses animais, ainda mais quando comparando machos e fêmeas. Recentemente, foi demonstrado um aumento na atividade da enzima MAO-A (responsável pela metabolização de monoaminas) no hipocampo dos animais LDLr^{-/-}, sendo em humanos, macacos e camundongos, que apresentam uma redução na atividade desta enzima, é observada uma redução no comportamento social proativo. No presente estudo, utilizando testes comportamentais e bioquímicos, foram investigadas possíveis alterações no comportamento social e do tipo ansioso em camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas, bem como nos níveis séricos de corticosterona. Foi observada uma redução nos comportamentos do tipo-ansioso nos animais LDLr^{-/-}, principalmente nas fêmeas, nos testes do labirinto em cruz elevado e de enterrar esferas. As fêmeas LDLr^{-/-} também

apresentaram um fenótipo de hiperlocomoção no teste de discriminação olfatória, teste do labirinto em cruz elevado, teste do campo aberto, teste da sociabilidade no campo aberto e teste das três câmaras. Foi evidenciado um aumento no comportamento social dos camundongos LDLr^{-/-} (ambos os sexos) no teste de sociabilidade no campo aberto, enquanto no teste das 3 câmaras somente os machos LDLr^{-/-} foram mais sociáveis. As análises bioquímicas confirmaram o perfil hipercolesterolêmico dos animais LDLr^{-/-}, entretanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de corticosterona. Os resultados do presente estudo indicam que animais com a deleção gênica do LDLr e a consequente hipercolesterolemia apresentam redução em respostas de ansiedade e aumento em comportamentos sociais. Estudos adicionais são necessários para identificar os mecanismos moleculares associados à estas alterações e que podem ter importantes implicações na HF.

Palavras-chave: Colesterol, LDLr^{-/-}, Ansiedade, Comportamento social.

ABSTRACT

Cholesterol plays a key role in cell communication and signaling in the central nervous system (CNS). Although the brain is the richest organ in cholesterol, its synthesis happens independently of the periphery, with astrocytes being the primary cells responsible for this production. The cholesterol secreted by astrocytes is internalized by neurons through the low-density-lipoprotein (LDL) receptor, as well as the internalization of LDL in other body cells. However, some metabolic disorders are characterized by defects in the gene that encodes the LDL receptor (LDLr), such as familial hypercholesterolemia (FH), where the loss of LDLr function and the consequent increase in blood cholesterol concentrations are observed. For the preclinical study of FH, mice with LDLr gene deletion (LDLr^{-/-}) have been used. In addition to mimicking the genetic and lipoproteins profile present in human disease, these mice present a 3 to 6-fold increase in cholesterol levels. Classically, FH is related to the early onset of cardiovascular diseases, however, in recent years, it has been shown that patients affected by FH also have cognitive impairments, but the relationship with mood and anxiety disorders is still controversial. Previous studies have shown that a high-fat diet and the consequent increase in cholesterol can lead to anxious-like behavior in mice, while clinical studies have shown an increase in cholesterol levels in patients with anxiety disorders. It has been shown that LDLr^{-/-} mice show an increase in depressive-like and anhedonia-like behaviors, however, social and anxiety-related behaviors in these animals remain poorly investigated, even more when comparing males and females. Recently, an increase in the activity of the MAO-A (an enzyme responsible for the metabolization of monoamines) was demonstrated in the hippocampus of LDLr^{-/-} mice. Studies in humans, monkeys, and mice showed that a reduction in the activity of this enzyme was associated with a reduction in proactive social behavior. In the present study, we used behavioral and biochemical tests to evaluate possible alterations in social and anxiety-like behaviors in male and female LDLr^{-/-} mice, as well as changes in serum levels of corticosterone. A reduction in anxious-like behaviors was observed in LDLr^{-/-} animals, especially females, in the elevated plus maze and marble-burying test. LDLr^{-/-} females also presented a hyperlocomotion phenotype in the olfactory discrimination test, plus maze test, open field test, open field sociability test and three chamber test. An increase in the social behavior of LDLr^{-/-} mice (both sexes) was evidenced in the sociability test in the open field, while in the three-chamber test only LDLr^{-/-} males were more sociable. Biochemical analyzes confirmed the hypercholesterolemic profile of LDLr^{-/-} animals, however, no significant differences

were observed in serum corticosterone levels. The results of the present study indicate that animals with the LDLr gene deletion and the consequent hypercholesterolemia present a reduction in anxiety responses and an increase in social behaviors. Additional studies are needed to identify the molecular mechanisms associated with these changes and that may have important implications for HF.

Keywords: Cholesterol, LDLr^{-/-}, anxiety, social behavior

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DA INTERNALIZAÇÃO DA LDL NA CÉLULA.....	17
FIGURA 2: SÍNTESE E METABOLISMO DO COLESTEROL NO SNC.....	19
FIGURA 3: EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HHA).....	24
FIGURA 4: DESENHO EXPERIMENTAL DO PROTOCOLO COMPORTAMENTAL.....	29
FIGURA 5: APARATO DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA.....	30
FIGURA 6: APARATO DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	31
FIGURA 7: APARATO DO CAMPO ABERTO.....	32
FIGURA 8: APARATO SOCIABILIDADE NO CAMPO ABERTO.....	33
FIGURA 9: ILUSTRAÇÃO DO TESTE DE ESCONDER ESFERAS.....	33
FIGURA 10: ILUSTRAÇÃO DO TESTE DAS TRÊS CÂMARAS.....	34
FIGURA 11: RESULTADO DO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA.....	37
FIGURA 12: AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	39
FIGURA 13: AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO E DO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	40
FIGURA 14: AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO E DO COMPORTAMENTO SOCIAL NO TESTE DA SOCIABILIDADE NO CAMPO ABERTO.....	43
FIGURA 15: AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DE ESCONDER ESFERAS.....	45
FIGURA 16: AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO E DO COMPORTAMENTO SOCIAL NO TESTE DAS TRÊS CÂMARAS.....	46
FIGURA 17: CONTROLE DO PESO E DO CONSUMO ALIMENTAR DOS ANIMAIS.....	47
FIGURA 18: DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL.....	49
FIGURA 19: NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
APA	American Psychiatric Association
AVP	Arginina-vasopressina (<i>arginine vasopressin</i>)
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina (<i>corticotropin-releasing hormone</i>)
DA	Dopamina
DSM-5	Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5ª edição
EPM	Erro padrão da média
GR	Receptores de glicocorticóides (<i>glucocorticoid receptor</i>)
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária (<i>intermediate-density lipoprotein</i>)
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (<i>low-density lipoprotein</i>)
LDL-/-	Homozigotos para depleção no gene que codifica a LDL
LDLr	Receptor de lipoproteína de baixa densidade (<i>low-density lipoprotein receptor</i>)
m-CPP	Meta-clorofenilpiperazina
MAO	Monoamina oxidase
MAO-A	Monoamina oxidase A
MAO-B	Monoamina oxidase B
NA	Noradrenalina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PVN	Núcleo paraventricular (<i>paraventricular nucleus</i>)
Rpm	Rotação por minuto
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático
TOC	Transtorno obsessivo compulsivo
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade (<i>very-low-density lipoprotein</i>)

VTA Área tegmentar ventral (*ventral tegmentar area*)
WT Tipo selvagem (*Wild type*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 METABOLISMO PERIFÉRICO DO COLESTEROL.....	16
1.2 SINTESE E METABOLISMO DO COLESTEROL NO SNC	18
1.3 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR (HF)	20
1.4 MODELO ANIMAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.....	21
1.5 HF E DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS: ESTUDOS CLÍNICOS E PRÉ-CLÍNICOS.....	21
1.6 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	23
1.7 COMPORTAMENTO SOCIAL	25
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. ANIMAIS	29
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	29
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	30
4.4.1 <i>Discriminação olfatória</i>	30
4.4.2 <i>Labirinto em cruz elevado</i>	30
4.4.3 <i>Campo aberto</i>	31
4.4.4 <i>Sociabilidade no campo aberto</i>	32
4.4.5 <i>Teste de esconder esferas</i>	33
4.4.6 <i>Teste das três câmaras</i>	34
4.5 CONTROLE DA INGESTÃO DE ALIMENTO E PESO DOS ANIMAIS	35
4.7 COLETA DE SANGUE E DE ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS	35
4.8 EXPERIMENTOS BIOQUÍMICOS	35
4.8.1 <i>Quantificação do colesterol sérico</i>	35
4.8.2 <i>Quantificação dos níveis de corticosterona no sangue</i>	35
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
5. RESULTADOS	37
5.1 PROTOCOLO COMPORTAMENTAL.....	37
5.1.1 <i>Teste da discriminação olfatória</i>	37
5.1.2 <i>Teste do labirinto em cruz elevado</i>	38
5.1.3 <i>Teste do campo aberto</i>	40
5.1.4 <i>Teste da sociabilidade no campo aberto</i>	41
5.1.5 <i>Teste de esconder esferas</i>	44
5.1.6 <i>Teste das três câmaras</i>	45
5.1.7 <i>Controle do peso e do consumo alimentar dos animais</i>	47
5.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS	48
5.2.1 <i>Níveis séricos de colesterol</i>	48
5.2.2 <i>Níveis séricos de corticosterona</i>	49
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

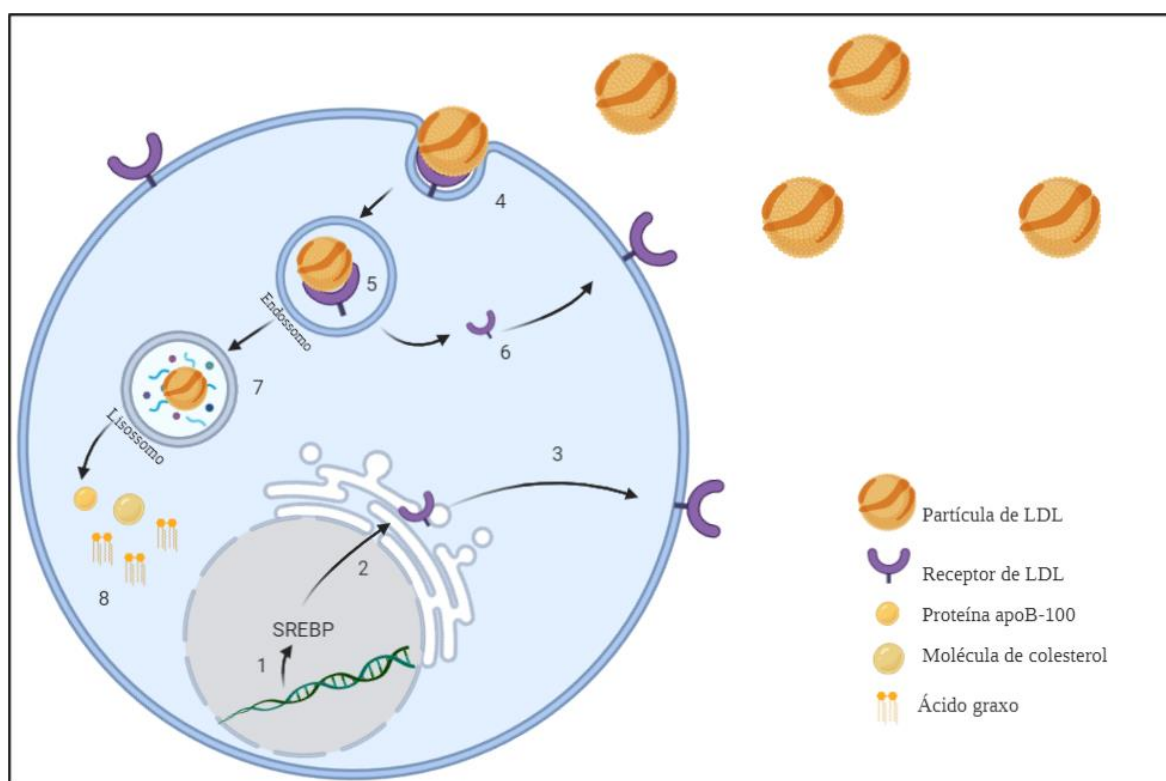
1.1 METABOLISMO PERIFÉRICO DO COLESTEROL

O colesterol é uma molécula plana formada por 4 grupos esteróis com ligações trans, tais características a tornam uma molécula extremamente importante para a estabilidade das membranas biológicas. É a molécula precursora para a síntese de hormônios esteroides, da vitamina D, dos ácidos biliares, além de desempenhar um papel crítico nos processos de sinalização e proliferação celular (NELSON; COX, 2014). Devido a sua característica essencialmente insolúvel, o colesterol é transportado pelo plasma sanguíneo por lipoproteínas, que são um conjunto de macromoléculas de proteínas transportadoras específicas chamadas de apolipoproteínas (NELSON; COX, 2014). Existem diversas lipoproteínas transportadoras de colesterol, as maiores e menos densas delas são os quilomícrons, que são sintetizados a partir da gordura vinda da dieta que fica armazenada no retículo endoplasmático das células epiteliais que recobrem a superfície interna do intestino delgado (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, quebrando o triacilglicerol do interior dos quilomícrons em ácidos graxos livres de glicerol. Os ácidos graxos são então transportados via transportadores específicos (como o CD36) até o tecido adiposo, músculo cardíaco e esquelético (NELSON; COX, 2014).

Quando há um excesso de carboidratos, colesterol, triacilglicerol e ácidos graxos vindo da dieta, isto é, uma quantidade maior do que aquela necessária para o fornecimento de energia de uso imediato, os ácidos graxos captados após o processo de digestão do triacilglicerol e o colesterol são reesterificados a triacilglicerol e convertidos em constituinte de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, colesterol, ésteres de colesterol, apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE no fígado formando as lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês: *very-low-density lipoprotein*-VLDL) (NELSON; COX, 2014). A perda dos triacilgliceróis das VLDL pela ação das lipases nas paredes dos capilares converte parte das VLDL em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL do inglês: *intermediate-density lipoprotein*) e com a remoção de mais triacilgliceróis, em lipoproteínas de baixa densidade (*low-density lipoprotein* - LDL) (NELSON; COX, 2014).

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 para os tecidos, como os músculos, glândulas suprarrenais e tecido adiposo (GOLDSTEIN; BROWN, 2009). A internalização da LDL na célula (Figura 1) acontece por meio de uma sucessão de eventos que culminarão na endocitose mediada por receptores de LDL (LDLr) por meio do reconhecimento da apoB-100 presente nas LDL (NELSON; COX, 2014).

Figura 1: Esquema da internalização da LDL na célula.



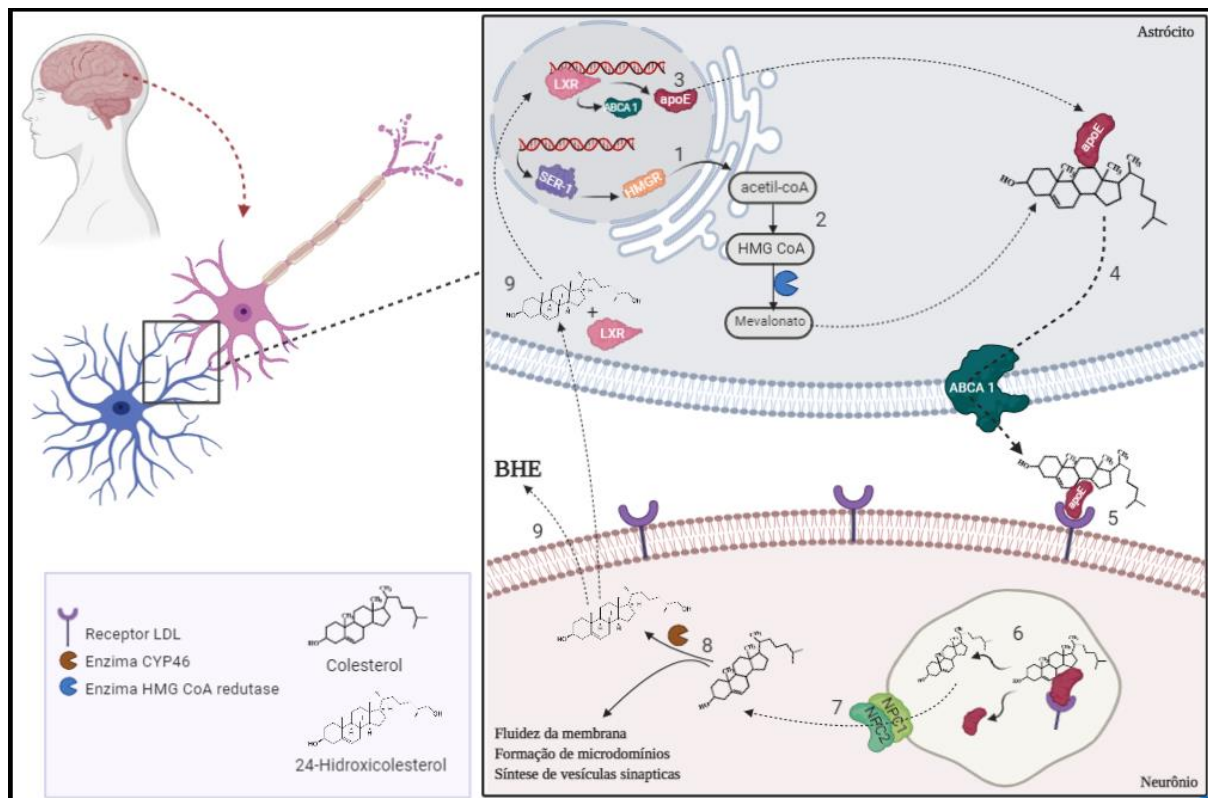
Legenda: 1- Aumento da síntese do fator de transcrição SREBP que sinaliza ao retículo endoplasmático para sintetizar o receptor LDL. 2- O receptor LDL é sintetizado no retículo endoplasmático. 3- O receptor de LDL é externalizado na membrana plasmática. 4- O receptor de LDL reconhece a proteína apoB-100 da LDL. 5- A partícula de LDL juntamente com o receptor são endocitados por meio de um endossomo para dentro da célula. 6- O receptor desacopla da LDL e retorna para a membrana plasmática para reciclar sua função. 7- No citoplasma celular a partícula de LDL funde-se com o lisossomo, que contém enzimas que irão hidrolisar os ésteres de colesterol. 8- Liberando assim o colesterol e os ácidos graxos, assim como a proteína apoB-100 que é degradada em aminoácidos. Fonte: Figura elaborada pela autora com o software *BioRender*. Modificado de Nelson; Cox (2014).

1.2 SINTESE E METABOLISMO DO COLESTEROL NO SNC

O cérebro contém aproximadamente 25% de todo o colesterol do corpo humano, sendo considerado o órgão mais rico em colesterol. O colesterol desempenha importantes funções na comunicação celular cerebral. 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, ele tem a função de formar microdomínios chamados “*lipid rafts*” (balsas lipídicas) onde há a organização e alta expressão dos receptores para neurotransmissores, fatores neurotróficos e canais iônicos. Portanto, o colesterol é crucial para as propriedades biofísicas da membrana, para a iniciação, propagação e manutenção da transdução de sinal de qualquer sistema de neurotransmissão (BORRONI; VALLÉS; BARRANTES, 2016).

A produção de colesterol no SNC é independente da periferia, sendo os astrócitos os responsáveis por produzir o colesterol no SNC na vida adulta (PFRIEGER, 2003). Os astrócitos sintetizam o colesterol por meio de diversas reações descritas na Figura 2. Após ser sintetizado nos astrócitos, o colesterol é carregado através da apoE o qual é internalizado pelos neurônios via receptor de LDL, sendo este um dos mecanismos de internalização do colesterol na célula neuronal (Figura 2). Dentro da célula, o colesterol é direcionado para suas inúmeras funções ou convertido em 24-hidroxicolesterol (24-OH), esse metabólito do colesterol pode cruzar a barreira hematoencefálica (BHE), sendo liberado no plasma via fluido cérebro espinal, que é a principal rota de eliminação do colesterol do SNC. Esse metabólito, juntamente com seus derivados, como o 27-OH, são chamados de oxisteróis, derivados oxidados do colesterol, sendo capazes de transpassar membranas lipofílicas (BJÖRKHEM, 2008).

Figura 2: Síntese e metabolismo do colesterol no SNC.



Legenda: **1-** O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático dos astrócitos pela ação da HMGR, 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 HMGR. **2-** A acetil coenzima A (Acetil CoA) é convertida em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG CoA) no citoplasma celular, seguido pela conversão do HMG-CoA em mevalonato pela ação da enzima HMG-CoA redutase, no retículo endoplasmático. Após outras transformações ocorre as reduções da molécula para colesterol. **3-** A Apolipoproteína E (apoE) é sintetizada a partir da expressão gênica de receptores hepáticos ativados por X (LXR), o qual também induz a síntese de ABCA 1. **4-** O Colesterol então se liga à apoE e é secretado pelos astrócitos via transportadores de cassete de ligação ao ATP (ABCA1). **5-** O complexo colesterol-apoE é internalizado pelos neurônios via receptores LDL. **6-** O colesterol é liberado a partir das lipoproteínas dentro de lisossomos neuronais. **7-** Posteriormente o colesterol é transportado por proteínas Niemann-Pick C tipo 1 (NPC1) e tipo 2 (NPC 2) para o citoplasma. **8-** No citoplasma o colesterol direcionado para suas inúmeras funções celulares ou convertido em 24-hidroxicolesterol (24-OH) por uma enzima membro da família do citocromo P450, a CYP46. **9-** Este metabólito pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) via líquido cefalorraquidiano, como também pode se ligar aos receptores hepáticos ativados por X (LXR), que se translocam para o núcleo e induzem a expressão dos genes apoE e ABCA 1 nos astrócitos, favorecendo o fornecimento de colesterol para os neurônios. Figura elaborada pela autora com o software *BioRender*. Modificado de Björkhem (2008); Pfrieger; Ungerer (2011).

1.3 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR (HF)

A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença genética caracterizada por alterações no metabolismo de lipoproteínas, particularmente a LDL, que pode se apresentar na forma homozigótica ou heterozigótica, e constitui um dos distúrbios metabólicos hereditários mais comuns observados na população (GOLDBERG *et al.*, 2011; MYTILINAIYOU *et al.*, 2018). Dentre as mutações que podem levar a HF, a principal está relacionada ao gene que codifica o LDLr (sabe-se hoje que existem mais de 1800 mutações nesse gene). Pacientes que herdaram apenas um alelo mutado são considerados heterozigotos para o gene, acarretando uma redução parcial na função do receptor LDL e a consequente elevação na concentração sérica de colesterol, entre 2 a 3 vezes. Já nos casos homozigotos, quando se é herdado dois alelos mutados, há perda total da função do receptor e consequente elevação de 3 até 6 vezes nos níveis de colesterol (FALUDI *et al.*, 2017; USIFO *et al.*, 2012). Como consequência do excesso de colesterol circulante, em ambos os casos, é descrito o aumento significativo de desenvolvimento de doenças cardiovasculares prematuras (COMMITTEE, 1991).

Estudos epidemiológicos sugerem que a forma heterozigótica apresenta uma grande variabilidade na prevalência, que pode estar associada à etnia da população avaliada, enquanto 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, um país de etnia heterogênea, a prevalência da HF heterozigótica é de 1:263 e no mundo é de 1:200 indivíduos (HARADA *et al.*, 2018).

De acordo com a Associação Americana de Cardiologia, para uma boa saúde cardiovascular é necessária a manutenção dos níveis plasmáticos 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 que níveis desejáveis de colesterol total para adultos é inferior a 190 mg/dL, e menor de 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 inferior 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 (FALUDI *et al.*, 2017). Segundo as *Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e prevenção da aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia*, o quadro de HF se dá pelos sinais clínicos de depósitos extravasculares de colesterol, níveis superiores a 330 mg/dL de LDL no sangue em

conjunto com histórico familiar da doenças e identificação de mutações e polimorfismos genéticos no gene do LDLr, da proteína ApoB100 ou a enzima PCSK9 que favoreçam o desenvolvimento da HF (FALUDI *et al.*, 2017).

1.4 MODELO ANIMAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

Para o estudo pré-clínico da HF é utilizado, entre outros modelos, os camundongos com deleção gênica no LDLr, desenvolvidos em 1993 a partir de manipulação genética realizada por Ishibashi e colaboradores (ISHIBASHI *et al.*, 1993). Esses animais apresentam um quadro de hipercolesterolemia, com aumento moderado no colesterol LDL quando alimentados com dieta padrão, podendo também desenvolver lesões ateroscleróticas com o avanço da idade. No entanto, quando submetidos a uma dieta hiperlipídica, acabam se tornando extremamente hipercolesterolêmicos e com grande desenvolvimento de aterosclerose aórtica e xantomias cutâneas (ISHIBASHI *et al.*, 1993; ZADELAAR *et al.*, 2007). Segundo Zadelaar *et al.* (2007), as principais características que tornam esse modelo ótimo para pesquisas pré-clínicas envolvendo a HF são:

- Semelhança biológica à condição humana da HF, causada por mutações no gene que codifica o receptor LDL;
- Perfil de lipoproteínas plasmáticas se assemelha ao de humanos, estando a maior parte do colesterol confinado na fração LDL;
- Grau de dislipidemia intermediário, desenvolvendo lesões menos avançadas do que outros modelos animais da HF, como os camundongos apoE^{-/-}.

1.5 HF E DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS: ESTUDOS CLÍNICOS E PRÉ-CLÍNICOS

Além das alterações periféricas, ocorrem alterações neurológicas e neuropsiquiátricas, em particular o declínio cognitivo em pacientes com HF (SUÁREZ BAGNASCO, 2017). Desde a primeira vez que foi relatada (ZAMBÓN *et al.*, 2010) a relação da HF com prejuízos cognitivos relacionados à memória vem sendo confirmada em estudos posteriores (ARIZA *et al.*, 2016; CRUZ-SANCHEZ *et al.*, 2008;

GAROLERA *et al.*, 2016; HYTTINEN *et al.*, 2010). Por outro lado, a relação da HF com transtornos de humor como depressão e transtornos de ansiedade ainda é controversa. Um estudo de meta-análise indicou que indivíduos com HF apresentam sintomas de ansiedade reduzidos em comparação com indivíduos sem a doença (AKIOYAMEN *et al.*, 2018). Ao passo que, pacientes com mania (SAGUD *et al.*, 2007) e transtorno de ansiedade generalizada (PETER *et al.*, 1999) apresentam níveis de colesterol sérico e LDL mais baixos do que indivíduos controle (PETER *et al.*, 2002).

Strekalova *et al.* (2015) demonstraram que camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica apresentam um perfil comportamental do tipo ansioso, visto que ficaram menos tempo nos braços abertos do teste do labirinto em cruz elevado, bem como exploram por menos tempo a área central do campo aberto. Ademais, pesquisas anteriores demonstraram que camundongos LDLr^{-/-} apresentam comportamento do tipo-depressivo (DE BEM, *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA, *et al.*, 2013; ENGEL *et al.*, 2016) uma vez que tiveram um aumento no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, comparados com o grupo controle, além de comportamento anedônico no teste de consumo de sacarose (ENGEL *et al.*, 2016). Esses achados indicam que os animais LDLr^{-/-} podem apresentar algum tipo de disfunção nos circuitos relacionados aos transtornos de humor e ansiedade.

Engel *et al.* (2016) também descreveram um aumento na atividade da enzima MAO-A no hipocampo dos animais LDLr^{-/-}. Esta enzima, localizada intracelular no terminal pré-sináptico dos neurônios, catalisa a principal via de inativação dos neurotransmissores monoaminérgicos como a noradrenalina, dopamina e serotonina (RANG; DALE, 2011). O mesmo efeito foi observado em células do neuroblastoma humano (SHSY5Y) expostas *in vitro* a LDL, além de haver o aumento de espécies reativas de oxigênio (ENGEL *et al.*, 2016). O aumento da atividade da MAO-A pode, por consequência, reduzir os níveis de monoaminas no SNC levando ao desenvolvimento de respostas do tipo-depressiva observadas nos animais LDLr^{-/-} (ENGEL *et al.*, 2016). Entretanto, não existem trabalhos investigando respostas de ansiedade e comportamento social em camundongos LDLr^{-/-}. A baixa atividade da MAO-A está relacionada ao comportamento antissocial em humanos (BYRD E MANUCK, 2014) e camundongos nocaute para MAO-A (SCOTT *et al.*, 2008). Por esta razão, torna-se imperativo a realização de estudos adicionais em modelos animais que investiguem a relação entre a deleção genética do LDLr, a hipercolesterolemia com a ansiedade e o comportamento social.

1.6 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

A ansiedade está associada ao comportamento prolongado de vigilância excessiva que pode ocorrer sem a existência de um perigo iminente (MACLEOD; RUTHERFORD, 1992). O medo é desencadeado como reação a uma ameaça concreta e específica, que em mamíferos tem como resposta comportamental a luta e fuga (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). Contudo, os transtornos de ansiedade diferem do medo ou da ansiedade por serem de grande intensidade e persistirem por períodos prolongados (APA, 2014). Atualmente, os transtornos de ansiedade são classificados clinicamente conforme o *Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-5)* da Associação Americana de Psiquiatria, os quais compreendem os transtornos de ansiedade generalizada, de ansiedade de separação, o mutismo seletivo, as fobias específicas, os transtornos de pânico, transtorno de ansiedade social, agorafobia, os transtornos de ansiedade induzidos por medicamentos ou devido a outra condição médica (APA, 2014)¹ Anteriormente, no DSM-4 o transtorno obsessivo compulsivo (TOC) e os transtornos de estresse pós traumático (TEPT) estavam agrupados junto aos transtornos de ansiedade (APA, 2002)², porém no DSM-5 eles ganham capítulos separados devido as características diagnósticas envolverem diversos outros fatores específicos (APA, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que há cerca de 57,2 milhões (21%) de pessoas com algum transtorno mental nas Américas (OMS, 2015). Mais recentemente, em 2019, a OMS identificou o Brasil como o país com o maior número de pessoas com transtornos de ansiedade do mundo, com cerca de 18,5 milhões de brasileiros (9,3% da população do país). Logo, compreender a etiologia e a fisiopatologia destes transtornos de ansiedade apresentam grande relevância médico-social.

A fisiopatologia dos transtornos de ansiedade envolve uma variedade de distúrbios neuroendócrinos, de neurotransmissores e neuroanatômicos. Sabe-se que as regiões corticais frontais e do lobo temporal do encéfalo regulam a tomada de decisões, emoções e o comportamento, são chamadas em conjunto de sistema límbico. O córtex límbico abrange o córtex insular e o córtex cingulado, integrando os componentes cognitivos e afetivos da dor, processando informações sobre o estado interno do corpo (MARTIN *et*

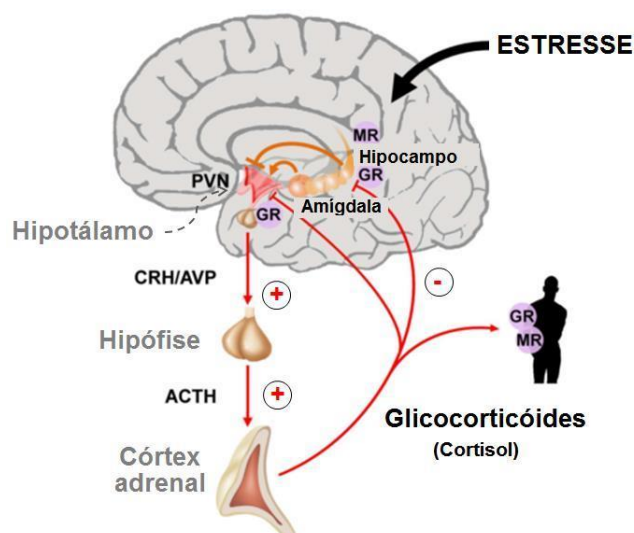
¹ APA – American Psychiatric Association. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais- DSM. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

² APA – American Psychiatric Association. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais- DSM. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

al., 2009). O hipocampo é outra estrutura do sistema límbico importante para aspectos cognitivos (WANG *et al.*, 2020), exercendo controle inibitório sobre o sistema de resposta ao estresse hipotalâmico, participando também no *feedback* negativo no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). A amígdala também faz parte do sistema límbico, regulando a expressão do medo e da agressão e é responsável pelo comportamento defensivo, além de ter papel na formação e recuperação de memórias emocionais principalmente relacionadas ao medo (MARTIN *et al.*, 2009).

O sistema de resposta ao estresse envolve respostas adaptativas que são mediadas por cascatas neuroendócrinas e neuronais, incluindo o sistema nervoso autônomo (SNA) e o eixo HHA (Figura 3), responsável pela produção e liberação de glicocorticoides pelo córtex adrenal em resposta ao estresse. Nos seres humanos, o principal hormônio esteroide produzido em resposta ao estresse é o cortisol, correspondente à corticosterona em roedores (MARTIN *et al.*, 2009).

Figura 3: Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).



Legenda: Quando ocorre um estresse agudo, a amígdala sinalizará via projeções neuronais, o núcleo paraventricular (PVN) no hipotálamo. O hipotálamo responderá com a liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP) na hipófise anterior. Isto faz com que a hipófise anterior libere hormônio adrenocorticotrófico - corticotrofina (ACTH). O ACTH vai atuar nas glândulas suprenais, provocando a liberação de glicocorticoides como o cortisol (humanos) e a corticosterona (roedores) nessas glândulas. Esses hormônios circulam pelo corpo todo e pelo encéfalo, ligando-se a receptores esteroides intracelulares nucleares e a receptores glicocorticoides (GR) do hipocampo e do hipotálamo para suprir a atividade do eixo HHA, exercendo um papel de *feedback* negativo que evita a ativação crônica e prejudicial do eixo HHA. Modificado de Bertoluzzi (2016).

Sabe-se que ativação prolongada do eixo HHA causa anormalidades em resposta ao evento estressante, que pode contribuir para o desenvolvimento dos transtornos de

humor e ansiedade (FARAVELLI *et al.*, 2012). Em episódios de ansiedade crônica, a ativação do eixo HHA não é adaptativa, existindo um prejuízo na conexão entre o estressor e a possível consequência comportamental, sendo que o eixo HHA se mantém ativado e prejudica os mecanismos de enfrentamento, induzindo a baixa tolerância ao estresse crônico (BORTOLUZZI, 2016). Pesquisas mostram que no TOC e no transtorno de pânico, há uma hiperatividade constante do eixo HHA (MARTIN *et al.*, 2009).

Estudos mostram que pacientes que sofrem de transtorno do pânico, transtorno de ansiedade generalizada, TOC e TEPT apresentam níveis mais elevados de colesterol do que indivíduos saudáveis (HAYWARD *et al.*, 1989; BAJWA *et al.*, 1992; KUCZMIERCZYK *et al.*, 1996; AGARGUN *et al.*, 1998; YAMADA *et al.*, 2001; PETER *et al.*, 2002). Observou-se em amostras de pacientes que os altos níveis de colesterol estão relacionados com a quantidade de cortisol secretada após a administração de um antidepressivo, como a trazodona, que atua através da inibição da receptação de serotonina e noradrenalina. Segundo a literatura, o meta-clorofenilpiperazina (m-CPP), um metabólito deste antidepressivo, liga-se as receptores serotoninérgicos, resultando na estimulação do eixo HHA e a consequente secreção de cortisol em humanos (KAHN; WETZLER, 1991; TERAO *et al.*, 2000b). Estes resultados indicam que uma sensibilidade maior dos receptores serotoninérgicos está relacionada a altos níveis de colesterol (PAPAKOSTAS *et al.*, 2004). Essa sensibilidade pode estar relacionada ao excesso de colesterol, o que pode interferir indiretamente na conformação e a função de proteínas e receptores ligados à membrana, reduzindo a fluidez da membrana do neurônio, alterando ou interrompendo a função das balsas lipídicas (regiões celulares fundamentais para a ativação de cascatas de sinais para a ativação de neurotransmissores) (OHVO-REKIKKA *et al.*, 2002).

1.7 COMPORTAMENTO SOCIAL

O comportamento social é um dos comportamentos mais complexos em mamíferos, sendo que é baseado na capacidade de se comunicar adequadamente com os outros com base na interpretação dos sinais sociais e em sua resposta. As áreas do cérebro que interpretam as ações sociais e as controlam são particularmente o córtex pré-frontal medial, amígdala, ínsula anterior, córtex cingulado anterior, giro frontal inferior e o sulco temporal superior (BARAK E FENG, 2016).

Existem diversas categorias de comportamento social, que variam de tendências sociais iniciais, como o caso da personalidade proativa, a comportamento social relacionado com reprodução, como o cuidado parental e união sexual, mas também existe o comportamento social em contextos não reprodutivos, como a cooperação em grupo. Diferentes comportamentos sociais evocar diferentes circuitos cerebrais, nesse contexto, a ativação do eixo HHA pode diferir dependendo do comportamento social. Por exemplo, a sociabilidade proativa está relacionada negativamente com a atividade do eixo HHA, já a alta reatividade do eixo HHA está relacionada com uma personalidade menos social (RAULO; DANTZER, 2018). Tratando-se de roedores, como camundongos, existem diversos testes comportamentais que avaliam o nível de sociabilidade (O'TUATHEIGH *et al.*, 2007; DESBONNET *et al.*, 2012; KRISHNAN *et al.*, 2007, BERTON *et al.*, 2006), em relação principalmente à proatividade. Esse comportamento proativo se relaciona ao nível de sociabilidade, em que indivíduos mais proativos (ousados e exploradores) tendem a ser mais sociáveis do que os indivíduos reativos (tímidos e medrosos) (RAULO; DANTZER, 2018).

A sociabilidade é um comportamento bastante afetado em diferentes transtornos, incluindo um dos transtornos de ansiedade, conhecido como transtorno de ansiedade social (APA, 2014). A sociabilidade é um comportamento com grande relação com o eixo HHA, assim como alguns transtornos de ansiedade, além disso sabe-se que a predisposição ao comportamento antissocial em humanos está ligada tanto aos fatores ambientais (como maus tratos e abuso físico na infância) quanto a alterações neurobiológicas, como a baixa atividade da enzima MAO-A, recorrente a uma resposta genética (BYRD E MANUCK, 2014; SAMOCHOWIEC *et al.*, 1999). Existem relatos que indivíduos do sexo masculino, que carregam o alelo (presente no cromossomo X) para uma menor atividade da MAO-A (alelo MAOA-uVNTR), apresentam níveis aumentados de violência e comportamento antissocial (NILSSON *et al.*, 2015; FERGUSSON *et al.*, 2011; FERGUSSON *et al.*, 2012). Em contrapartida, crianças que sofreram maus tratos, mas que têm um genótipo que confere níveis altos da expressão da MAO-A, apresentam uma menor probabilidade de ter problemas antissociais (CASPI *et al.*, 2002).

Também há estudos com primatas evidenciando que a baixa atividade da enzima MAO-A associada à diferença de experiência social de cuidado no início do desenvolvimento aumenta os níveis de agressão (NEWMAN *et al.*, 2005). Modelos animais, utilizando animais nocaute para MAO-A, também evidenciaram que a baixa

atividade da MAO-A interfere em comportamentos sociais (SCOTT *et al.*, 2008). Bortolato *et al.* (2013) demonstraram que uma redução no número de abordagens sociais e menor frequência de farejamento no teste de interação social com contato em animais nocautes para MAO-A em comparação a animais controle. O mesmo efeito foi observado no teste de investigação social, quando o animal alvo estava em uma gaiola, os camundongos nocaute para a MAO-A investigaram menos o compartimento em que os animais alvos estavam (BORTOLATO *et al.*, 2013). Em conjunto, estes resultados indicam que a ausência de MAO-A (e consequente aumento de monoaminas) em camundongos pode influenciar na diminuição do comportamento social destes. Como mencionado anteriormente, Engel *et al.* (2016) demonstrou que há um aumento na atividade da enzima MAO-A nos animais LDLr^{-/-}, o que poderia ser um fator relevante para um aumento do comportamento social nesses animais, porém ainda não há literatura que relate o comportamento social em modelos animais da HF.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A hipercolesterolemia é reconhecida como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Mais recentemente, evidências clínicas também sugerem uma relação entre a hipercolesterolemia familiar e transtornos neurológicos, como o transtorno de humor e ansiedade (SMITH; BETTERIDGE, 1997; YAMADA *et al.*, 2001; PETER *et al.*, 2002). No entanto, existem poucos estudos pré-clínicos explorando esta associação, particularmente no que se refere ao comportamento do tipo-ansioso e comportamento social em modelos animais da HF.

Tendo em vista a relação entre o aumento dos níveis de colesterol e alterações nos sistemas de neurotransmissão de monoaminas em pacientes com HF, torna-se relevante a investigação pré-clínica do comportamento tipo-ansioso em animais hipercolesterolêmicos, além do envolvimento do eixo HHA neste comportamento, visto que os glicocorticoides são hormônios importantes na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade (FARAVELLI *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2009). Adicionalmente, considerando que humanos com baixos níveis de MAO-A apresentam um comportamento antissocial relacionado à psicopatologia e a existência de evidências de que camundongos LDLr^{-/-} apresentam altos níveis de MAO-A, torna-se relevante investigar possíveis alterações nos níveis de interação social nos camundongos LDLr^{-/-}.

Considerando o conhecimento existente até o momento, hipotetizamos que a deleção genética do LDLr e os altos índices de colesterol estariam relacionados a um aumento dos comportamentos do tipo-ansioso e social, estando estas alterações associadas a altos níveis da enzima MAO-A e à conseqüente redução dos níveis de serotonina (e/ou outras monoaminas) em diferentes áreas do SNC, assim como o envolvimento do eixo HHA nesses comportamentos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis alterações no comportamento social e tipo-ansioso em camundongos machos e fêmeas com deleção genética do LDLr.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a discriminação olfatória dos animais WT e LDLr^{-/-} no teste de discriminação olfatória;
- Analisar o comportamento tipo ansioso dos animais WT e LDLr^{-/-} no teste de enterrar esferas, teste do campo aberto e no teste do labirinto em cruz elevado;
- Avaliar o comportamento social dos animais WT e LDLr^{-/-} no teste de três câmeras e no teste de sociabilidade no campo aberto;
- Quantificar os níveis plasmáticos de colesterol e os níveis de corticosterona em camundongos WT e LDLr^{-/-}.

4. MATERIAL E MÉTODOS

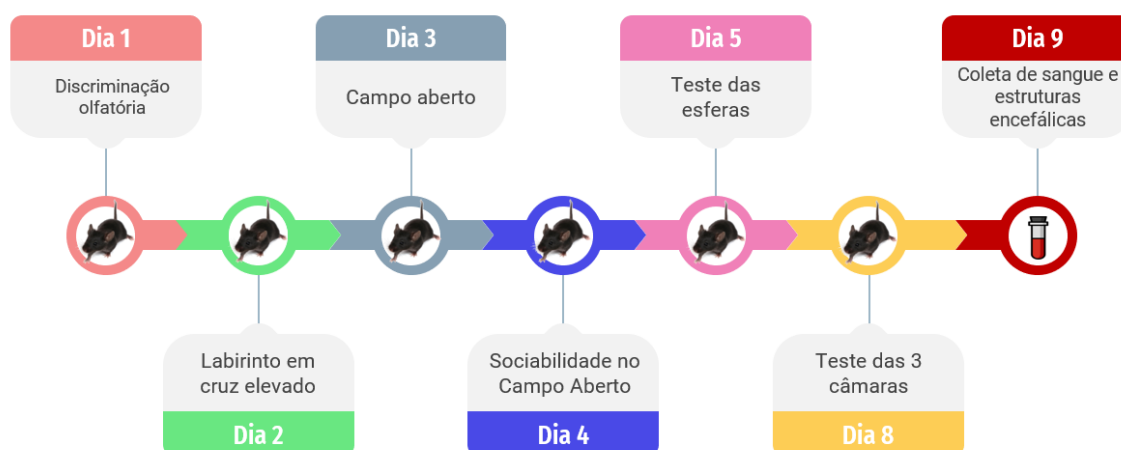
4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas e machos com idade entre 4-5 meses (pesando 20-30 g) das linhagens tipo selvagens C57BL6 (WT – do inglês *Wild-Type*) e LDLr^{-/-} fornecidos pelo biotério do Departamento de Bioquímica da UFSC. Os animais foram alojados em grupos de 5-8 animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em câmaras ventiladas (INSIGHT®) a uma temperatura de 22 ± 2 °C, umidade entre 60 – 80% e ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. O desenho experimental consiste em um protocolo comportamental e análises bioquímicas, para o qual foram utilizados 4 grupos experimentais: I) WT fêmea, II) WT macho, III) LDLr^{-/-} fêmea e IV) LDLr^{-/-} macho.

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental do protocolo comportamental (Figura 4) visou avaliar o comportamento social e do tipo-ansioso dos camundongos WT machos e fêmeas e LDLr^{-/-} machos e fêmeas. Ao final dos testes comportamentais realizou-se a anestesia com isoflurano pela via inalatória para a eutanásia e retirada das estruturas encefálicas hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala, além do sangue para análises bioquímicas.

Figura 4: Desenho experimental do protocolo comportamental.



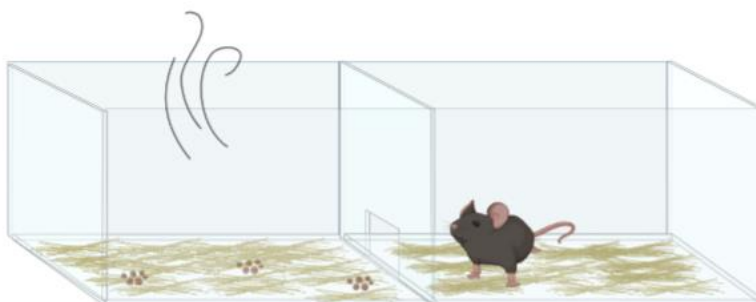
Legenda: Ilustração identificando a sequência dos testes comportamentais do protocolo comportamental que termina com a coleta das estruturas encefálicas. Imagem da autora.

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Discriminação olfatória

O teste de discriminação olfatória foi usado para avaliar a preferência do animal em ficar no compartimento impregnado com o seu cheiro (compartimento familiar) em relação ao compartimento inodoro (não familiar). Este teste foi desenvolvido em nosso laboratório (PREDIGER *et al.*, 2005; 2010) com a intenção de avaliar a capacidade de ratos e camundongos em distinguir odores. A caixa de discriminação olfatória consiste em dois compartimentos idênticos, separados por uma porta aberta que permite o acesso dos animais para os dois compartimentos (familiar e não-familiar). O animal foi colocado no aparato e foi avaliado durante 5 min, o tempo em cada compartimento, o número de cruzamentos entre os compartimentos, a distância total percorrida e a distância em cada compartimento. Cada animal foi filmado com câmeras de vídeo. Antes do início do experimento, os animais foram isolados em duplas ou trios em caixas (42 x 34 x 17 cm) com serragem durante 72 h para facilitar a identificação odorífera da sua maravalha.

Figura 5: Aparato de discriminação olfatória.



Legenda: Ilustração do aparato de discriminação olfatória com um lado contendo maravalha limpa e o outro maravalha familiar do camundongo alvo. Ilustração da autora com a utilização do software *Biorender*®.

4.4.2 Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado é amplamente usado para investigar efeitos tipo-ansiolítico e tipo-ansio gênico em camundongos (LISTER, 1987). O aparato de madeira consiste em dois braços fechados (18 x 6 cm) opostos a dois braços abertos (18 x 6 cm), elevados 60 cm do chão. O experimento foi conduzido com baixa luminosidade (12 lux) e gravados por uma câmera de vídeo. Cada camundongo foi colocado no

quadrante central dos braços, de frente para o braço fechado e o teste teve duração de 5 min. Durante o teste, foram avaliados o tempo de exploração nos braços fechados e abertos e o tempo no centro, além do número de entradas em cada braço. Ao final, foi calculado o percentual de tempo no braço aberto, sendo: % tempo no braço aberto = $(Tempo\ braço\ aberto * 100) / (Tempo\ braço\ aberto + tempo\ braço\ fechado)$, o percentual de entradas no braço aberto também será calculado: % entradas no braço aberto = $(N^{\circ}\ entradas\ braço\ aberto * 100) / (N^{\circ}\ entradas\ braço\ aberto + N^{\circ}\ entradas\ braço\ fechado)$, e o número de entradas nos braços fechados. Um aumento da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado corresponde a um perfil menos ansioso neste teste.

Figura 6: Aparato do labirinto em cruz elevado.

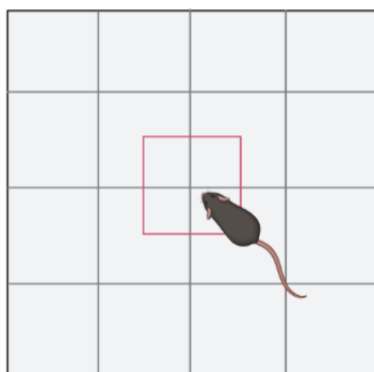


Legenda: Da esquerda para direita: Vista lateral dos braços aberto, vista lateral dos braços fechados, vista superior do aparato. Ilustração realizada com o uso do software *Mind The Graph*®.

4.4.3 Campo aberto

O teste do campo aberto consiste em um aparato contendo uma área central aversiva que representa um modelo amplamente utilizado e possibilita a avaliação tanto da atividade locomotora como do comportamento relacionado à ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). O aparato constitui-se de uma caixa de acrílico transparente (40 x 40 cm), sem cobertura e com assoalho cinza, dividida por linhas pretas em 12 quadrados (10 x 10 cm). Cada camundongo foi colocado no centro da arena, permitindo sua movimentação livremente no aparato durante o período de 5 min. Após o término do teste de cada animal, a superfície foi limpa com álcool 10%. Com a utilização do *software* Anymaze® foram avaliados os seguintes parâmetros: a distância total percorrida e o tempo de permanência no centro. Sendo o último indicativo de comportamento relacionado à ansiedade (MOREIRA, *et al.*, 2014).

Figura 7: Aparato do campo aberto.

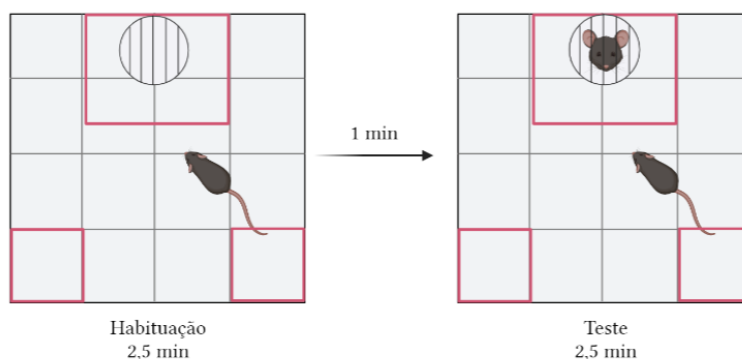


Legenda: Ilustração do campo aberto com a delimitação da área central “aversiva”. Ilustração adaptada de *Biorender*®.

4.4.4 Sociabilidade no campo aberto

O comportamento social em laboratório pode ser avaliado medindo os movimentos de camundongos que se movimentam na direção ou longe de um alvo social desconhecido, no caso, outro camundongo. O teste se deu na arena do campo aberto (anteriormente mencionado), foi adicionada uma pequena gaiola de malha de arame no meio de um dos lados. Os movimentos do animal foram gravados com um sistema de vídeo. O camundongo alvo (entre 4-5 meses, pesando em torno de 20-30g) foi introduzido na arena em duas sessões consecutivas de 2,5 min. Durante a primeira sessão, sem objetivo social, a pequena gaiola de malha de arame estava vazia. Durante o segundo momento, um camundongo desconhecido e do mesmo sexo, idade e peso do animal testado (que foi alojado em condições semelhantes) foi colocado na gaiola de malha de arame. Entre os testes, o camundongo experimental foi removido da arena e colocado em sua gaiola por um minuto. Os vídeos foram analisados pelo software Anymaze® para determinar o tempo gasto na zona de interação social (a zona que circunda a pequena gaiola de malha de arame que contém 7 x 7 cm em torno da gaiola) e as zonas periféricas mais distantes da gaiola (que contém 7 x 7 cm) (KRISHNAN *et al.*, 2007, BERTON *et al.*, 2006).

Figura 8: Aparato sociabilidade no campo aberto

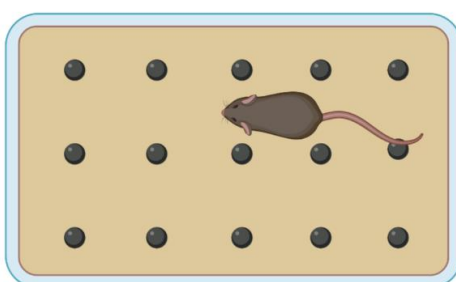


Legenda: Ilustração da autora com base em Krishnan *et al.*(2007); Berton *et. al.* (2006). Biorender®.

4.4.5 Teste de esconder esferas

O teste de esconder esferas é um método usado para testar fármacos ansiolíticos, sendo que é capaz de avaliar o comportamento de enterrar em resposta a estímulos ansiogênicos (HART *et al.*, 2016; KEDIA; CHATTARJI, 2014). Este teste também pode indicar o nível de ansiedade, visto que os roedores exibem o comportamento de esconder (enterrar) objetos estranhos, alimentos nocivos ou objetos inanimados, como as esferas de vidro. Essa ação deve-se ao medo ou aversão que é medido a cada esfera escondida, ou seja, quanto maior o número de objetos escondidos maior a ansiedade do animal (BROEKKAMP *et al.*, 1986). O aparato consiste em uma caixa (17,5 x 10 x 5,5 cm) contendo 5 cm de maravalha distribuídas uniformemente na base do aparato. Vinte esferas de vidro (1,4 cm de diâmetro) serão alocadas enfileiradas com 4 x 5 esferas na superfície da maravalha. Durante 20 min será registrada a quantidade de esferas enterradas (até 2/3 de profundidade) nos tempos 5 min, 10 min, 15 min e 20 min de duração do teste (COLLA *et al.*, 2015).

Figura 9: Ilustração do teste de esconder esferas.

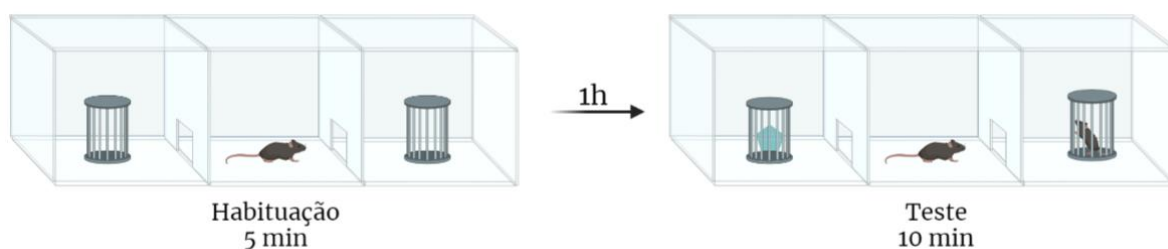


Legenda: Caixa de maravalha com as bolinhas de gude usadas. Imagem adaptada de Biorender®.

4.4.6 Teste das três câmaras

O teste das três câmaras foi também usado para avaliar o comportamento social dos camundongos em relação a outros camundongos (O'TUATHEIGH *et al.*, 2007; DESBONNET *et al.*, 2012). O experimento foi realizado conforme Silverman *et al.* (2010), em uma arena de madeira que consiste em três câmaras (cada uma com 20 x 40 cm), separadas por uma parede de madeira com uma pequena porta aberta (5 x 8 cm). Em um dos compartimentos ficou um alvo social (outro camundongo desconhecido, de caixa diferente e do mesmo sexo, idade aproximada e peso do animal testado) em uma pequena gaiola de malha de arame. Em outro compartimento ficou um estímulo neutro (gaiola de malha de arame com um lego dentro) e a sala do meio estava vazia. O camundongo teve um tempo de 5 min para habituação ao ambiente (sem nenhum estímulo nas gaiolas), após uma hora ele foi observado durante a exploração da arena contendo o animal novo e o lego por 10 min. Foi medido o tempo que o animal se manteve em cada câmara, número de entradas em cada câmara e distância total percorrida. Sendo que é considerado um comportamento mais social quando o animal em teste passa mais tempo explorando o local que contém a gaiola com um animal alvo (O'TUATHEIGH *et al.*, 2007; DESBONNET *et al.*, 2012).

Figura 10: Ilustração do teste das três câmaras.



Legenda: Ilustração adaptada de Biorender®. Com base em O'Tuatheigh *et al.* (2007); Desbonnet *et al.* (2012).

4.5 CONTROLE DA INGESTÃO DE ALIMENTO E PESO DOS ANIMAIS

Como parâmetros de controle dos animais utilizados foi registrado o peso e o consumo alimentar dos animais. O consumo de comida foi registrado durante o período do protocolo comportamental, sendo que a comida foi pesada no dia início do protocolo, no dia 1, e posteriormente no final do protocolo, no dia 7. A quantidade de alimento consumida por 2 animais por caixa foi calculada subtraindo o sétimo dia do primeiro. O gráfico está representado o valor do consumo total por caixa durante 1 semana. O peso dos animais foi registrado no dia 1 do início do protocolo.

4.7 COLETA DE SANGUE E DE ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS

Os animais do protocolos experimental foram anestesiados e após ser certificada a anestesia, foram submetidos à decapitação rápida. O sangue dos animais foi coletado a partir da decapitação rápida (a partir das 16h da tarde), logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos para a separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas a -80°C até a realização dos ensaios. Os encéfalos foram rapidamente dissecados e as amostras de amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo pesadas e congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C para a realização de análises bioquímicas futuras.

4.8 EXPERIMENTOS BIOQUÍMICOS

4.8.1 Quantificação do colesterol sérico

A quantificação do colesterol total no soro dos camundongos foi realizada utilizando reagentes comerciais (Gold Analisa®), seguindo as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.8.2 Quantificação dos níveis de corticosterona no sangue

O sangue dos animais foi coletado como descrito na sessão anterior (4.7) e os níveis de corticosterona foram mensurados a partir do soro sanguíneo empregando o método de ELISA, utilizando kit comercial IBL International®.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* Statistica® 8.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, EUA). Os dados brutos foram testados para *outliers* usando o teste de *Grubbs* e verificados quanto à normalidade da distribuição (Kolmogorov-Smirnov). O teste *t de Student* em relação a 50% foi feito para o teste de discriminação olfatória e o teste *t de Student* em relação a 33% foi feito no teste das 3 câmaras para analisar a % de tempo de permanência em cada uma das 3 câmaras. A análise de variância (ANOVA) de duas vias ou de medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls, foi aplicada para comparações múltiplas nos testes de discriminação olfatória, campo aberto, labirinto em cruz elevado, sociabilidade no campo aberto e 3 câmaras, além do consumo de comida e controle de peso e nas análises bioquímicas de dosagem de colesterol e corticosterona. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar duas amostras independentes no teste de enterrar esferas. Os dados são sempre representados como média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância considerado para todos os testes é de $p < 0,05$. Os gráficos foram construídos usando o *software* GraphPad Prism 7® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 PROTOCOLO COMPORTAMENTAL

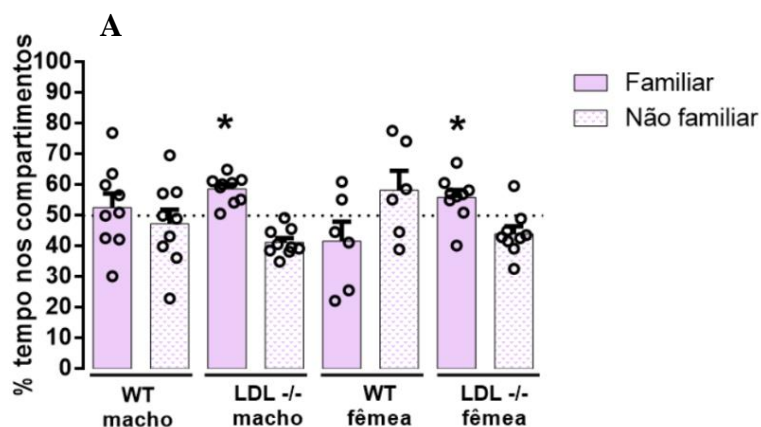
O bloco comportamental apresenta os resultados obtidos a partir dos testes comportamentais de sociabilidade e comportamento do tipo-ansioso com os animais WT macho e fêmea e LDLr^{-/-} macho e fêmea. Todos os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) – CCB, UFSC.

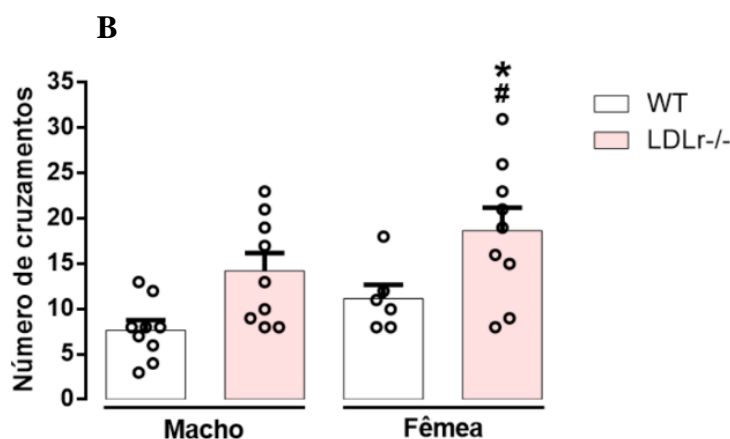
5.1.1 Teste da discriminação olfatória

A figura 11 apresenta os resultados referentes ao teste da discriminação olfatória. Foi utilizado o *t de Student* em relação a 50%, considerando o tempo (%) que os animais permaneceram investigando o ambiente familiar e não familiar. Foi observado que os animais do grupo LDL^{-/-} fêmea ($t=2,424$; $p=0,0416$) e LDL^{-/-} macho ($t=5,913$; $p=0,0004$) foram capazes de discriminar o compartimento familiar, visto que exploraram mais de 50% do tempo. No entanto, as WT fêmea ($t=1,309$; $p=0,247$) e os WT macho ($t=0,575$; $p=0,580$) não foram capazes de discriminar os compartimentos (Figura 11 A).

Foi usado como parâmetro locomotor o número de cruzamentos entre os compartimentos (Figura 11 B). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 29)=12,869$, $p=0,00121$], sem efeitos significativos para os fatores sexo [$F(1, 29)=4,1113$, $p=0,05188$] e para a interação dos fatores [$F(1, 29)=,05810$, $p=0,81122$]. O teste post-hoc de Newman Keuls indicou que o grupo LDL^{-/-} fêmea diferiu dos grupos WT (ambos macho e fêmea), demonstrando uma hiperlocomoção do grupo LDL^{-/-} fêmea em relação ao grupo controle.

Figura 11: Resultado do teste de discriminação olfatória.





Legenda: A) Tempo (%) que os animais permaneceram no compartimento familiar. B) Número de cruzamentos realizados durante o teste da discriminação olfatória. Os dados representam a média \pm EPM (n=6-9). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste *t de Student* (A) e a ANOVA de duas vias (A). * $p > 0,05$ quando comparado ao valor teórico de 50% em A, * $p > 0,05$ em relação ao genótipo em B.

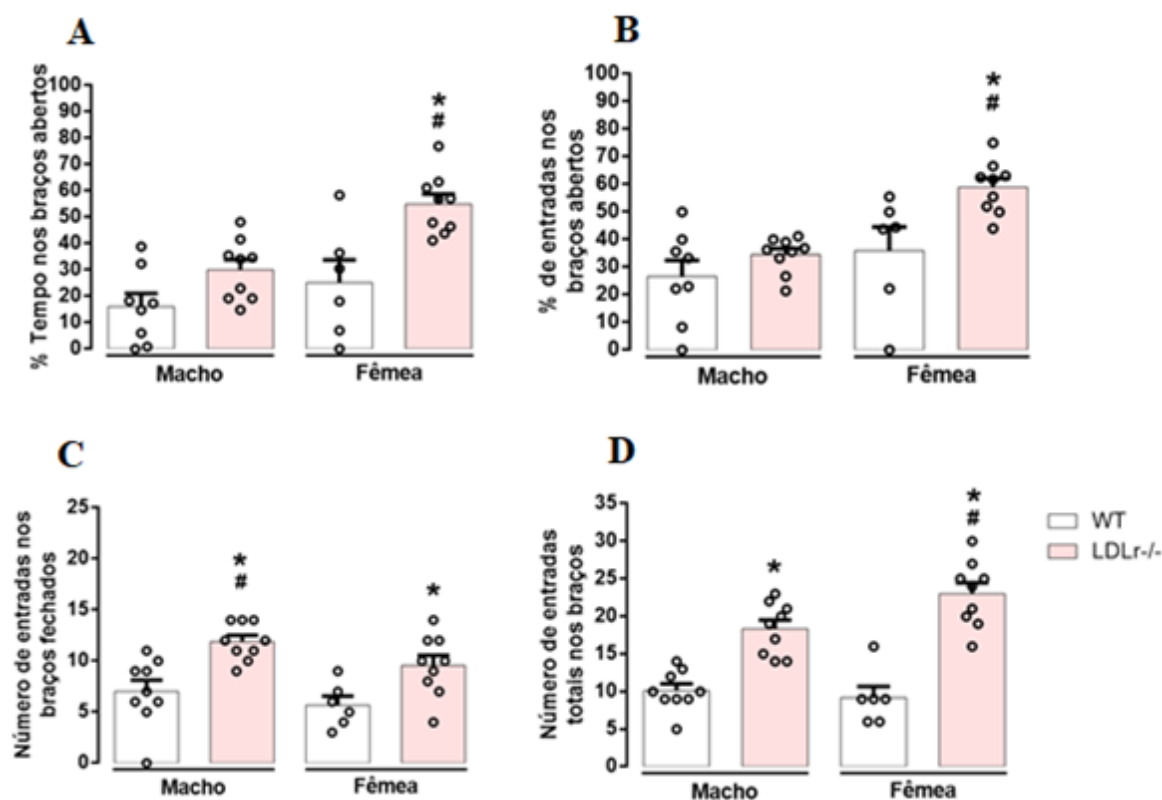
5.1.2 Teste do labirinto em cruz elevado

Os dados quanto ao comportamento do tipo-ansioso obtidos por meio do teste do labirinto em cruz elevado estão representados na Figura 12. Quanto a % de tempo nos braços abertos, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator genótipo [F(1, 28)=18,284, $p=0,00020$] e sexo [F(1, 28)=10,949, $p=0,00258$], mas sem efeitos significativos para a interação dos fatores [F(1, 28)=2,4052, $p=0,13216$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que o grupo LDLr/- fêmea permaneceu mais tempo nos braços abertos do que todos os outros grupos (Figura 12 A). Quanto a percentagem de entradas nos braços abertos, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator genótipo [F(1, 28)=10,044, $p=0,00368$] e sexo [F(1, 28)=12,057, $p=0,00169$], mas sem efeitos significativos para a interação dos fatores [F(1, 28)=2,3802, $p=0,13411$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que o grupo LDLr/- fêmea entrou mais nos braços abertos do que todos os outros grupos (Figura 12 B). Esses dois resultados se complementam, indicando um comportamento do tipo-ansioso diminuído das fêmeas LDLr/-.

O número de entradas nos braços fechados de cada grupo está representado na Figura 12 C e foi usado como parâmetro locomotor, onde a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator genótipo [F(1, 29)=21,235, $p=0,00008$], mas sem efeitos significativos para sexo [F(1, 29)=3,7054, $p=0,06410$] nem para a interação dos fatores [F(1, 29)=0,27561, $p=0,60359$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que

o grupo LDLr^{-/-} fêmea entrou mais nos braços fechados do que WT fêmea e LDLr^{-/-} macho entrou mais nos braços fechados do que o grupo WT (machos e fêmeas). O número de entradas totais se deu pela soma das entradas nos braços fechados com os braços abertos e está representada na Figura 12 D, onde a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo fator genótipo [$F(1, 29)=75,901$, $p=0,00000$] e interação dos fatores [$F(1, 29)=4,9126$, $p=0,03466$], mas sem efeitos significativos para o fator sexo [$F(1, 29)=2,1618$, $p=0,15225$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que o grupo LDLr^{-/-} fêmea teve maior locomoção comparada a todos os outros grupos e que os animais LDLr^{-/-} apresentaram maior locomoção do que os animais WT (macho e fêmea).

Figura 12: Avaliação do comportamento do tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado.



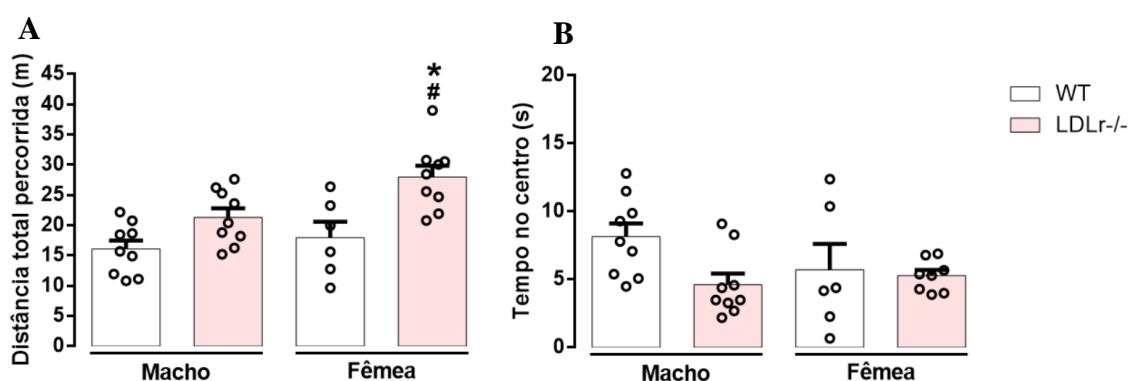
Legenda: A) % de tempo que os animais permaneceram nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (* $p<0,5$ em relação ao genótipo e # $p<0,5$ em relação ao sexo - LDLr^{-/-} fêmea diferente de todos os outros grupos). B) % de entradas dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (* $p<0,5$ em relação ao genótipo e # $p<0,5$ em relação ao sexo - LDLr^{-/-} fêmea diferente de todos os outros grupos). C) Número de entradas dos animais nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (* $p<0,5$ em relação ao genótipo e # $p<0,5$ em relação ao sexo - LDLr^{-/-} macho diferente de WT e LDLr^{-/-} fêmea diferente de WT fêmea). D) Número totais de entradas nos braços (abertos e fechados somados) (* $p<0,5$ em relação ao genótipo e # $p<0,5$ em relação ao sexo - LDLr^{-/-} fêmea diferente de todos os outros grupos e LDLr^{-/-} macho diferente do grupo WT). Os dados representam a média \pm EPM ($n=6-9$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a ANOVA de duas vias seguidas do teste *post-hoc* de Newman Keuls.

5.1.3 Teste do campo aberto

A Figura 13 mostra os resultados obtidos no teste do campo aberto. A distância total percorrida foi utilizada como parâmetro de locomoção espontânea, sendo que a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 29)=17,799$, $p=0,00022$] e sexo [$F(1, 29)=5,6356$, $p=0,02444$] sem efeitos significativos para a interação dos fatores [$F(1, 29)=1,7608$, $p=0,19487$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que o grupo LDLr^{-/-} fêmea percorreu uma distância maior (em metros) do que todos os outros grupos (Figura 13 A).

O tempo de permanência do centro do aparato foi analisado como parâmetro para o comportamento do tipo-ansioso (Figura 13 B). A ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 28)=3,6995$, $p=0,06465$], sexo [$F(1, 28)=0,72123$, $p=0,40294$] e nem para a interação dos fatores [$F(1, 28)=2,2273$, $p=0,14678$].

Figura 13: Avaliação da locomoção e do comportamento do tipo-ansioso no teste do campo aberto.



Legenda: A) Distância total percorrida (m) (* $p<0,5$ em relação ao genótipo e # $p<0,5$ em relação ao sexo – LDLr^{-/-} fêmea diferente de todos os outros grupos). B) Tempo (s) que os animais permaneceram na região central do aparato. Os dados representam a média \pm EPM ($n=6-9$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a ANOVA de duas vias seguidas do teste *post-hoc* de Newman Keuls.

5.1.4 Teste da sociabilidade no campo aberto

A sociabilidade dos animais foi inicialmente avaliada por meio da interação com um animal alvo no campo aberto e os resultados estão apresentados na Figura 14. O tempo na zona social durante a habituação (sem o animal alvo presente) e no teste (com o animal alvo presente) foi analisado utilizando ANOVA de duas vias com medidas repetidas, a qual indicou um efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 28)=12,319$, $p=0,00154$] e para o fator repetição [$F(1, 28)=12,188$, $p=0,00161$], mas não teve efeito para o fator sexo [$F(1, 28)=0,34424$, $p=0,56209$], interação dos fatores [$F(1, 28)=0,63563$, $p=0,43201$], repetição com genótipo [$F(1, 28)=0,17907$, $p=0,67540$], repetição com sexo [$F(1, 28)=0,08719$, $p=0,76996$] e nem repetição com interação dos fatores [$F(1, 28)=0,40428$, $p=0,53005$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls não indicou diferenças estatísticas significativamente relevantes (Figura 14 A).

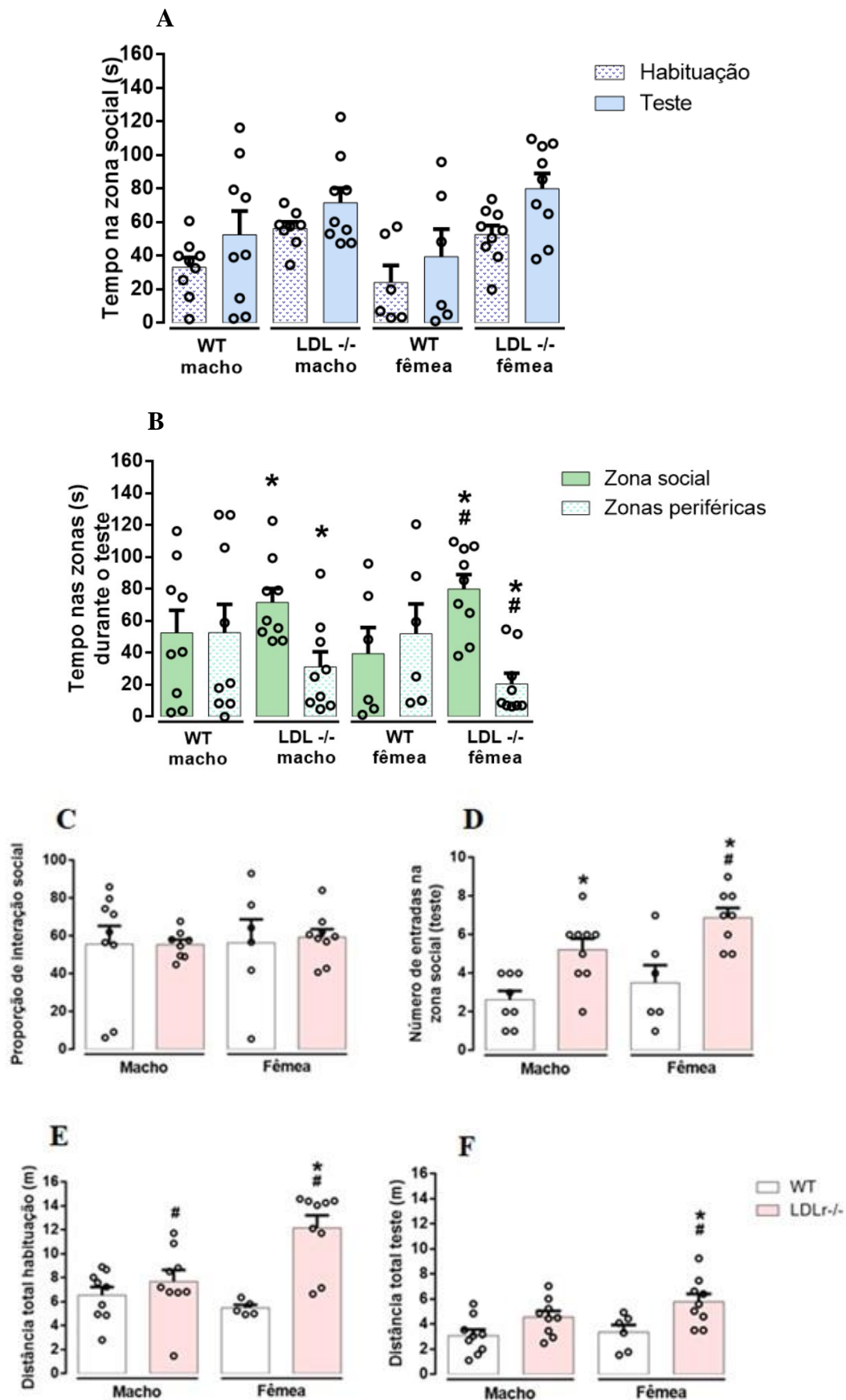
Para analisar o tempo permanecido na zona social e nos cantos mais distantes foi utilizado ANOVA de duas vias com medidas repetidas, a qual indicou um efeito significativo para o fator repetição com interação no fator genótipo [$F(1, 29)=5,2948$, $p=0,02877$]. Não houve efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 29)=0,19060$, $p=0,66565$] para o fator sexo [$F(1, 29)=1,0515$, $p=0,31365$], interação dos fatores [$F(1, 29)=0,54599$, $p=0,46590$], fator repetição [$F(1, 29)=3,1787$, $p=0,08508$], repetição com sexo [$F(1, 29)=0,01787$, $p=0,89457$] e nem repetição com interação dos fatores [$F(1, 29)=0,41197$, $p=0,52601$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou as LDLr^{-/-} fêmeas permaneceram mais tempo na zona social do que o grupo WT ficou no social, as LDLr^{-/-} fêmeas permaneceram menos tempo nas zonas periféricas do que o grupo WT. O teste também indicou que LDLr^{-/-} macho ficou mais tempo na zona social e menos tempo nas zonas periféricas do que o grupo WT (Figura 14 B).

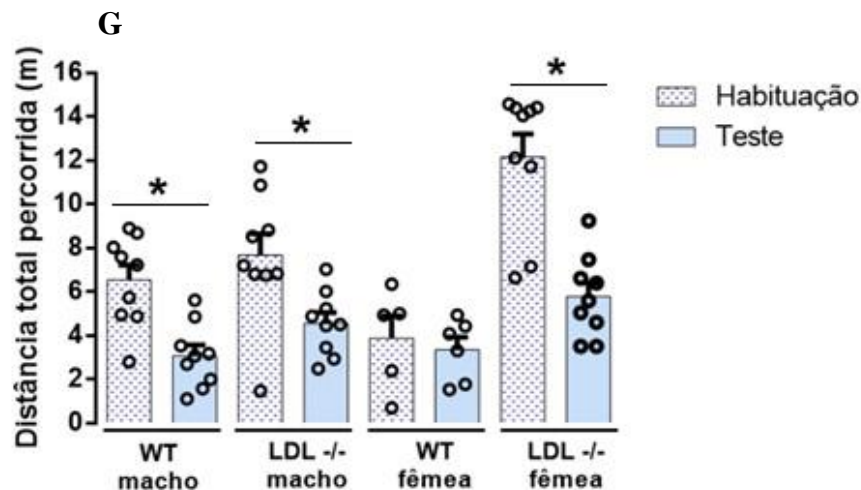
A taxa de exploração foi calculada com $(\text{Tempo no teste}/(\text{tempo no teste} + \text{tempo na habituação})) \times 100$ e a ANOVA de duas vias não mostrou nenhuma diferença estatística para o fator genótipo [$F(1, 28)=0,03033$, $p=0,86300$], sexo [$F(1, 28)=0,08585$, $p=0,77168$] e para a interação dos fatores [$F(1, 28)=0,04406$, $p=0,83526$] (Figura 14 C).

O número de entradas na zona social durante o teste foi analisado com ANOVA de duas vias, indicando um efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 27)=24,070$, $p=0,00004$] e sexo [$F(1, 27)=4,3121$, $p=0,04749$], mas sem efeitos significativos para a interação dos fatores [$F(1, 27)=0,40825$, $p=0,52824$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que as LDLr^{-/-} fêmeas cruzaram mais a zona social do que o grupo WT, já os LDLr^{-/-} machos cruzaram mais a zona social do que os WT machos (Figura 14 D).

Analisou-se também a distância percorrida em metros como um parâmetro locomotor em cada situação e a comparação da habituação com o teste. A distância total percorrida durante a habituação está apresentada na Figura 14 E, onde a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 28)=22,772, p=0,00005$] e a interação dos fatores [$F(1, 28)=13,135, p=0,00114$], mas sem diferença estatística para o fator sexo [$F(1, 28)=0,85879, p=0,36200$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que o grupo LDLr-/- fêmea percorreu uma maior distância do que todos os outros grupos e os machos LDLr-/- percorreram maior distância que WT fêmea e menor que LDLr-/- fêmea. Na Figura 14 F está demonstrado a distância percorrida durante o teste, onde a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 29)=12,313, p=0,00149$], mas sem efeitos significativos para sexo [$F(1, 29)=1,7973, p=0,19045$] nem para a interação dos fatores [$F(1, 29)=,71843, p=0,40360$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que o grupo LDLr-/- fêmea percorreu maior distância que do que o grupo WT. Quanto à comparação da distância percorrida na habituação e no teste (Figura 14 G), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou um efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 28)=25,593, p=0,00002$], interação dos fatores [$F(1, 28)=9,7218, p=0,00419$], fator repetição [$F(1, 28)=9,7218, p=0,00419$], repetição com genótipo [$F(1, 28)=8,5168, p=0,00687$] e repetição com interação dos fatores [$F(1, 28)=11,015, p=0,00252$]. Não foi observado efeito estatístico para o fator sexo [$F(1, 28)=1,2418, p=0,27460$] ou para o fator repetição com sexo [$F(1, 28)=0,13386, p=0,71721$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que o grupo LDLr-/- fêmea percorreu maior distância durante a habituação do que todos os outros grupos, o grupo LDLr-/- macho percorreu maior distância durante a habituação do que durante o teste, além de percorrer maior distância do que o grupo WT macho. O grupo WT macho percorreu maior distância na habituação do que no teste, além de ter percorrido maior distância que o grupo WT fêmea no teste e menor que LDLr-/- fêmea na habituação.

Figura 14: Avaliação da locomoção e do comportamento social no teste da sociabilidade no campo aberto.



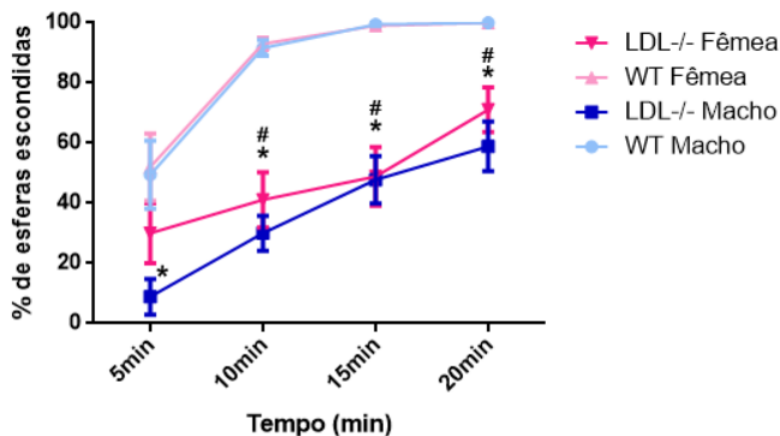


Legenda: A) Tempo na zona social durante habituação (sem animal alvo) e teste (com animal alvo). B) Tempo (s) de permanência nas zonas distantes e na zona social durante o teste (* $p < 0,5$ em relação ao genótipo e # $p < 0,5$ em relação ao sexo – *ver texto*). C) Taxa de exploração na zona social dado por (Tempo no teste/(tempo no teste + tempo na habituação))*100. D) Número de entradas na zona social durante o teste (* $p < 0,5$ em relação ao genótipo e # $p < 0,5$ em relação ao sexo – onde LDL^{-/-} fêmea diferente do grupo WT e LDL^{-/-} macho diferente de WT macho). E) Distância total percorrida durante a habituação (* $p < 0,5$ em relação ao genótipo e # $p < 0,5$ em relação ao sexo – LDL^{-/-} fêmea diferente de todos os outros grupos e LDL^{-/-} macho diferente das fêmeas). F) Distância total percorrida durante o teste (* $p < 0,5$ em relação ao genótipo e # $p < 0,5$ em relação ao sexo – LDL^{-/-} fêmea diferente do grupo WT). G) Distância total percorrida na habituação comparado ao teste * $p < 0,5$ em relação habituação X teste. Os dados representam a média \pm EPM (n=6-9). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a ANOVA de duas vias (C, D, E e F) ou ANOVA de duas vias com medidas repetidas (A, B e G) seguidas do teste *post-hoc* de Newman Keuls. * $p < 0,5$ em relação ao genótipo e # $p < 0,5$ em relação ao sexo.

5.1.5 Teste de esconder esferas

O comportamento estereotipado do tipo-ansioso relacionado foi avaliado por meio do teste de esconder esferas (Figura 15). O Teste de Kruskal-Wallis revelou que nos primeiros 5 min o grupo LDL^{-/-} macho enterrou menos esferas do que o grupo WT [H (3, N= 32) =12,03257 $p = 0,0073$] e nos tempos de 10 min [H (3, N= 32) =22,86350 $p = 0,0000$], 15 min [H (3, N= 32) =23,86475 $p = 0,00001$] e 20 min [H (3, N= 32) =21,27523 $p = 0,0001$]. Tanto o grupo LDL^{-/-} fêmea quanto o LDL^{-/-} macho enterraram menos esferas do que o grupo WT, indicativo de uma menor resposta de ansiedade.

Figura 15: Avaliação do comportamento do tipo-ansioso no teste de esconder esferas.



Legenda: Gráfico representando a % de esferas enterradas aos 5, 10, 15 e 20min no teste de esconder esferas. Os dados representam a média \pm EPM (n=6-9). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. * $p < 0,5$ em relação ao genótipo e # $p < 0,5$ em relação ao sexo.

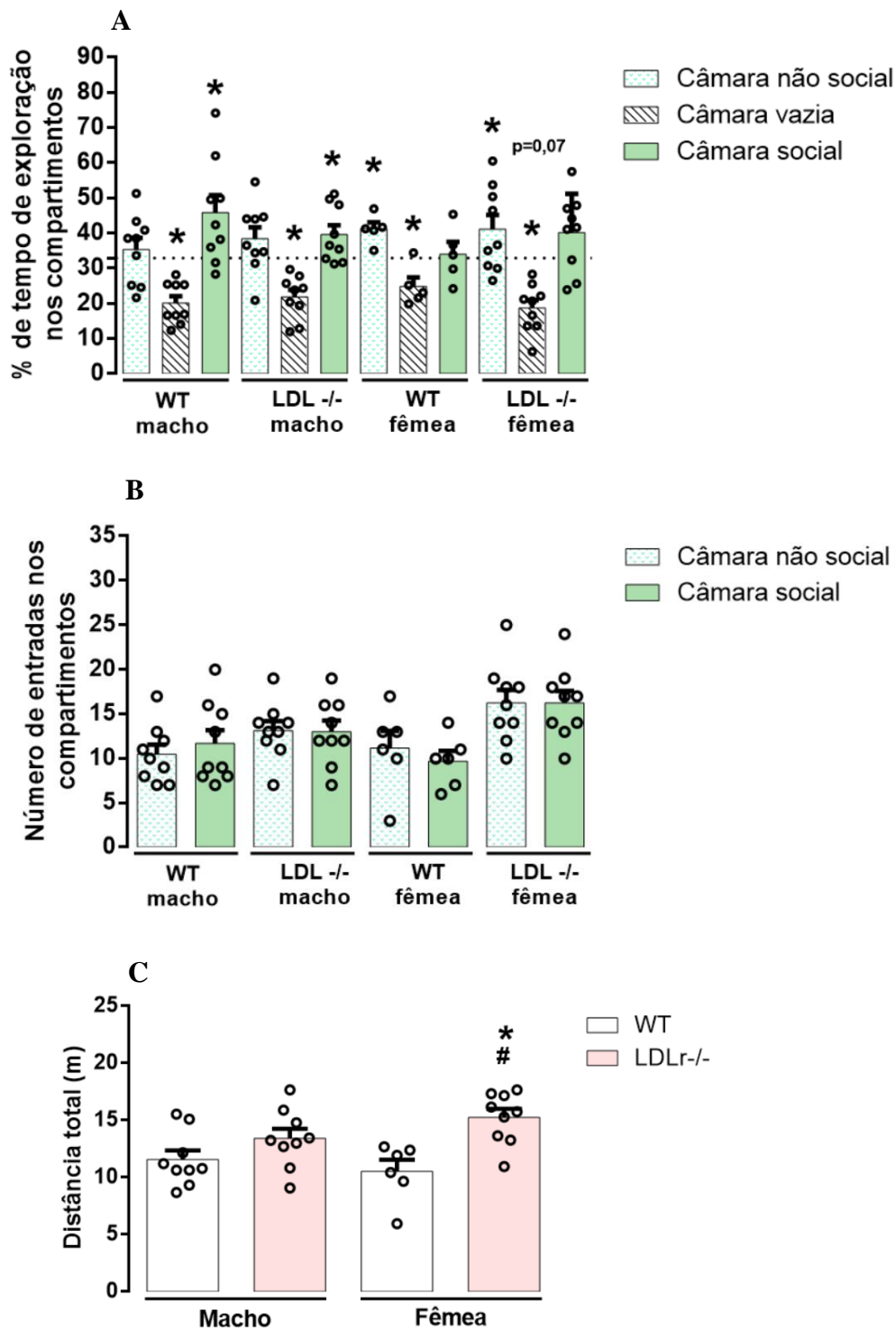
5.1.6 Teste das três câmaras

O teste das três câmaras foi realizado para avaliar o comportamento social dos animais, sendo os resultados deste teste apresentados na Figura 16. Foi utilizado o teste *t de Student* em relação a 33% para analisar a % de tempo que os grupos ficaram nos compartimentos das três câmaras distintas, a do meio vazia, uma contendo a gaiola de arame contendo um objeto (Lego®) e outra com a gaiola de arame contendo um camundongo não familiar dentro. Todos os grupos permaneceram um tempo inferior na câmara vazia: WT macho ($t=6,533$; $p=0,0002$), WT fêmea ($t=3,185$; $p=0,0334$), LDLr-/- macho ($t=5,416$; $p=0,0006$) e LDLr-/- fêmea ($t=0,297$; $p=0,0002$). Os grupos WT macho ($t=2,590$; $p=0,0321$) e LDLr-/- macho ($t=2,487$; $p=0,0377$) ficaram mais tempo dentro do compartimento com o estímulo social, enquanto o grupo WT fêmea ($t=4,365$; $p=0,0120$) permaneceu mais tempo no compartimento não social (Figura 16 A).

Quanto ao número de entradas nos diferentes compartimentos, foi realizado o *t de Student* que indicou ausência de diferenças significativas entre os grupos (Figura 16 B). A distância total percorrida nos compartimentos durante os 10 min de teste foi utilizada como parâmetro locomotor, sendo que a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 29)=14,910$, $p=0,00058$], mas sem efeitos significativos para os fatores sexo [$F(1, 29)=0,21123$, $p=0,64924$] nem para a interação

dos fatores [F(1, 29)=2,9061, p=0,09894]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que o grupo LDLr^{-/-} fêmea percorreu uma distância maior do que o grupo WT (Figura 16 C).

Figura 16: Avaliação da locomoção e do comportamento social no teste das três câmaras.



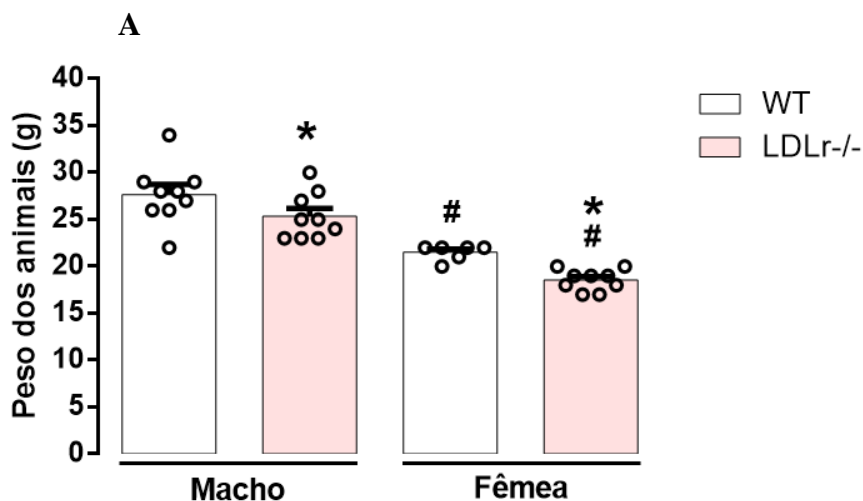
Legenda: A) Percentagem de tempo que os animais exploraram os compartimentos, análise da % do tempo em relação a 33%. * $p > 0,05$ quando comparado ao valor teórico de 33%. B) Número de entradas dos animais em cada compartimento. C) Distância (m) total percorrida pelos animais, onde * $p < 0,5$ em relação ao genótipo e # $p < 0,5$ em relação ao sexo – LDLr^{-/-} fêmea diferente do grupo WT. Os dados representam a média \pm EPM (n=6-9). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste *t de Student* em relação a 33% (A) teste *t de Student* (B) e a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls (c).

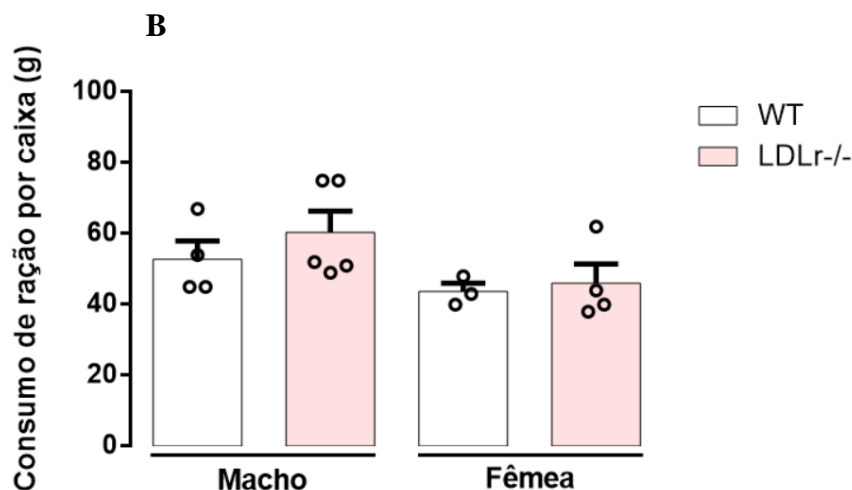
5.1.7 Controle do peso e do consumo alimentar dos animais

Todos os animais foram pesados no início do protocolo comportamental para o controle de peso dos animais (Figura 17 A). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para os fatores genótipo [F(1, 29)=11,087, $p=0,00238$] e sexo [F(1, 29)=66,691, $p=0,00000$], mas sem efeitos significativos para a interação dos fatores [F(1, 29)=0,14864, $p=0,70265$]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que o grupo LDLr^{-/-} macho apresentou menor peso do que os animais WT machos. Além disso, as fêmeas LDLr^{-/-} são mais leves do que todos os outros grupos.

O controle do consumo de comida durante 7 dias da dupla ou trio de animais de cada caixa está representado na Figura 17 B. A ANOVA de duas vias não indicou um efeito significativo para o fator genótipo [F(1, 11)=,34925, $p=0,56648$], sexo [F(1, 11)=3,4250, $p=0,09123$] nem para a interação dos fatores [F(1, 11)=0,02419, $p=0,87923$]. Estes resultados indicam que os animais de todos os grupos tiveram um consumo de comida semelhante ao longo da bateria de testes comportamentais.

Figura 17: Controle do peso e do consumo alimentar dos animais.



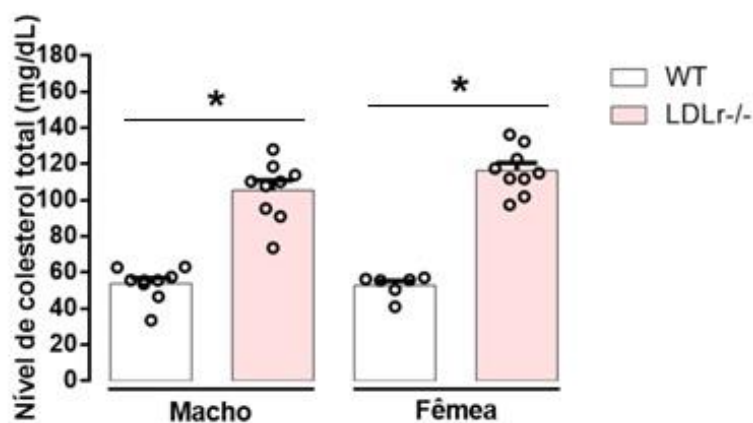


Legenda: A) Controle de peso dos animais, onde todos os grupos diferem entre si * $p < 0,5$ em relação ao genótipo e # $p < 0,5$ em relação ao sexo. B) Controle de comida dos animais. Os dados representam a média \pm EPM ($n=3-5$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a ANOVA de duas vias seguidas.

5.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

5.2.1 Níveis séricos de colesterol

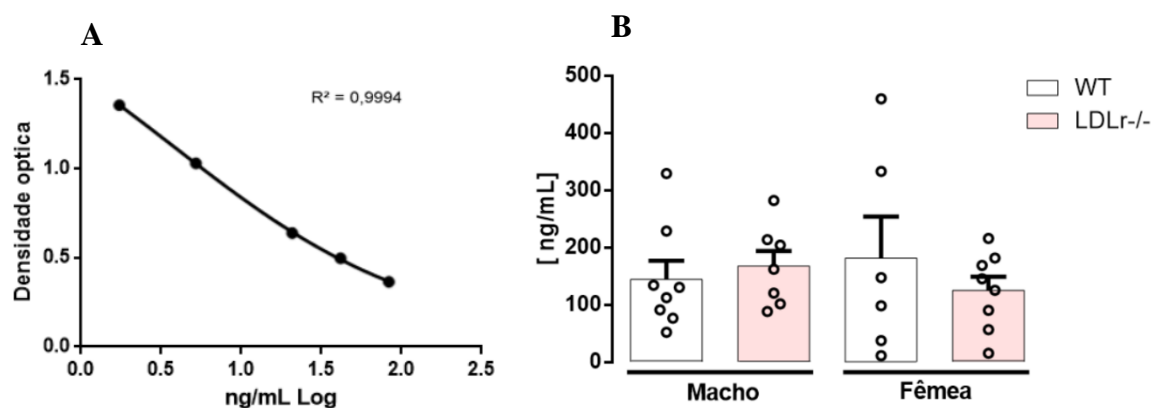
Os níveis séricos de colesterol total dos animais foram avaliados ao final da bateria de testes comportamentais e os resultados estão apresentados na Figura 18. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator genótipo [$F(1, 29)=179,86$, $p=0,00000$], mas sem efeitos para o fator sexo [$F(1, 29)=1,3145$, $p=0,26096$], nem para a interação dos fatores [$F(1, 29)=1,9225$, $p=0,17615$]. Conforme esperado, o teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou que os níveis plasmáticos de colesterol total são superiores nos animais LDLr-/- de ambos os sexos em relação aos grupos WT.

Figura 18: Dosagem dos níveis séricos de colesterol total.

Legenda: Nível séricos de colesterol total em mg/dL. Os dados representam a média \pm EPM (n=6-9). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a ANOVA de duas vias seguidas do teste *post-hoc* de Newman Keuls. * $p < 0,5$ em relação ao genótipo.

5.2.2 Níveis séricos de corticosterona

Os níveis séricos de corticosterona dos grupos de LDLr-/- e WT foram mensurados pelo método de Elisa de interpolação na curva de absorvância e os resultados estão ilustrados na Figura 19. A ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo para os fatores genótipo [F(1, 25)=0,17668, $p=0,67783$] e sexo [F(1, 25)=0,00524, $p=0,94286$], e nem para a interação dos fatores [F(1, 25)=1,0149, $p=0,32337$].

Figura 19: Níveis séricos de corticosterona.

Legenda: A) Curva padrão de corticosterona em ng/mL log B) Níveis de corticosterona em ng/mL. Os dados representam a média \pm EPM (n=6-9). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se ANOVA de duas vias.

6. DISCUSSÃO

A relação da ausência da expressão do receptor de LDL e o consequente aumento do colesterol com diferenças no comportamento social e ansioso ainda é pouco pesquisada, seja na clínica ou em modelos pré-clínicos. A literatura demonstra relevantes alterações de neurotransmissão de monoaminas em pacientes com HF (SMITH; BETTERIDGE, 1997), sabe-se que disfunções monoaminérgicas são vistas em pacientes com transtornos de ansiedade (FARAVELLI *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2009). Pesquisas pré-clínicas demonstram que a dieta hiperlipídica (que eleva os níveis de colesterol) em camundongos WT induzem o comportamento do tipo-ansioso nos animais (STREKALOVA *et al.*, 2015), apesar disso, existem poucas pesquisas com animais LDLr^{-/-} que busquem elucidar respostas ao dimorfismo sexual em relação aos comportamentos de emocionalidade nessa linhagem. Adicionalmente, o comportamento social tem estreita relação fisiológica com as emoções vinculadas aos transtornos de ansiedade, considerando também que baixos níveis de MAO-A estão associados ao comportamento antissocial (BYRD E MANUCK, 2014; NEWMAN *et al.*, 2005 SCOTT *et al.*, 2008; APA, 2014), e os animais LDLr^{-/-} apresentarem altos níveis de MAO-A (ENGEL *et al.*, 2016). Possíveis alterações nesse comportamento e sua diferença sexual ainda se mantinha inexplorado em camundongos LDLr^{-/-} até o momento. Visando isso, testes envolvendo comportamento social e tipo-ansioso foram realizados a fim de desvendar essas lacunas científicas.

O teste de discriminação olfatória foi empregado no presente estudo para descartar que os animais dos grupos LDLr^{-/-} não estivessem com qualquer déficit olfatório. Esse teste foi anteriormente padronizado em nosso laboratório (PREDIGER *et al.*, 2010; PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2005) modificado de (SOFFIÉ; LAMBERTY, 1988). O teste se baseia na ideia de que os camundongos preferem ficar em locais que estão impregnados com seu próprio cheiro do que em lugares com cheiros não familiares (PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2005). Observamos então que os animais LDLr^{-/-} fêmeas e machos foram capazes de discriminar o compartimento familiar, sendo que o exploraram mais de 50% do tempo, apesar dos animais dos grupos WT fêmea e macho não terem discriminado o compartimento familiar. Nossos dados diferem de achados clínicos que demonstraram que pacientes com aumento no colesterol total apresentam uma disfunção olfatória, embora não tenham sido detectadas alterações nas concentrações de LDL nesses pacientes (HUANG *et al.*, 2017). Contudo, quando se trata da HF não há estudos anteriores que busquem investigar disfunções olfatórias em pacientes nem em modelos

animais. Sendo então esse estudo pioneiro em investigar a função olfatória dos animais LDLr-/-.

Um dos principais objetivos do presente estudo foi investigar o comportamento do tipo-ansioso nos animais LDLr/-, para isso foram utilizados três testes comportamentais diferentes. O labirinto em cruz elevado é um teste amplamente utilizado para estudos dos comportamentos semelhantes à ansiedade em camundongos (LISTER, 1987). É um teste com uma grande validade preditiva para triagem de drogas ansiolíticas, sendo que drogas ansiolíticas aumentam o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos, enquanto drogas ansiogênicas diminuem estes parâmetros (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008). É considerado que tanto os braços abertos quanto os fechados evocam o mesmo estímulo exploratório em razão do fator novidade e levam os roedores a responderem defensivamente quando expostos a lugares abertos e altos. Entretanto, a esquiva dos braços abertos é considerada a indução de níveis mais elevados de comportamento do tipo-ansioso (RODGERS; DALVI, 1997), sendo que esse comportamento aversivo estaria relacionado ao medo de lugares abertos e elevados (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008).

No presente estudo observou-se que as fêmeas LDLr/- apresentaram uma redução do comportamento do tipo-ansioso, caracterizado pelo maior tempo e maior número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, quando comparado ao grupo controle. Este achado corrobora resultados prévios que também demonstraram um comportamento do tipo-ansioso diminuído nas LDLr/- fêmeas visto pelo maior tempo de permanência nos braços abertos (SZCZEPANIK, 2015; MACHADO, 2016). Ainda é escasso os trabalhos que tentam elucidar os mecanismos por trás da diminuição comportamento do tipo-ansioso evidenciado nos fêmeas LDLr/- e a diferença sexual observada nesse comportamento.

Apesar disso, artigos da literatura demonstram que camundongos machos (JANG *et al.*, 2019;; JEONG *et al.*, 2019), fêmeas (STREKALOVA *et al.*, 2015) e ratos (ALREFAIE, 2015) tratados com dieta rica em gordura que desenvolverem colesterol alto tem um comportamento do tipo ansioso exacerbado. O aumento dos níveis de glicocorticoides, como a corticosterona, em decorrência do aumento da atividade do eixo HHA, pode levar a transtornos de ansiedade (MARTIN *et al.*, 2009). Como o colesterol é precursor de hormônios esteroides (NELSON; COX, 2014), a elevação deste pode ter relação com o aumento da esteroidogênese e o aumento da corticosterona levar a hiperatividade do eixo HHA, o que explicaria no aumento do comportamento do tipo-

ansioso em animais expostos a uma dieta rica em gordura. Por outro lado, Machado (2016) evidenciou que a dieta rica em gordura faz com que as fêmeas C57BL/6 tenham uma diminuição do comportamento do tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado, mostrando que há controversas na literatura. Portanto, não se tem certeza de que a diminuição do comportamento do tipo-ansioso nas fêmeas LDLr^{-/-} pode estar diretamente ligada ao aumento do colesterol ou então à deleção do LDLr, ou outras alterações bioquímicas presentes nos animais LDLr^{-/-}. Necessitando-se assim de mais estudos.

Além disso, devemos levar em conta que a inibição comportamental induzida pela área de risco não foi suficiente para o comportamento exploratório das fêmeas LDLr^{-/-}. Entretanto, apesar de ter sido observado um aumento do comportamento exploratório tanto nas fêmeas quanto nos machos LDLr^{-/-}, visto pelo aumento no número de entradas nos braços fechados quando comparado ao grupo WT, não foi observado diferença entre os grupos de LDLr^{-/-}. Demonstrando aqui que possivelmente a diminuição do comportamento de risco relacionado ao comportamento do tipo-ansioso pode não ter relação com a hiperlocomoção.

De maneira interessante, fazendo um paralelo com a HF em humanos, um estudo de meta-análise revelou que 4 estudos clínicos indicaram que pacientes com HF tinham sintomas ligeiramente mais baixos de ansiedade em relação aos controles da população em geral (AKIOYAMEN *et al.*, 2018). Um outro estudo com pacientes homocigóticos para HF na Turquia revelou que somente 10% tinham risco aumentado de transtorno de ansiedade, adicionalmente crianças tinham uma propensão ainda menor de desenvolver esse transtorno, porém para a depressão e o risco nos pacientes analisados foi de 30,4% (KAYIKCIOGLU *et al.*, 2019). No entanto, alguns estudos clínicos envolvendo a investigação da ansiedade em pacientes com HF demonstram que a ansiedade observada é na verdade em relação ao diagnóstico positivo da doença e não a algum tipo de transtorno de ansiedade (CIVEIRA *et al.*, 2004; JONGH *et al.*, 2007; MARTEAU *et al.*, 2004).

Outro teste utilizado para a avaliação do comportamento do tipo-ansioso nos camundongos foi o teste do campo aberto, ele foi desenvolvido por Calvin S. Hall em 1932 e hoje é amplamente utilizado para a avaliação de parâmetros relacionados à ansiedade e locomoção. Como os animais são colocados em um ambiente novo, isto gera uma relação de conflito para a exploração da novidade. Esse conflito pode desencadear o comportamento tipo-ansioso nos animais a partir de dois fatores: o animal é abruptamente

separado dos outros animais da sua caixa e a arena é muito grande em relação a sua caixa, tornando-se um ambiente agarofóbico (PRUT; BELZUNG, 2003). Leva-se em conta nesse contexto o comportamento de tigmotaxia, que é o comportamento de andar perto das paredes do aparato usando componentes sensoriais através das vibrissas, os roedores espontaneamente preferem ficar nos cantos do aparato do que andando no centro do aparato (PRUT; BELZUNG, 2003; BELOVICOVA *et al.*, 2017). Um aumento do tempo de exploração na área central do aparato é utilizado como um indicativo de redução de respostas de ansiedade no campo aberto (KOPP *et al.*, 1997). Apesar das fêmeas do grupo LDLr^{-/-} apresentarem uma diminuição do comportamento do tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado, no campo aberto os grupos LDLr^{-/-} não apresentaram alterações nesse comportamento. Esses resultados replicam a literatura que demonstra que não há diferenças quanto ao tempo no centro do aparato nos grupos de animais LDLr^{-/-} em comparação aos WT (ELDER *et al.*, 2008; LOPES, 2015).

Ao contrário dos nossos achados, que observamos apenas hiperlocomoção nas fêmeas LDLr^{-/-}, em virtude de terem percorrido maior distância no campo aberto. Elder *et al.* (2008) observaram este fenótipo de hiperlocomoção também em camundongos LDLr^{-/-} machos. Além do campo aberto, as fêmeas LDLr^{-/-} apresentam essa hiperlocomoção no teste de discriminação olfatória e no teste das três câmaras, pela maior distância percorrida nos testes quando comparado aos outros grupos. A hiperlocomoção também ficou evidente pelo maior número de entradas nos braços fechados no teste do labirinto em cruz elevado. Esses achados vão de encontro a resultados prévios do nosso grupo que foram observadas respostas de hiperlocomoção em camundongos LDLr^{-/-} fêmeas (SZCZEPANIK, 2015).

No presente estudo, foi utilizado o teste de enterrar esferas para avaliar o comportamento estereotipado do tipo-ansioso. Esse teste é comumente usado para triagem de agentes ansiolíticos, descrito primeiramente por Broekkamp *et al.* (1986) os quais relataram que o uso de bolinhas de gude não seriam objetos nocivos para os roedores, mas forneceriam estímulos não condicionados eficazes e suficientes para iniciar o comportamento de enterrar. Porém, foi só em 1991 que o teste começou a ser usado para a avaliação de comportamentos estereotipados (sendo relacionados a comportamentos compulsivos observados no TOC) (NJUNG'E; HANDLEY, 1991). Alguns autores dizem que as esferas desencadeiam o comportamento de enterrar inato dos roedores e que os animais não necessariamente gostam de enterrar as bolinhas de gude (DIXIT; SAHU; MISHRA, 2020; GYERTYÀN, 1995). O TOC em humanos é

caracterizado por dois componentes: obsessão (pensamentos repetidos relacionados por exemplo à contaminação, assuntos sexuais ou religiosos) e compulsão (comportamento repetido de avaliação de conflito, como lavar várias vezes a mão), as quais são manifestações comportamentais quantificáveis, que, portanto, envolve comportamento compulsivo de ações repetitivas (HOFFMAN, 2011), ação essa observada em roedores quando expostos às bolinhas de gude (DIXIT; SAHU; MISHRA, 2020).

Apesar de dados da literatura demonstrarem que pacientes com TOC apresentam níveis elevados de colesterol (PETER *et al.*, 2002; PETER; TABRIZIAN; HAND, 2000), estudos clínicos demonstraram que níveis reduzidos de colesterol HDL estariam relacionados ao aumento e gravidade do transtorno de ansiedade relacionado ao TOC (DOUGLAS; NASRALLAH, 2019). Como um achado inédito referente a esse comportamento em modelo pré-clínico da HF, observamos que o resultado comportamental do teste de enterrar esferas corrobora os resultados observados no teste do labirinto em cruz elevado, uma vez que as fêmeas LDLr^{-/-} enterraram menos esferas do que o grupo controle nos tempos 10, 15 e 20 min, sendo indicativo de uma redução de comportamentos do tipo-ansioso. Outro achado importante é que neste teste os machos LDLr^{-/-} também apresentaram a diminuição do comportamento do tipo-ansioso em todos os tempos analisados, quando comparado ao grupo WT. Pesquisas anteriores revelaram que o tratamento com anfetaminas (que aumentam a neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica) reduz o comportamento de camundongos de enterrar esferas, ao mesmo tempo que aumentam a locomoção dos animais no teste (BORSINI; PODHORNA; MARAZZITI, 2002; LI; MORROW; WITKIN, 2006). Este perfil comportamental é semelhante ao observado para camundongos LDLr^{-/-} fêmeas, nos levando a especulação de que estas alterações comportamentais possam ter relação com alterações nestes sistemas de neurotransmissão. Trabalhos futuros são necessários para investigar esta questão.

No presente estudo foi avaliado com pioneirismo o comportamento social em camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas. Os dois testes de sociabilidade utilizados neste trabalho avaliam a abordagem social sem a interação, o animal alvo é apresentado a um animal não familiar, de mesmo sexo e idade aproximada, por meio de barras de arrame, permitindo assim somente o contato olfativo, visual e auditivo. Não possibilitando o contato tátil e evitando interações agressivas e sexuais, garantindo ser uma medida de interesse em se aproximar e permanecer na presença de outro animal, assegurando um comportamento social proativo (SILVERMAN *et al.*, 2010).

Para o teste de sociabilidade no campo aberto, foi utilizada a padronização feita em 2013 por Caroline Hammels, para esse teste se utiliza o aparato do campo aberto após o animal já ter sido submetido em um primeiro momento a ele. Apesar disso, os grupos ainda são colocados por 150 segundos em habituação com uma gaiola de arame vazia para, após um período de 1 minuto, serem colocados novamente na arena, agora com um animal estranho dentro da gaiola por, novamente, 150 segundos (KRISHNAN *et al.*, 2007, BERTON *et al.*, 2006). Nossos achados demonstraram um aumento na sociabilidade dos animais do grupo LDLr^{-/-}, visto que ficaram mais tempo na zona social do que na zonas periféricas do aparato, além do maior número de entradas na zona social durante o teste. Esses achados parecem não ter relação com a locomoção do machos LDLr^{-/-}, devido ao fato dos animais desse grupo terem percorrido maior distância que o grupo WT na habituação, mas no teste não foi observado diferenças significativas. Porém, o mesmo não pode ser dito para as fêmeas LDLr^{-/-}, pelo fato destas terem percorrido maior distância do que todos os outros grupos, tanto na habituação, quanto no teste.

Outro teste que é bastante utilizado para medir o comportamento social proativo é o teste das três câmaras, originalmente proposto por Moy *et al.* (2004). Neste teste quantificamos a preferência do animal por passar o tempo na câmara com um animal da mesma espécie, em relação à câmara com um objeto inanimado ou à câmara vazia (O'TUATHEIGH *et al.*, 2007; DESBONNET *et al.*, 2012; NADLER *et al.*, 2004). Observamos que os camundongos machos, tanto LDLr^{-/-} quanto WT, permaneceram mais tempo na câmara com o animal, demonstrando um aumento na sociabilidade em comparação aos outros grupos. Neste teste também foi observado que as fêmeas WT permaneceram mais tempo na câmara sem o animal alvo, demonstrando uma menor sociabilidade proativa. Entretanto, as fêmeas LDLr^{-/-} não apresentaram diferenças significativas neste teste, mas houve uma tendência a diminuição da sociabilidade, indicado pela maior permanência destas na câmara sem o animal novo. Quando analisados conjuntamente, os resultados dos dois testes de sociabilidade demonstraram um aumento na sociabilidade dos animais LDLr^{-/-}, principalmente nos machos.

Os achados do presente estudo sustentam nossa hipótese de que os animais LDLr^{-/-} teriam comportamento social elevado, possivelmente devido ao aumento da atividade da MAO-A observada nos animais LDLr^{-/-} da mesma colônia da UFSC no estudo de Engel *et al.* (2016). A enzima MAO-A é responsável pela degradação de dopamina, norepinefrina e serotonina no terminal pré-sináptico nos neurônios e está relacionada ao comportamento social (DEL-BEN, 2005; TOMANINI, 2021). A baixa atividade da

MAO-A é relatada em casos de comportamento antissocial e violência em humanos (NILSSON *et al.*, 2015; FERGUSON *et al.*, 2011; FERGUSON *et al.*, 2012), em roedores (BORTOLATO *et al.*, 2013; SCOTT *et al.*, 2008) e em macacos, principalmente quando relacionado ao fator ambiental de cuidado parental (NEWMAN *et al.*, 2005).

Apesar de não haver estudos clínicos e pré-clínicos relacionando à HF com diferenças no comportamento social, Otsuka *et al.* (2019) demonstraram que camundongos C57BL/6 machos quando submetidos a uma dieta rica em gordura, que leva conseqüentemente ao aumento do metabolismo de colesterol no fígado, não apresentam comportamento de evitação social. Outros artigos evidenciaram que níveis mais baixos de colesterol estão presentes em pacientes humanos violentos e antissociais (GOLOMB, 1998; HILLBRAND *et al.*, 2000), além de ter relação com o aumento da violência criminal (GOLOMB; STATTIN; MEDNICK, 2000). Destacando que essa associação é encontrada principalmente em homens (TOMSON-JOHANSON; HARRO, 2018). Em paralelo a isso, nossos achados mostraram também que os camundongos LDLr^{-/-} machos teriam um comportamento social mais acentuado do que as fêmeas no teste das três câmaras, podendo ser uma evidência de que os machos são mais susceptíveis a variações desse comportamento.

Ao final do protocolo comportamental, o sangue dos animais foi coletado para as análises bioquímicas para quantificação de colesterol total e corticosterona. Como esperado, observamos que os animais LDLr^{-/-} apresentam um aumento de duas vezes nos níveis de colesterol total comparados a animais WT. Estes achados corroboram resultados prévios da literatura que demonstram níveis elevados de colesterol nos animais LDLr^{-/-} (MOREIRA, 2013; DE OLIVEIRA, 2011; DE PAULA, 2015; ENGEL, 2016).

Tanto o comportamento social, como os transtornos de ansiedade (e a ansiedade por si só) sofrem grande influência do eixo HHA, sendo que o aumento da atividade do eixo libera mais glicocorticoide e causa aumento em respostas relacionadas à ansiedade (MARTIN *et al.*, 2009) e redução em comportamentos sociais (RAULO; DANTZER, 2018). Pensando nesses resultados presentes na literatura, e tendo em vista a diminuição do comportamento do tipo-ansioso e o aumento do comportamento social nos animais LDLr^{-/-}, seria esperado uma diminuição dos níveis de glicocorticoides decorrente de uma possível baixa atividade do eixo HHA.

Entretanto, o colesterol é a molécula precursora de hormônios esteroides (incluindo glicocorticoides), como a corticosterona em roedores, e o eixo HHA é responsável pela liberação de glicocorticoides. O colesterol é inicialmente convertido em

pregnenolona, sendo essa etapa regulada pelo hormônio ACTH, a pregnenolona vai ser convertida em progesterona pela enzima 3- β -desidrogenase, a progesterona por sua vez é convertida desoxicorticosterona pela 21- β -hidroxilase, que é convertida em corticosterona através da 11- β -hidroxilase (NELSON; COX, 2014; RANG; DALE, 2011). Diante da importância do colesterol para a síntese de hormônios glicocorticoides e que os animais LDLr^{-/-} apresentam um aumento de 2 vezes no colesterol circulante, o teste de ELISA para medir os níveis de corticosterona nos animais foi realizado. Os resultados aqui obtidos demonstraram que não há diferenças estatísticas entre os níveis de corticosterona nos grupos de LDLr^{-/-} e WT. Nossos resultados vão em consonância a um estudo anterior que indicou que os animais LDLr^{-/-} não apresentam produção de corticosterona alterada, indicando que apesar do receptor de LDL ser responsável pela entrega de LDL e consequentemente colesterol à célula, ele não desempenha um papel importante na entrega de colesterol para a esteroidogênese adrenal nesses camundongos. (KRAEMER *et al.*, 2007).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou uma redução nos comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos LDLr^{-/-}, principalmente em fêmeas, refutando nossa hipótese original de que a hipercolesterolemia observada neste modelo de HF promoveria respostas ansiogênicas. Além disso, esse foi o primeiro trabalho a abordar o comportamento olfatório e social dos animais LDLr^{-/-}, sendo que comprovamos nossa hipótese de que os animais LDLr^{-/-} teriam comportamento social elevado, sem a presença de déficits olfatórios. Estudos adicionais são necessários para esclarecer se estas alterações em respostas de emocionalidade observadas em camundongos LDLr^{-/-} estão relacionadas à hipercolesterolemia, à deleção do LDLr, ou ambos, e quais mecanismos moleculares estariam envolvidos nestas alterações.

8. REFERÊNCIAS

- AGARGUN, M.Y. *et al.* Low cholesterol level in patients with panic disorder: the association with major depression. **J. Affect. Disord.**, 50, p. 29-32, 1998.
- AINIYET, J *et al.* Low concentration level of total serum cholesterol as a risk factor for suicidal and aggressive behavior. **Psychiatr Pol.** 30(3), p. 499-509, 1996.
- AKIOYAMEN, L. E. *et al.* Anxiety, depression, and health-related quality of life in heterozygous familial hypercholesterolemia: a systematic review and meta-analysis: A systematic review and meta-analysis. **Journal Of Psychosomatic Research**, 109, p. 32-43, 2018.
- ALREFAIE, Z. Grape seed proanthocyanidins attenuate anxiety-like behavior in an experimental model of dietary-induced hypercholesterolemia in rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 85, n. 5–6, p. 282–291, 1 dez. 2015.
- ARIZA, M. *et al.* Neuropsychological performance of young familial hypercholesterolemia patients. **European Journal of Internal Medicine**, 34, p. 29-31, 2016.
- APA – American Psychiatric Association. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais- DSM.** 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- APA – American Psychiatric Association. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais- DSM.** 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- BAJWA, W.K. *et al.* High cholesterol levels in patients with panic disorder. **Am. J. Psychiatry**, 149 (3), p. 376-378, 1992.
- BARAK, B.; FENG, G. Neurobiology of social behavior abnormalities in autism and Williams syndrome. **Nature Neuroscience**, 19 (5), p. 647-655, 2016.
- BELOVICOVA, K. *et al.* Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. **Interdisciplinary Toxicology**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 40-43, 1 set. 2017.
- BERGER, S. *et al.* Effect of Chronic Corticosterone Treatment on Depression-Like Behavior and Sociability in Female and Male C57BL/6N Mice. **Cells**, v. 8, n. 9, 1 set. 2019.
- BERTON, O. *et al.* Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. **Science**, 311(5762), p. 864-868, 2006.
- BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat. Rev. Neurosci**, 7, p.137–151, 2006.
- BJÖRKHEM, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? **Journal of Clinical Investigation**, 110 (6), p. 725-730, 2008.

BORRONI, M. V.; VALLÉS, A. S.; BARRANTES, F. J. The lipid habitats of neurotransmitter receptors in brain. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 1858(11), p. 2662-2670, 2016.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology**, 163, p. 121-141, 2002. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-002-1155-6>. Acesso em: 30 mar. 2021.

BORTOLATO, M. *et al.* Monoamine oxidase A and A/B knockout mice display autistic-like features. **International Journal Of Neuropsychopharmacology**, 16 (4), p. 869-888, 2013.

BORTOLUZZI, A. **Neurobiologia dos transtornos de ansiedade em adolescentes: análise de polimorfismos do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do metiloma do dna ao longo do tempo.** Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016, 93 p.

BROEKKAMP, C. L. *et al.* Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **European Journal of Pharmacology**, 26(3), p. 223-229. 1986.

BYRD, A. L.; MANUCK, S. B. MAOA, Childhood Maltreatment, and Antisocial Behavior: Meta-analysis of a Gene-Environment Interaction. **Biological Psychiatry**, 75(1), p. 9–17, 2014.

CASPI, A. *et al.* Role of Genotype in the Cycle of Violence in Maltreated Children. **Science**, 297 (5582), p. 851-854, 2002.

CASTRO, A. A. *et al.* Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1- methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res**, p. 229, 208-15, 2012.

CIVEIRA, F. *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v. 173, n. 1, p. 55–68, 2004.

COLLA, A. R. S. *et al.* Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, 758, p. 171-176, 2015.

COMMITTEE, S. S. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. **BMJ Clinical research ed**, 303(6807), p. 893-896, 1991.

CRUZ-SANCHEZ, F. *et al.* Cognitive impairment in heterozygous familial hypercholesterolemia. **Alzheimer's & Dementia**, 2008.

DE BEM, A. *et al.* P21 - Hypercholesterolemia as a risk factor for depressive disorder? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 75, s.28, 2014.

DELANOGARE, E. *et al.* Enriched environment ameliorates dexamethasone effects on emotional reactivity and metabolic parameters in mice. **Stress**, v. 23, n. 4, p. 466-473, 2020.

DEL-BEN, C. M. Neurobiologia do transtorno de personalidade anti-social. **Revista de Psiquiatria Clínica**, 32 (1), 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-60832005000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 9 abr. 2021.

DE PAULA, Gabriela Cristina. **O consumo moderado de vinho tinto melhora o déficit cognitivo induzido pela hipercolesterolemia em camundongos**. . Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015. 86 p.

DE OLIVEIRA, J. *et al.* Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. **Neurochemical Research**, 38(10), p. 2028-2036, 2013.

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

DESBONNET, O. *et al.*, Phenotypic effects of repeated psychosocial stress during adolescence in mice mutant for the schizophrenia risk gene neuregulin-1: a putative model of gene x environment interaction. **Brain Behav Immun**, 26, p. 660-671, 2012.

DIXIT, P. V.; SAHU, R.; MISHRA, D. K. Marble-burying behavior test as a murine model of compulsive-like behavior. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 1 mar. 2020.

DOUGLAS J, NASRALLAH HA. Low high-density lipoprotein and psychopathology: A review. **Ann Clin Psychiatry**. 31(3), p. 209-213, 2019.

ELDER, G. A. *et al.* Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **Behavioural Brain Research**, v. 191, n. 2, p. 256–265, 22 ago. 2008.

ENGEL, D. F. *et al.* Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr $-/-$ mouse experimental model. **Behavioural Brain Research**, 311, p. 31-38, 2016.

ENGEL, Daiane Fátima. **Evidências experimentais da associação entre a hipercolesterolemia e a depressão: envolvimento da neurogênese hipocampal adulta**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. 185 p.

FALUDI AA, *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose –[published correction appears in Arq Bras Cardiol. 2017 Nov;109(5):499]. **Arq Bras Cardiol**, 109(2 Supl 1), p. 1-76, 2017.

FARAVELLI C, Lo S. C.; LELLIL. *et al.* The role of life events and HPA axis in anxiety disorders: a review. **Curr Pharm Des**, 18(35), p. 5663-5674, 2012.

FERGUSON, D. M. *et al.* MAOA, abuse exposure and antisocial behaviour: 30-year longitudinal study.: 30-year longitudinal study. **British Journal Of Psychiatry**, 198 (6), p. 457-463, 2011.

FERGUSON, D. M. *et al.* Moderating role of the MAOA genotype in antisocial behaviour. **British Journal Of Psychiatry**, 200 (2), p. 116-123, 2012.

GAROLERA, M. *et al.* Episodic memory performance in young adults with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 252, 2016.

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. **Journal of Clinical Lipidology**, 5(3), p. 133-140, 2011.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 29(4), p. 431-438, 2009.

GOLOMB, B. A. Cholesterol and violence: Is there a connection? **Annals of Internal Medicine. American College of Physicians**, 15 mar. 1998.

GOLOMB, B. A.; STATTIN, H.; MEDNICK, S. Low cholesterol and violent crime. **Journal of Psychiatric Research**, v. 34, n. 4-5, p. 301-309, 2000.

GRAY J. A.; MCNAUGHTON, N., Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of affective disorders**, 61(3), p. 161-176, 2000.

GREGORIO, T. **Efeitos da suplementação gestacional com vitamina D no comportamento emocional e no sistema serotoninérgico de ratas submetidas à programação fetal induzida por dexametasona.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020, 79 p.

GYERTYÁN, I. Analysis of the marble burying response: Marbles serve to measure digging rather than evoke burying. **Behavioural Pharmacology**, 6(1), p. 24-31. 1995.

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

HART, P. C. *et al.* Experimental models of anxiety for drug discovery and brain research. *In: Mouse Models for Drugs Discovery*, p. 299-321, 2016.

HAYWARD, C. *et al.* Plasma lipid levels in patients with panic disorder or agoraphobia **Am. J. Psychiatry**, 146, p. 917-919, 1989.

HILLBRAND, M. *et al.* Serum cholesterol concentrations and mood states in violent

psychiatric patients: An experience sampling study. **Journal of Behavioral Medicine**, v. 23, n. 6, p. 519–529, 2000.

HOFFMAN, K. L. Animal models of obsessive compulsive disorder: recent findings and future directions. **Expert Opinion on Drug Discovery**. v. 6, n. 7, p. 725-737, jul. 2011.

HOLLMAN, G. *et al.* Quality of life in patients with familial hypercholesterolaemia. **Journal of Internal Medicine**, v. 251, n. 4, p. 331–337, 1 abr. 2002.

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

HUANG, Z. *et al.* Smell and taste dysfunction is associated with higher serum total cholesterol concentrations in Chinese adults. **Journal of Nutrition**, v. 147, n. 8, p. 1546–1551, 1 ago. 2017.

HYTTINEN, L. *et al.* Long-term statin therapy is associated with better episodic memory in aged familial hypercholesterolemia patients in comparison with population controls. **Journal of Alzheimer's Disease**, 21(2), p. 611-617, 2010.

ISHIBASHI, S *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J Clin Invest**, 92(2), p. 883-893, 1993.

JAKOVLJEVIĆ, M.; REINER, Z.; MILIČIĆ, D. Mental disorders, treatment response, mortality and serum cholesterol: a new holistic look at old data. **Psychiatr Danub**. 19(4), p. 270-281, 2007.

JANG, H. M. *et al.* Lactobacillus sakei Alleviates High-Fat-Diet-Induced Obesity and Anxiety in Mice by Inducing AMPK Activation and SIRT1 Expression and Inhibiting Gut Microbiota-Mediated NF-κB Activation. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 63, n. 6, 1 mar. 2019.

JEONG, Mi-Young *et al.* High-fat diet causes psychiatric disorders in mice by increasing Proteobacteria population. **Neuroscience Letters**, 698, p.51-57, 2019.

JONGH, S. *et al.* Quality of life, anxiety and concerns among statin-treated children with familial hypercholesterolaemia and their parents. **Acta Paediatrica**, v. 92, n. 9, p. 1096–1101, 2 jan. 2007.

KAHN, R. S., WETZLER, S. m-Chlorophenylpiperazine as a probe of serotonin function. **Biol. Psychiatry**, 30 (11), p. 1139-1166, 1991.

KAYIKCIOGLU, M. *et al.* Clinical management, psychosocial characteristics, and quality of life in patients with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis in Turkey: Results of a nationwide survey (A-HIT1 registry). **Journal of Clinical Lipidology**, v. 13, n. 3, p. 455–467, 1 maio 2019.

KEDIA, S.; CHATTARJI, S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, 233, p. 150-154, 2014.

KOPP, C. *et al.* Effects of day-length variations on emotional responses towards unfamiliarity in Swiss mice. **Behavioural Processes**, 41 (2), p. 151-157, 1997.

KRAEMER, F. B. *et al.* The LDL receptor is not necessary for acute adrenal steroidogenesis in mouse adrenocortical cells. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 292, n. 2, fev. 2007.

KRISHNAN V. *et al.* Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, 131(2), p. 391-404, 2007.

KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated plus maze for mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 22, p. 1088, 2008.

KUCZMIERCZYK, A.R. *et al.* Serum cholesterol levels in patients with generalized anxiety disorder (GAD) and with GAD and comorbid depression. **Can. J. Psychiatry**, 41, p. 465-468, 1996.

LI, X.; MORROW, D.; WITKIN, J. M. Decreases in nestlet shredding of mice by serotonin uptake inhibitors: Comparison with marble burying. **Life Sciences**, v. 78, n. 17, p. 1933–1939, 20 mar. 2006.

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

LOPES, Jadna Bogado. **Donepezil reverte déficits cognitivos em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar**. . TCC (Graduação) - Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015. 82 p.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193 (1), p. 265-75, 1951.

MABUCHI, H. *et al.* Serum lipids and coronary heart disease in heterozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku district of Japan. **Atherosclerosis**, 28(4), p. 417-423, 1977.

MACHADO, A. E. **A hipercolesterolemia, induzida por dieta ou genótipo, impacta negativamente na formação de memórias aversivas contextuais em camundongos**. . Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016, 79 p. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/188200/PGNC0281-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 mar. 2021.

MACLEOD, C.; RUTHERFORD, E. M. Anxiety and the selective processing of emotional information: mediating roles of awareness, trait and state variables, and personal relevance of stimulus materials. **Behav Res Ther**, 30, p. 479-91, 1992.

MARTEAU, T. *et al.* Psychological impact of genetic testing for familial hypercholesterolemia within a previously aware population: A randomized controlled trial. **American Journal of Medical Genetics**, v. 128A, n. 3, p. 285–293, 30 jul. 2004.

MARTIN, Elizabeth I. *et al.* The Neurobiology of Anxiety Disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology.: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. **Psychiatric Clinics Of North America**, 32 (3), p. 549-575, 2009.

MATSUMOTO, T. S. *et al.* A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. **Clin. Biochem**, 18, p. 126–129, 1985.

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. **Journal of Alzheimer's Disease**, 32(2), p. 494-511, 2012.

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? **J Neural Transm**, 121, p. 415-426, 2014.

MOREIRA, E.L. G. **A hipercolesterolemia como um fator de risco para o desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve: evidências obtidas em modelos experimentais.** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013, 160 p.

MOZAFFARIAN, D. *et al.* American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: **A Report From the American Heart Association**, 133(4), p. 38-360, 2016.

MOY, S. S. *et al.* Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 3, n. 5, p. 287–302, 1 out. 2004.

MYTILINAIIOU, M. *et al.* Familial hypercholesterolemia: New horizons for diagnosis and effective management. **Frontiers in Pharmacology**, 9, 707, 2018.

NADLER, J. J. *et al.* Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 3, n. 5, p. 303–314, 1 out. 2004.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.

NEWMAN, T. K. *et al.* Monoamine oxidase A gene promoter variation and rearing experience influences aggressive behavior in rhesus monkeys. **Biological Psychiatry**, 57 (2), p. 167-172, 2005.

NILSSON, K. W. *et al.* Genotypes do not confer risk for delinquency ut rather alter susceptibility to positive and negative environmental factors: gene-environment interactions of BDNF Val66Met, 5-HTTLPR, and MAOA-uVNTR. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, 18(5), 2015.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Effects of 5-HT uptake inhibitors, agonists and antagonists on the burying of harmless objects by mice; a putative test for anxiolytic agents. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 1, p. 105–112, 1 set. 1991.

OTSUKA, A. *et al.* Sufficient intake of high-fat food attenuates stress-induced social avoidance behavior. **Life Sciences**, 219, p. 219-230, 2019.

O'TUATHEIGH, B. *et al.*, Phenotypic characterization of spatial recognition and social behaviour in mice with knockout of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. **Neuroscience**, 147, p. 18-27, 2007.

OHVO-REKIKKA H, *et al.* Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Prog. Lipid Res.**, 41, p. 66-97, 2002.

PAPAKOSTAS, G.I. *et al.* Cholesterol in mood and anxiety disorders: review of the literature and new hypotheses: review of the literature and new hypotheses. **European Neuropsychopharmacology**, 14 (2), p. 135-142, 2004.

FALUDI AA, *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arq Bras Cardiol**; 109(2Supl.1): p. 1-76, 2017.

PEREIRA, AC *et al.* I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arq. Bras. Cardiol.**, 99 (2), supl. 2, p. 1-28, 2012.

PETER, H. *et al.* Serum cholesterol level comparison: control subjects, anxiety disorder patients, and obsessive-compulsive disorder patients. **Can. J. Psychiatry**, 47 (6), p. 557-561, 2002.

PETER, H.; TABRIZIAN, S.; HAND, I. Serum cholesterol in patents with obsessive compulsive disorder during treatment with behavior therapy and SSRI or placebo. **International Journal of Psychiatry in Medicine**, v. 30, n. 1, p. 27–39, 2000.

PFRIEGER, F. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.** 60, p. 1158–1171 (2003).

PFRIEGER, F. W; UNGERER N., Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes, **Progress in Lipid Research**, 50 (4), p. 357-371, 2011.

PREDIGER R.D.S. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotox. Res**, 17(2), p. 114-29, 2010.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol. Aging**, 26, p. 957-964, 2005.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, 463 (1-3), p. 3-33, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M. *et al.* **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 768 p.

RAULO, A.; DANTZER, B. Associations between glucocorticoids and sociality across a continuum of vertebrate social behavior. **Ecology and Evolution**. v. 8, Issue 15, p. 7697-7716, 2018.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. **Anais. Neurosci Biobehav**, Rev, 7 nov. 1997.

SAGUD, M. *et al.* Platelet serotonin and serum lipids in psychotic mania. **Journal Of Affective Disorders**, 97 (1-3), p. 247-251, 2007.

SAMOCHOWIEC, J. *et al.* Association of a regulatory polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase A gene with antisocial alcoholism. **Psychiatry Res**, 86, p. 67-72, 1999.

SCOTT A. L. *et al.* Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation. **Neuroreport**, 19(7), p. 739-743, 2008.

SEFTEL, H. C. *et al.* Prevalence of familial hypercholesterolemia in Johannesburg Jewes. **American Journal of Medical Genetics**, 34(4), p. 545-547, 1989.

SILVERMAN J. L. *et al.*, Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. **Nature Reviews Neurosiceince**. 11, p. 490-502, 2010.

SKUPIO, U. *et al.* Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: Relevance to depression. **Neuroscience**, v. 286, p. 141–150, 2015.

SMITH, C. C.; BETTERIDGE, D. J. Reduced platelet serotonin content and release in familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis**, 130 (1–2), p. 87-92, 1997.

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: Possible interaction with olfactory sensitivity. **Behavioural Processes**, v. 17, n.

3, p. 181–190, 1 set. 1988.

STREKALOVA, T. *et al.* Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. **Brain, Behavior, And Immunity**, 48, p. 42-47, 2015.

SUÁREZ, B. M. Psychological issues and cognitive impairment in adults with familial hypercholesterolemia. **Family Practice**, 34(5), p. 520-524, 2017.

SZCZEPANIK, J. C.. **Investigação dos efeitos da cafeína sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas apresentadas por camundongos nocautes para o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015, 87 p. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/134787/334305.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 01 abr. 2021.

TERAO, J. N. *et al.* Relationship between serum cholesterol levels and meta-chlorophenylpiperazine-induced cortisol responses in healthy men and women. **Psychiatry Res.**, 96, p. 167-173, 2000.

TOMANINI, R. Fatores genéticos que influenciam na psicopatia e sociopatia. *In*: **Brasil Escola Monografias**. Site [2021]. Disponível em: <https://monografias.brasilecola.uol.com.br/biologia/fatores-geneticos-que-influenciam-na-psicopatia-sociopatia.htm>. Acesso em: 01 ago. 2021.

TOMSON-JOHANSON, K.; HARRO, J. Low cholesterol, impulsivity and violence revisited. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 25, n. 2, p. 103–107, 1 abr. 2018.

USIFO, E. *et al.* Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Familial Hypercholesterolemia Variant Database: Update and Pathological Assessment. **Annals of Human Genetics**, 76(5), p. 387-401, 2012.

WANG, Pan *et al.* Aberrant Hippocampal Functional Connectivity Is Associated with Fornix White Matter Integrity in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. **Journal Of Alzheimer's Disease**, p. 1-16, 2020.

YAMADA, K.; TSUTSUMI, T.; FUJII, I., Serum cholesterol levels in patients with panic disorders: a comparison with major depression and schizophrenia **Psychiatry Res.**, 102 (2), p. 153-162, 2001.

ZADELAAR, S. *et al.* Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. Arteriosclerosis, **Thrombosis, and Vascular Biology**, 27(8), p. 1706-1721, 2007.

ZAMBÓN, D. *et al.* Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **American Journal of Medicine**, 123(3), p. 267-274, 2010.