

Jade de Oliveira

**MECANISMOS MOLECULARES QUE RELACIONAM A
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR À DOENÇA DE
ALZHEIMER**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Andreza Fabro de Bem.

Coorientador: Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira.

Florianópolis
2015

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

de Oliveira, Jade
MECANISMOS MOLECULARES QUE RELACIONAM A
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR À DOENÇA DE ALZHEIMER / Jade
de Oliveira ; orientadora, Andreza Fabro de Bem ;
coorientador, Eduardo Luiz G. Moreira. - Florianópolis, SC,
2015.
150 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Hipercolesterolemia Familiar. 3.
Receptor de LDL. 4. Doença de Alzheimer. 5. Peptídeo beta-
amiloide. I. Fabro de Bem, Andreza. II. Luiz G. Moreira,
Eduardo. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

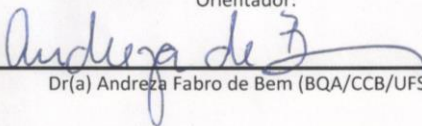
**“Mecanismos moleculares que relacionam a hipercolesterolemia familiar à
doença de Alzheimer”**

Por

Jade de Oliveira

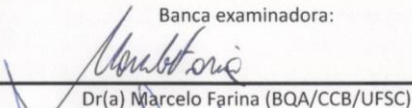
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca
Examinadora (011/BQA/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica –
UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:



Dr(a) Andreza Fabro de Bem (BQA/CCB/UFSC)

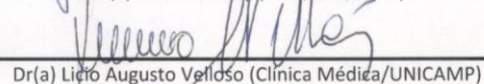
Banca examinadora:



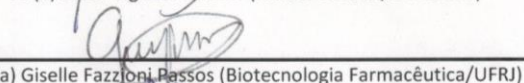
Dr(a) Marcelo Farina (BQA/CCB/UFSC)



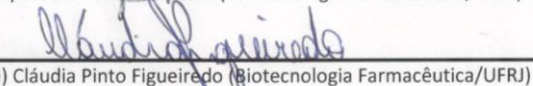
Dr(a) Jamil Assreuy (FMC/CCB/UFSC)



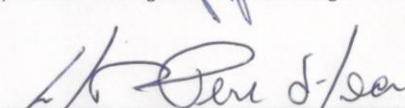
Dr(a) Lidio Augusto Velloso (Clínica Médica/UNICAMP)



Dr(a) Giselle Fazzioni Passos (Biotecnologia Farmacêutica/UFRJ)



Dr(a) Cláudia Pinto Figueiredo (Biotecnologia Farmacêutica/UFRJ)



Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 11 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Professora Dr^a. Andreza Fabro de Bem, minha orientadora, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Agradeço-a pela paciência, confiança e dedicação em mim depositada desde a iniciação científica. Agradeço também pelo exemplo de determinação e profissionalismo.

Ao meu co-orientador Dr. Eduardo Luiz G. Moreira, pela amizade e dedicação, aprendizado, incentivo em muitos momentos e auxílio durante toda a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Alfredo Cáceres e aos alunos e técnicos de seu laboratório, que me acolheram durante meu estágio de doutorado sanduíche.

Aos Professores Dr. Rui Daniel S. Prediger e Dr. Marcelo Farina, pelas discussões científicas e importante colaboração na realização deste trabalho.

As Professoras Dr^a. Cláudia Pinto Figueiredo e Dr^a. Patrícia de Souza Brocardo, pela amizade, discussões científicas e colaborações experimentais.

A Dr^a. Danúbia Bonfanti dos Santos de Godoi, pela amizade, colaboração e auxílio em muitos e muitos experimentos durante todo esse período.

Aos meus colegas de laboratório: Cristine, Gabriela, Gianni, Jadna, Luana, Luiza, Marcos e Ruth. Em especial a Daiane, pelas discussões científicas e auxílios nos experimentos, mas sobretudo por toda sua amizade e dedicação.

Ao Professor Dr. João Batista Teixeira da Rocha da UFSM por ter aberto as portas de seu laboratório e disponibilizado o uso do microscópio confocal.

Aos Professores membros da banca de qualificação do doutorado: Dr^a. Cláudia Pinto Figueiredo, Dr. Rui Daniel S. Prediger, Dr^a. Carla Tasca e Dr^a. Patrícia de Souza Brocardo, pelas críticas, sugestões e

reflexões adicionais, que contribuíram dando maior consistência e qualidade à pró-forma da tese.

Aos Professores membros da banca examinadora do doutorado, Dr^a. Cláudia Pinto Figueiredo, Dr^a. Giselle Fazzioni Passos, Dr. Jamil Assrey, Dr. Licio Augusto Velloso, Dr. Marcelo Farina, Dr^a. Manuella Pinto Kaster, e Dr^a. Patrícia de Souza Brocardo, pela atenção dispensada na leitura da tese e sugestões para o aprimoramento da versão final.

Aos técnicos do LAMEB I e II, Bibiana, Denis, Vanessa, Chirle, Emily e Demetrio pela disponibilidade e auxílio na utilização de equipamentos.

Aos Professores do curso de Pós-graduação em Bioquímica, pelos conhecimentos e exemplos passados durante o mestrado.

A minha mãe Jucélia e meu padrinho Henor, por terem sido o meu exemplo a seguir, pelo carinho e dedicação incondicional em cada momento difícil. E também por compartilharem dos bons momentos, por acreditarem nos meus sonhos e o incentivo a nunca desistir dessa jornada.

Ao Thiago, meu noivo, por toda sua compreensão, paciência e amor incondicional.

A meu irmão Artur, minha cunhada Lucimara e sobrinha Izadora, por todo amor e carinho. A toda a minha família, por compartilharem todos os momentos comigo.

A todos os colaboradores e amigos, que direta ou indiretamente participaram nesta fase da minha vida, meu muito obrigado.

À CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro.

Que os vossos esforços desafiem impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.

(Charles Chaplin)

RESUMO

A hipercolesterolemia familiar é uma doença do metabolismo das lipoproteínas causada por anormalidades genéticas que direta ou indiretamente prejudicam a função do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Esta condição é caracterizada pelo catabolismo defeituoso da LDL, o qual resulta em aumento das concentrações plasmáticas de colesterol desde o nascimento e aterosclerose prematura. Recentemente, estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram uma associação entre a hipercolesterolemia familiar e o desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve, considerado um estágio de transição entre o envelhecimento saudável e os primeiros sintomas da doença de Alzheimer – principal causa de prejuízos cognitivos em pessoas com mais de 65 anos. De fato, há mais de duas décadas o envolvimento da hipercolesterolemia no acúmulo e deposição de peptídeo β -amiloide ($A\beta$) cerebral vem sendo intensamente estudado. Por outro lado, inúmeros estudos recentes têm indicado o receptor de LDL como uma via fisiológica importante que medeia a regulação celular dos níveis de $A\beta$ cerebral. Nesse sentido, hipotetizamos que os efeitos neurotóxicos induzidos pelo $A\beta$ podem ser potencializados em indivíduos com hipercolesterolemia familiar, uma vez que a depuração cerebral deste peptídeo estaria prejudicada. Inicialmente, para validar experimentalmente esta hipótese, camundongos nocautes para o receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$) – modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana – foram expostos à administração intracerebroventricular (i.c.v.) do $A\beta_{1-40}$. Os resultados desta tese demonstraram que camundongos $LDLr^{-/-}$ são mais susceptíveis à neurotoxicidade induzida pela administração i.c.v. do $A\beta_{1-40}$. Especificadamente, em comparação com os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, os camundongos $LDLr^{-/-}$ apresentam maior ativação glial, dano de membrana celular, disfunção da barreira hemato-encefálica (BHE), e desbalanço oxidativo e da atividade da acetilcolinesterase no hipocampo após a administração do $A\beta_{1-40}$. Alterações na expressão gênica hipocampal e cortical de proteínas envolvidas no processamento e metabolismo do $A\beta$ (BACE-1, PS-1 e LRP-1) e na indução do processo apoptótico (Bax e Bcl2), parecem estar envolvidas no comprometimento neuronal dos camundongos $LDLr^{-/-}$. Com o objetivo de avaliar mais precisamente a integridade da BHE dos camundongos $LDLr^{-/-}$, estes foram submetidos a uma dieta rica em colesterol durante trinta dias. A dieta hipercolesterolêmica levou a um aumento ainda mais pronunciado na permeabilidade da BHE nos camundongos $LDLr^{-/-}$. Além disso, a exposição à LDL isolada prejudicou

o desenvolvimento e polarização de neurônios hipocampais. Por fim, tendo em mente a participação do receptor de LDL no metabolismo e degradação do A β , nós avaliamos se o fibrato Genfibrozila seria capaz de modular os níveis de receptores de LDL ao nível cerebral. O Genfibrozila foi capaz de aumentar os níveis de RNAm no tecido hepático, mas não no hipocampo, de camundongos *Swiss*, e este efeito não foi relacionado com mudanças nos níveis de colesterol plasmático. Em conjunto, os resultados do presente estudo reforçam a particular associação da hipercolesterolemia familiar e o desenvolvimento de prejuízos cognitivos característicos da doença de Alzheimer. Além disso, os achados deste estudo nos encorajam a buscar por moléculas que sejam capazes de modular a expressão de receptores de LDL no SNC.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia familiar. Receptor de LDL. Doença de Alzheimer. Peptídeo β -amiloide. Barreira hemato-encefálica.

ABSTRACT

Familial hypercholesterolemia is a lipoprotein metabolism's disorder caused by genetic abnormalities that directly or indirectly affect the function of the low density lipoprotein (LDL) receptor. This condition is characterized by defective catabolism of the LDL which results, from the time of birth, in increased plasma cholesterol concentrations and premature atherosclerosis development. Recently, clinical and preclinical studies have demonstrated an association between familial hypercholesterolemia and mild cognitive impairment, considered to be a transitional stage between normal aging and early-stage Alzheimer's disease – the main cause of cognitive decline in people over 65 years. In fact, over the past decades the involvement of hypercholesterolemia in the accumulation and deposition of cerebral β -amyloid peptide ($A\beta$) has been intensively studied. On the other hand, compelling recent studies have identified the LDL receptor as a pathway for mediating the cellular regulation of brain $A\beta$ levels. In this regard, we hypothesized that the $A\beta$ -induced neurotoxic effects could be increased in individuals with familial hypercholesterolemia, since the brain $A\beta$ clearance might be impaired in this context. Firstly, to test this hypothesis LDL receptor knockout mice ($LDLR^{-/-}$), which is the most used mouse model of familial hypercholesterolemia, were injected intracerebroventricularly with $A\beta_{1-40}$. The results presented herein show that $LDLR^{-/-}$ mice were more susceptible to $A\beta_{1-40}$ -induced neurotoxicity. Specifically, $LDLR^{-/-}$ mice treated with $A\beta_{1-40}$ presented increased glial activation, cellular membrane damage, blood brain barrier (BBB) disruption, increased acetylcholinesterase activity, and oxidative imbalance within the hippocampus in comparison with $A\beta_{1-40}$ -treated C57BL/6 wild-type mice. Alterations in hippocampal and cortical gene expression of proteins involved in $A\beta$ processing and metabolism (BACE-1, PS-1 and LRP-1) and apoptosis (Bax and Bcl-2) appears to be related with neuronal damage in the $LDLR^{-/-}$ mice. In order to assess the BBB integrity more accurately in the $LDLR^{-/-}$ mice, these mice were treated for 30 days with a hypercholesterolemic diet. A more pronounced BBB permeability was observed in the $LDLR^{-/-}$ mice fed with hypercholesterolemic diet. In addition, LDL cholesterol significantly affected neuronal polarity *in vitro*. Finally, taking in account that the LDL receptor modulates $A\beta$ metabolism and degradation, we evaluated whether the Gemfibrozil (fibrate) could modulate brain LDL receptor levels. Gemfibrozil treatment increased gene expression of LDL receptor in the hepatic tissue, but not in the hippocampus, of *Swiss* mice. This effect was not related

with changes in the plasma cholesterol levels. Overall, this data reinforce the particular relation between familial hypercholesterolemia and the characteristic cognitive impairments of Alzheimer's disease. Additionally, our findings encourage us to look for compounds that are capable of modulating LDL receptor expression in the brain.

Keywords: Familial hypercholesterolemia. LDL receptor. Alzheimer's disease. β -amyloid peptide. Blood brain barrier.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais etapas envolvidas na biossíntese do colesterol.	28
Figura 2	Família dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL).	30
Figura 3	Diagrama da via endocítica mediada pelo receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL).	32
Figura 4	Metabolismo do colesterol no SNC.	35
Figura 5	Principais causas moleculares de hipercolesterolemia hereditária.	37
Figura 6	Processamento da proteína precursora amiloide (APP) pelas secretases.	43
Figura 7	O aumento de colesterol nas membranas celulares pode afetar a produção do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) cerebral.	46
Figura 8	Influência da hipercolesterolemia na integridade da barreira hemato-encefálica (BHE).	50
Figura 9	Desenho experimental 1: Camundongos $LDLr^{-/-}$ são mais susceptíveis a neurotoxicidade induzida pela injeção i.c.v. do $A\beta_{1-40}$?	60
Figura 10	Desenho experimental 2: Os prejuízos cognitivos nos camundongos $LDLr^{-/-}$ jovens e de “meia-idade” estão associados com alterações no metabolismo do $A\beta$ e em proteínas anti- e pró-apoptóticas?	61
Figura 11	Desenho experimental 3: Os prejuízos cognitivos e alterações na BHE em camundongos $LDLr^{-/-}$ são potencializados por uma dieta hipercolesterolêmica?	62

Figura 12	Desenho experimental 4: Quais as consequências da exposição de células neuronais à LDL humana isolada?	63
Figura 13	Desenho experimental 5: Em busca de uma terapia capaz de aumentar a expressão do receptor de LDL ao nível cerebral.	64
Figura 14	Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ sobre a cognição de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} nos testes realocação do objeto, alternância espontânea e labirinto em cruz elevado.	76
Figura 15	Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ na atividade da AChE de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} no córtex pré-frontal e hipocampo.	78
Figura 16	Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ sobre o sistema antioxidante vinculado à GSH de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} no córtex pré-frontal e hipocampo.	80
Figura 17	Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ na atividade da SOD e nos níveis de espécies reativas de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} no córtex pré-frontal e hipocampo.	82
Figura 18	Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ na imunorreatividade para GFAP em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} no hipocampo.	84
Figura 19	Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do	86

A β ₁₋₄₀ na imunorreatividade para AQP-4 em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no hipocampo.

- Figura 20** Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀ na permeabilidade celular analisada por meio do ensaio de captação de iodeto de propídeo (IP) em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no hipocampo. 87
- Figura 21** Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀ na formação de placas amiloides analisadas por meio da coloração por Tioflavina-S em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no hipocampo. 88
- Figura 22** Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e do envelhecimento na expressão gênica do LRP-1 em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no córtex pré-frontal e no hipocampo. 90
- Figura 23** Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e do envelhecimento na expressão gênica de proteínas envolvidas no processamento do A β : APP, BACE-1 e PS-1 em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no córtex pré-frontal e no hipocampo. 92
- Figura 24** Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e do envelhecimento na razão Bcl-2/Bax (expressão gênica) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. 93
- Figura 25** Efeitos da dieta hipercolesterolêmica sobre a cognição e a atividade locomotora espontânea de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. 95

Figura 26	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica sobre a aprendizagem aversiva, no reteste do labirinto em cruz elevado, de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} .	96
Figura 27	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica nos níveis plasmáticos de colesterol total e colesterol não-HDL em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} e de colesterol total nos camundongos C57BL/6 selvagens.	97
Figura 28	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica na permeabilidade da BHE à fluoresceína de sódio no córtex pré-frontal, hipocampo e bulbo olfatório em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} .	98
Figura 29	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica na expressão gênica da claudina-5 e ocludina no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} .	100
Figura 30	Efeitos da exposição à LDL 50 µg/mL durante 24 horas no desenvolvimento de neurônios primários hipocampais.	101
Figura 31	Efeitos da exposição à LDL 50 µg/mL durante 24 horas no comprimento axonal em neurônios primários hipocampais em desenvolvimento.	101
Figura 32	Efeito do tratamento com o Genfibrozila (1,3; 13 e 130 mg/kg) na expressão gênica do receptor de LDL no hipocampo e no fígado, e nos níveis plasmáticos de colesterol total em camundongos <i>Swiss</i> .	103
Figura 33	A ausência de função do receptor de LDL aumenta a susceptibilidade a neurotoxicidade induzida pelo peptídeo β-amiloide (Aβ), dieta hipercolesterolêmica (HC) e envelhecimento em camundongos.	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das dietas experimentais.	62
Tabela 2	Hipercolesterolemia em camundongos LDLr ^{-/-} .	77
Tabela 3	Sumário dos efeitos da administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀ em parâmetros bioquímicos e comportamentais em camundongos C57BL/6 e LDLr ^{-/-} .	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

24-OH – 24-hidroxicolesterol
27-OH – 27-hidroxicolesterol
A β – Peptídeo β - amiloide
ACAT – acil-CoA:colesterol aciltransferase
Acetil-Coa – acetilcoenzima A
AChE – acetilcolinesterase
ANOVA – Análise de variância
apoB – apolipoproteína B
apoE – apolipoproteína E
APP – Proteína precursora amiloide
AQP-4 – Aquaporina 4
BACE-1 – β -secretase
CCL – Comprometimento cognitivo leve
DAC – Doença arterial coronariana
BHE – Barreira hemato-encefálica
GPx – Glutaciona peroxidase
GR – Glutaciona redutase
GSH - Glutaciona
GSSG – Glutaciona oxidada
GFAP – Proteína ácida fibrilar glial
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
i.c.v. – intracerebroventricular
IDL – Lipoproteína de densidade intermediária
i.p. – intraperitoneal
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDLr – Receptor da lipoproteína de baixa densidade
LRP-1 – Proteína 1 relacionada ao receptor de LDL
NADPH – Nucleotídeos piridinas no estado reduzido
Nrf2 – fator de transcrição relacionado ao fator E2
PCSK9 – pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9
PS-1 – Preselinina 1
RAGE – Receptor de produtos de glicação avançada
QM – Quilomícrons
SNC – Sistema nervoso central
SOD – Superóxido dismutase
VLDL – Lipoproteínas de muita baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1. RECEPTOR DE LDL E O METABOLISMO DO COLESTEROL PERIFÉRICO	29
1.2. METABOLISMO DO COLESTEROL NO CÉREBRO	32
1.3. HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR	36
1.4. DOENÇA DE ALZHEIMER	41
1.5. HIPERCOLESTEROLEMIA COMO FATOR DE RISCO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER	45
1.6. RECEPTOR DE LDL E O PEPTÍDEO β -AMILOIDE	47
1.7. INFLUÊNCIA DA HIPERCOLESTEROLEMIA NA INTEGRIDADE DA BHE	48
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	53
3. OBJETIVOS	55
3.1. OBJETIVO GERAL	55
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4. MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1. REAGENTES	57
4.2. ANIMAIS	57
4.3. ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DO PEPTÍDEO β -AMILOIDE	58
4.4. CULTIVO PRIMÁRIO DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS	58
4.5. DESENHOS EXPERIMENTAIS	59
4.5.1. Experimento 1: Camundongos LDLr^{-/-} são mais susceptíveis a neurotoxicidade induzida pela injeção i.c.v. do Aβ₁₋₄₀?	59
4.5.2. Experimento 2: Os prejuízos cognitivos nos camundongos LDLr^{-/-} jovens e de "meia-idade" estão associados com alterações no metabolismo do Aβ e em proteínas anti- e pró- apoptóticas?	60
4.5.3 Experimento 3: Os prejuízos cognitivos e alterações na BHE em camundongos LDLr^{-/-} são potencializados por uma dieta hipercolesterolêmica?	61
4.5.4. Experimento 4: Quais as consequências da exposição de células neuronais à LDL humana isolada?	62

4.5.5. Experimento 5: Em busca de uma terapia capaz de aumentar a expressão do receptor de LDL ao nível cerebral.	63
4.6. TESTES COMPORTAMENTAIS	64
4.6.1. Teste do campo aberto	64
4.6.2. Teste da realocação do objeto	64
4.6.3. Teste do reconhecimento do objeto	65
4.6.7. Teste de alternância espontânea	66
4.6.8. Labirinto em cruz elevado	66
4.7. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE LIPÍDEOS PLASMÁTICOS	67
4.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	67
4.8.1. Preparação tecidual para as análises bioquímicas	67
4.8.2. Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	67
4.8.3. Sistema antioxidante vinculado à glutationa (GSH)	68
4.8.4. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	69
4.8.5. Determinação dos níveis de espécies reativas	69
4.8.6. Determinação dos níveis de proteínas	69
4.9. DETERMINAÇÃO DO IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL (GFAP) E AQUAPORINA 4 (AQP-4)	70
4.10. COLORAÇÃO PELA TIOFLAVINA-S	70
4.11. ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDEO EM FATIAS HIPOCAMPAIS	71
4.12. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA (RNAm)	71
4.13. DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA BHE	72
4.14. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	72
4.14.1. Preparo da LDL humana	72
4.14.2. Determinação da polaridade neuronal	73
4.15. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	73
5. RESULTADOS	75
5.1. EXPERIMENTO 1: Camundongos LDLr ^{-/-} são mais susceptíveis a neurotoxicidade induzida pela injeção i.c.v. do Aβ ₁₋₄₀ ?	75

5.2.	EXPERIMENTO 2: Os prejuízos cognitivos nos camundongos LDLr ^{-/-} jovens e de "meia-idade" estão associados com alterações no metabolismo do A β e em proteínas anti- e pró- apoptóticas?	89
5.3.	EXPERIMENTO 3: Os prejuízos cognitivos e alterações na BHE em camundongos LDLr ^{-/-} são potencializados por uma dieta hipercolesterolêmica?	93
5.4.	EXPERIMENTO 4: Quais as consequências da exposição de células neuronais à LDL isolada humana?	100
5.5.	EXPERIMENTO 5: Em busca de uma terapia capaz de aumentar a expressão do receptor de LDL ao nível cerebral.	102
6.	DISCUSSÃO	105
7.	CONCLUSÕES	119
8.	PERSPECTIVAS	121
	REFERÊNCIAS	123

Lista de publicações relacionadas à Tese:

de Oliveira J, Moreira EL, Dos Santos DB, Piermartiri TC, Dutra RC, Pinton S, Tasca CI, Farina M, Prediger RD, de Bem AF. Increased susceptibility to amyloid- β -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **Journal of Alzheimer's disease**, 41(1):43-60, 2014.

de Oliveira J, de Bem AF, Moreira EL. Low-density lipoprotein (LDL) receptor: a promising therapeutic target to promote cerebral beta-amyloid clearance? **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 20(9), 877-878, 2014.

Outras publicações durante o período de Doutorado:

de Oliveira J, Moreira EL, Mancini G, Hort MA, Latini A, Ribeiro-do-Valle RM, Farina M, da Rocha JB, de Bem AF. Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. **Neurochem Res** 38(10):2028-2036, 2013.

Dos Santos AA, Naime AA, **de Oliveira J**, Colle D, Dos Santos DB, Hort MA, Moreira EL, Suñol C, de Bem AF, Farina M. Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events. **Archives of Toxicology**, *in press*.

Santos DB, Colle D, Moreira EL, Peres KC, Ribeiro RP, dos Santos AA, **de Oliveira J**, Hort MA, de Bem AF, Farina M. Probucol mitigates streptozotocin-induced cognitive and biochemical changes in mice. **Neuroscience**, 284:590-600, 2015.

Moreira EL, **de Oliveira J**, Prediger RD, Farina M, de Bem AF. Cholesterol Levels and Cognitive Impairments. In: Colin R Martin and Victor R Preedy. (Org.). **Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline**. 1ed.: Elsevier, 2015, p. 743-751.

Moreira EL, **de Oliveira J**, Engel DF, Walz R, de Bem AF, Farina M, Prediger RD. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an

early and causal event? **Journal of Neural Transmission**, 121(4):415-426, 2014.

Hort MA, Stralioetto MR, **de Oliveira J**, Amoêdo ND, da Rocha JB, Galina A, Ribeiro-do-Valle RM, de Bem AF. Diphenyl diselenide protects endothelial cells against oxidized low density lipoprotein-induced injury: Involvement of mitochondrial function. **Biochimie**, 105:172-181, 2014.

Mancini G, **de Oliveira J**, Hort MA, Moreira EL, Ribeiro-do-Valle RM, Rocha JB, de Bem AF. Diphenyl diselenide differently modulates cardiovascular redox responses in young adult and middle-aged low-density lipoprotein receptor knockout hypercholesterolemic mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 66(3):387-397, 2014.

Moreira EL, Aguiar AS Jr, de Carvalho CR, Santos DB, **de Oliveira J**, de Bem AF, Xikota JC, Walz R, Farina M, Prediger RD. Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia. **Neuroscience Letters**, 541:193-198, 2013.

Moreira EL, **de Oliveira J**, Nunes JC, Santos DB, Nunes FC, Vieira DS, Ribeiro-do-Valle RM, Pamplona FA, de Bem AF, Farina M, Walz R, Prediger RD. 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):495-511, 2012.

Moreira EL, **de Oliveira J**, Dutra MF, Santos DB, Gonçalves CA, Goldfeder EM, de Bem AF, Prediger RD, Aschner M, Farina M. Does methylmercury-induced hypercholesterolemia play a causal role in its neurotoxicity and cardiovascular disease? **Toxicological Sciences**, 130(2):373-382, 2012.

Stralioetto MR, **de Oliveira J**, Mancini G, Bainy AC, Latini A, Deobald AM, Rocha JB, de Bem AF. Disubstituted diaryl diselenides as potential atheroprotective compounds: Involvement of TrxR and GPx-like systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 48(4-5):717-725, 2013.

1. INTRODUÇÃO

Desde 1784, quando foi isolado pela primeira vez a partir de cálculos biliares pelo pesquisador francês François Poulletier, o colesterol tem fascinado cientistas das mais diversas áreas. Há mais de 100 anos, esta molécula tem sido extensivamente estudada e sem dúvida é o lipídeo que recebe maior publicidade (Brown e Goldstein, 1986; Vance e Bosch, 2000). O colesterol, um álcool não saturado da família dos compostos esteroides, é essencial para o funcionamento normal de todas as células animais. Além de componente estrutural indispensável das membranas celulares, o colesterol é também precursor biossintético de hormônios esteroides (i.e., hormônios adrenais e gonadais), ácidos biliares e vitamina D, bem como desempenha papel crítico em processos de sinalização e proliferação celular (Yeagle, 1991; Simons e Ikonen, 2000; Goedeke e Fernández-Hernando, 2012). Por outro lado, apesar de sua inegável importância, o colesterol tem sido considerado um “inimigo” da saúde, uma vez que níveis anormais de colesterol causam consequências celulares sérias e podem levar a doenças, e.g., doenças cardiovasculares associadas à aterosclerose (Maxfield e Tabas, 2005; Ikonen, 2006).

Devido às inúmeras funções fundamentais, é necessário que as células tenham um suprimento apropriado e contínuo de colesterol. Para manter este suprimento, existem sistemas complexos de transporte, biossíntese e regulação. De fato, a homeostase do colesterol é um processo intensamente regulado, sendo o fígado o órgão com papel central. Em humanos, sob condições fisiológicas, aproximadamente 80% do colesterol total corporal é sintetizado endogenamente (síntese *de novo* - cerca de 800 mg/dia) enquanto o restante é proveniente da dieta (Harvey e Ferrier, 2012). Quase todos os tecidos estão envolvidos na síntese de colesterol, embora fígado, intestino, córtex adrenal e tecidos reprodutivos sejam os maiores responsáveis pela síntese endógena. Este composto tetracíclico contendo vinte e sete átomos de carbono é sintetizado a partir de um único precursor, a acetilcoenzima A (acetil-CoA), em uma via que envolve pelo menos trinta reações enzimáticas diferentes e cerca de quinze enzimas presentes no citosol e retículo endoplasmático (Figura 1) (Bloch, 1965, 1987).

A síntese do colesterol inicia-se com a formação de um composto intermediário de seis carbonos, o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), a partir da condensação de três moléculas de acetil-CoA. Esta reação é catalisada pela enzima citosólica HMG-CoA sintase. Em seguida, o HMG-CoA é reduzido a mevalonato, à custa de duas

moléculas de NADPH pela ação da enzima HMG-CoA redutase - uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático - na reação considerada a etapa limitante da síntese do colesterol e o principal ponto de regulação desta via. O mevalonato sofre duas fosforilações e uma descarboxilação originando a unidade isoprenóide, o isopentenil-pirofosfato. Um total de seis moléculas de isopentenil-pirofosfato é necessário para formar o esqualeno, o último intermediário linear desta via. A síntese do esqualeno resulta de reações de isomerização, condensação, redução por NADPH e eliminação de pirofosfato. Na etapa final a ciclização do esqualeno forma os quatro anéis do núcleo esteroide, e um número de subseqüentes reações levam à produção do colesterol (Nelson e Cox, 2011; Sharpe e Brown, 2013).

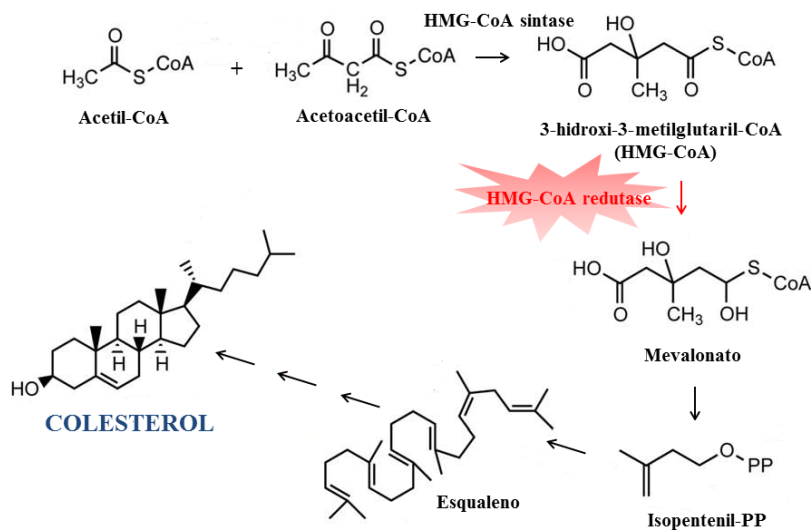


Figura 1. Principais etapas envolvidas na biossíntese do colesterol (adaptado de Song et al., 2013).

A insolubilidade do colesterol e de outros lipídeos requer que sejam transportados na circulação sanguínea como macromoléculas esféricas chamadas de lipoproteínas. As lipoproteínas plasmáticas são compostas por um núcleo hidrofóbico contendo colesterol esterificado e triglicerídeos, e um revestimento hidrofílico que contém colesterol livre, fosfolipídios e moléculas de proteínas (apolipoproteínas) (Hegele, 2009).

O colesterol e outros lipídeos da dieta são absorvidos no lúmen intestinal e transportados nos quilomícrons (QM), as maiores e menos

densas lipoproteínas, contendo alta proporção de triglicerídeos. Ao longo dos capilares, a maior parte do seu conteúdo de triglicerídeos é liberada nos tecidos e os QM remanescentes (contendo principalmente colesterol e apolipoproteínas) são captados pelo fígado. No fígado, o colesterol pode ser esterificado, convertido em ácidos biliares, secretado na bile ou empacotado em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) para ser transportado para os tecidos extra-hepáticos. A remoção de lipídeos da VLDL principalmente nos tecidos muscular e adiposo (acompanhada pela perda de parte das apolipoproteínas) converte, gradualmente, parte da VLDL em lipoproteína de baixa densidade, a LDL, que transporta colesterol para os tecidos periféricos ou de volta para o fígado. A captação celular de LDL é regulada pelo receptor de LDL e pela apolipoproteína B100 (apoB100) (Vance e Vance, 2008; Nelson e Cox, 2011).

O último dos principais tipos de lipoproteínas, a lipoproteína de alta densidade (HDL), origina-se no fígado e no intestino delgado como pequenas partículas ricas em proteína que contém relativamente pouco colesterol, e que tem como principal função o transporte reverso de colesterol. A HDL capta o colesterol armazenado em tecidos extra-hepáticos e transporta para que seja reutilizado ou excretado pelo fígado (Lewis e Rader, 2005).

1.1. RECEPTOR DE LDL E O METABOLISMO DO COLESTEROL PERIFÉRICO

O gene do receptor de LDL humano localizado no braço curto do cromossomo 19 (Russell et al., 1983) codifica uma glicoproteína transmembrana de 160 kDa que consiste de 839 aminoácidos, a qual tem sua sequência dividida em cinco domínios estruturais com distintas finalidades (Yamamoto et al., 1984), como ilustrado na Figura 2A: (i) domínio amino-terminal composto de 322 aminoácidos caracterizado pela presença de repetições altamente características de resíduos de cisteína com função de interação com os ligantes, os quais incluem as lipoproteínas contendo apoB100 e apolipoproteína E (apoE); (ii) região constituída por aproximadamente 350 aminoácidos homóloga ao fator de crescimento epidérmico (EGF) envolvida na dissociação dependente de pH do complexo ligante-receptor; (iii) região rica em resíduos de treonina e serina, formada por 58 aminoácidos contendo moléculas de carboidratos por meio de ligações O-glicosídicas; (iv) domínio transmembrana contendo 22 aminoácidos hidrofóbicos, com função de ancorar o receptor na membrana; (v) cauda citoplasmática carbóxi-

terminal que consiste de uma sequência de 50 aminoácidos responsável pela ligação do receptor a proteína clatrina, permitindo que o receptor seja incorporado em vesículas revestidas com clatrina durante o processo de endocitose mediada por receptor (Russell et al., 1984; Goldstein e Brown, 1984; Hobbs et al., 1990).

O receptor de LDL é o protótipo de uma família de receptores de superfície celular (Figura 2), da qual também fazem parte a proteína 1 relacionada ao receptor de LDL (LRP-1), o receptor da VLDL, o receptor 2 de apoE e a megalina dentre outros (Li et al., 2001). Os membros desta família de receptores são funcional e estruturalmente relacionados ao receptor de LDL. No entanto, diferenças na posição e no número de cada um dos domínios descritos acima resultam na diversidade funcional e estrutural desta família de receptores (Go e Mani, 2012). Estes receptores ligam inúmeros ligantes diferentes desempenhando funções cruciais em várias vias fisiológicas. De maneira geral, captam ligantes do meio extracelular para a degradação celular, usualmente provendo nutrientes essenciais para as funções celulares. Além disso, controlam fenótipos celulares ao modular os níveis extracelulares de proteases, de inibidores de proteases e de fatores de crescimento (Hussain et al., 1999).

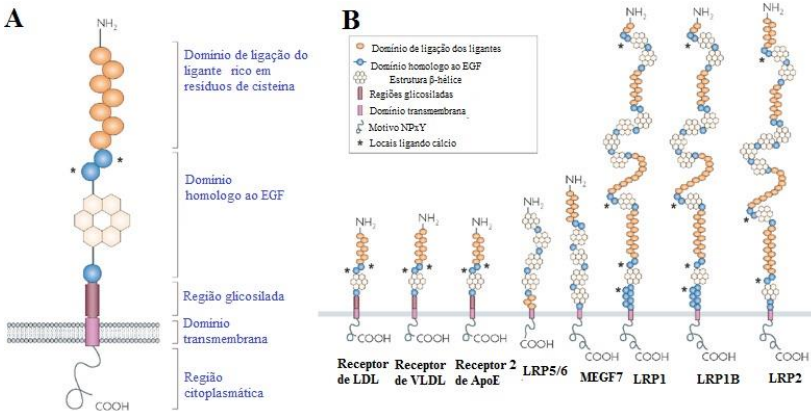


Figura 2. Família dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Esta família de receptores é composta de proteínas transmembrana que compartilham domínios estruturais que são característicos do receptor de LDL (A) receptor de LDL (protótipo da família) e (B) membros da família de receptores de LDL (adaptado de Wasan et al., 2008).

A homeostase do colesterol plasmático é principalmente regulada pelo receptor de LDL, uma vez que este receptor medeia a remoção e o

catabolismo de partículas de lipoproteínas contendo colesterol da circulação sanguínea (Figura 3) (Brown e Goldstein, 1986; Hobbs et al., 1992). Partículas de lipoproteínas circulantes ligam-se ao receptor de LDL presente na superfície das células. O ligante fisiológico mais importante do receptor é a LDL, a qual contém uma única cópia de apoB100 e carrega aproximadamente 65 a 70% do colesterol plasmático em humanos. Outras lipoproteínas contendo apoE, tais como a VLDL, a lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e a HDL também podem ligar-se ao receptor de LDL (Innerarity e Mahley, 1978; Weisgraber et al., 1978; Jeon e Blacklow, 2005).

Inicialmente, no metabolismo celular da LDL, a apoB100 presente na superfície da lipoproteína plasmática liga-se ao receptor, o qual está localizado na superfície celular. Em seguida, o complexo receptor-LDL é internalizado via endocitose formando as vesículas endocíticas, os endossomos, onde o pH ácido permite que a LDL se dissocie do receptor de LDL. Este último, subsequentemente, é reciclado e pode retornar à superfície da célula iniciando outro ciclo de endocitose. A LDL, por sua vez, é entregue ao lisossomo quando as membranas do endossomo e do lisossomo se fundem. Os componentes proteicos da LDL são hidrolisados a aminoácidos, e os ésteres de colesterol a colesterol livre pela lipase ácida lisossomal. O colesterol não esterificado resultante atravessa a membrana lisossomal, e no compartimento citoplasmático, exerce suas funções celulares, e.g., a síntese de membranas plasmáticas, ácidos biliares, e hormônios esteroides. O acúmulo de colesterol não esterificado dentro da célula participa de mecanismos regulatórios que modulam o conteúdo de colesterol celular: (i) inibe a atividade da enzima HMG-CoA redutase, resultando na inibição da síntese de colesterol; (ii) ativa a enzima acil-CoA colesterolil aciltransferase (ACAT), facilitando sua esterificação e armazenamento; e (iii) inibe a síntese de receptores de LDL, evitando a entrada de outras partículas de lipoproteínas e protegendo as células do acúmulo de colesterol (Jeon e Blacklow, 2005; Nelson e Cox, 2011). As etapas da captação do colesterol pela via do receptor de LDL estão representadas na Figura 3.

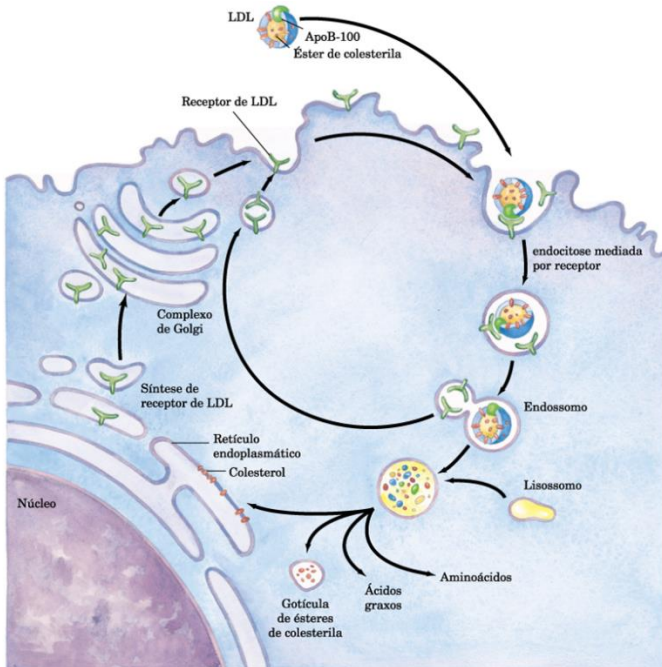


Figura 3. Diagrama da via endocítica mediada pelo receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (adaptado de Nelson e Cox, 2011).

Quando a função do receptor de LDL é diminuída, e.g., pacientes com hipercolesterolemia familiar, ocorre insuficiente remoção e endocitose da LDL plasmática levando ainda ao estímulo da síntese de colesterol hepático, o que finalmente resulta em elevadas concentrações de LDL circulantes (Brown e Goldstein, 1984).

1.2. METABOLISMO DO COLESTEROL NO CÉREBRO

Embora estudos pioneiros tenham estabelecido as bases bioquímicas envolvidas no metabolismo do colesterol periférico, uma melhor compreensão acerca da homeostase do colesterol no sistema nervoso central (SNC) ocorreu apenas a partir de estudos realizados na última década (Pfrieger, 2003a, 2003b, 2003c; Mulder, 2009; Pfrieger e Ungerer, 2011). De modo interessante, aproximadamente 25% do colesterol corporal total em seres humanos é encontrado no cérebro (Dietschy et al. 1993; Bjorkhem e Meaney, 2004), sendo que este é

sintetizado localmente pois as lipoproteínas plasmáticas não atravessam a barreira hemato-encefálica (BHE)¹ (Dietschy, 2009).

O colesterol desempenha papel crucial para o desenvolvimento neuronal e manutenção da plasticidade e função neuronal, sendo requerido para a formação de axônios, dendritos e conexões sinápticas (Pfrieger, 2003a, 2003b; Mulder, 2009). Ademais, é componente estrutural das membranas neuronais e gliais, e o principal elemento das bainhas de mielina, sendo essencial para uma eficiente transmissão de impulsos eletroquímicos. A maioria do colesterol cerebral está na forma livre não esterificada presente nas bainhas de mielina (mais de 70%) (Dietschy e Turley, 2001). Como a mielina tem uma taxa de renovação lenta, este colesterol associado à mielina é praticamente imobilizado. Ao passo que, o restante do colesterol está presente nos neurônios, células da glia e lipoproteínas extracelulares, os quais mantêm a homeostase do colesterol no SNC (Figura 4) (Puglielli et al., 2003).

Como a maior parte do colesterol no cérebro adulto faz parte da mielina, a síntese de colesterol no SNC é mais intensa durante a fase de mielinização. Após a mielinização, a síntese continua em níveis muito baixos, e ocorre principalmente nos astrócitos. Por outro lado, nos neurônios, a síntese de colesterol ocorre principalmente durante o desenvolvimento, diminuindo após o nascimento (Dietschy e Turley, 2004; Nieweg et al., 2009). De acordo com a hipótese proposta por Pfrieger e Ungerer (2011), no cérebro adulto, os astrócitos não apenas sintetizam, mas também internalizam e reciclam o colesterol liberado de terminais nervosos em degeneração para entregá-lo novamente aos neurônios. Essa “terceirização” permite que os neurônios gastem sua energia em outros processos, como a geração de potenciais de ação e elétrico, uma vez que a biossíntese de colesterol é um processo demorado que consome muita energia envolvendo inúmeras reações e intermediários diferentes (Pfrieger e Ungerer, 2011).

Os astrócitos produzem colesterol e a apoE que, junto com os fosfolípidios, formam lipoproteínas que são similares às HDL plasmáticas (Boyles et al., 1985). Essas lipoproteínas são secretadas das células astrocíticas por membros da família dos transportadores ABC (tais como ABCA1, ABCG1 e ABCG4). Por sua vez, a captação dessas

¹ BHE: É a interface entre o sistema vascular e o SNC, sendo responsável por manter a homeostase cerebral. A BHE é um sistema complexo formado por células endoteliais que revestem os microvasos cerebrais, separadas dos pericitos e processos astrocíticos pela lâmina basal. Neurônios e micróglia também fazem parte desta unidade neurovascular (Weiss et al., 2009).

lipoproteínas pelos neurônios se dá por meio de endocitose mediada por receptores membros da família de receptores da LDL, incluindo o receptor de LDL. Assumindo que o passo seguinte é conservado como em outras células, as lipoproteínas contendo colesterol endocitadas são hidrolisadas nos lisossomos neuronais permitindo a liberação intracelular de colesterol livre (Ledesma e Dotti, 2006).

O cérebro elimina o excesso de colesterol por meio da formação e excreção para a circulação de oxisteróis, o que desempenha um papel importante na regulação da homeostase do colesterol no SNC. Nas células neuronais, o colesterol é convertido principalmente pela ação da CYP46A1 em 24-hidroxicolesterol (24-OH), que ao contrário do colesterol, é capaz de transpassar a BHE. Após sua secreção do cérebro, o 24-OH no fígado é metabolizado. Além de ser um metabólito para eliminação do colesterol, o 24-OH também pode ser captado pelos astrócitos, onde atua como uma molécula sinalizadora que regula a homeostase do colesterol por meio da ativação dos receptores LXR. Estes receptores nucleares aumentam a expressão de elementos relacionados com a liberação de colesterol da célula, incluindo os transportadores ABC e a apoE. O 27-hidroxicolesterol (27-OH) é outro oxisterol produzido no cérebro em quantidades menores que o 24-OH. No entanto, a maioria do 27-OH flui da circulação para o cérebro (Figura 4) (Mulder, 2009).

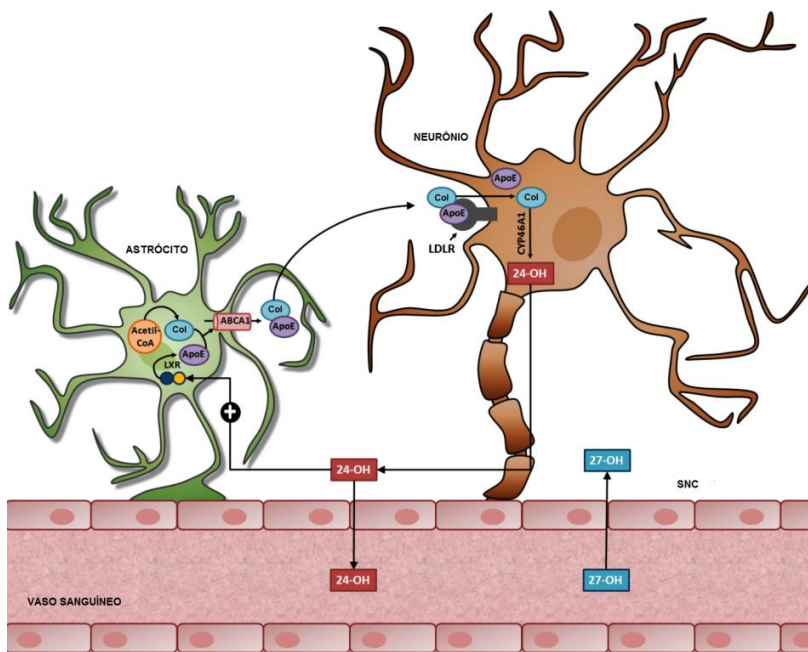


Figura 4. Metabolismo do colesterol no SNC. Transporte do colesterol (col) dos astrócitos para os neurônios no cérebro adulto. Os complexos colesterol-apolipoproteína E (apoE) são captados pelos neurônios via endocitose mediada por meio de receptores específicos pertencentes à família de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL). O cérebro elimina o excesso de colesterol por meio da formação e excreção na circulação de oxisteróis, como o 24-hidroxicolesterol (24-OH), o qual, ao contrário do colesterol, é capaz de transpassar a BHE (adaptado de Moreira et al., 2014).

A importância do colesterol como um componente da maquinaria sináptica foi demonstrada experimentalmente por Mulder e colaboradores em 2004, utilizando os camundongos nocautes para o receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$)². Os autores demonstraram que camundongos

² O camundongo $LDLr^{-/-}$, desenvolvido em 1991 por Ishibashi e colaboradores, é reconhecido como um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana (Zadelaar et al., 2007). Este camundongo apresenta hipercolesterolemia, caracterizada por níveis moderados de colesterol presente na LDL, mesmo quando submetidos a uma dieta padrão, podendo desenvolver lesões ateroscleróticas em longo prazo. Ademais, quando estes são alimentados com dieta rica em colesterol tornam-se severamente hipercolesterolêmicos, com o desenvolvimento de intensa aterosclerose aórtica e xantomas subcutâneos (Ishibashi et al., 1993).

LDLr^{-/-} adultos apresentam diminuição na proliferação celular e densidade sináptica no hipocampo, resultando em prejuízos de aprendizado e memória observados em diferentes testes comportamentais (Mulder et al., 2004, 2007). Como o colesterol é requerido para a homeostase celular, a captação neuronal de colesterol diminuída, devido à ausência do receptor de LDL, resulta em consequências deletérias nas funções neuronais (Mulder et al., 2004, 2007). Nesse sentido, um estudo recente do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a exposição de camundongos LDLr^{-/-}, do nascimento à adolescência, à uma abordagem indutora de neurogênese e plasticidade sináptica (enriquecimento ambiental), não foi capaz de prevenir os déficits de memória espacial nestes animais ao atingirem a idade adulta (Moreira et al., 2013). Assim, nós também especulamos que a função mediada pelo receptor de LDL na distribuição e na captação do colesterol celular seja primordial para a homeostase neuronal.

1.3. HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

No ano de 1985, após mais de uma década de trabalho e uma série de artigos publicados, os pesquisadores americanos Michael Brown e Joseph Goldstein foram agraciados com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por identificarem e caracterizarem o receptor para a LDL, atribuindo à deficiência no gene deste receptor à causa da hipercolesterolemia familiar humana. Estas descobertas foram determinantes para a elucidação das bases moleculares e bioquímicas da hipercolesterolemia familiar, bem como revolucionaram o entendimento acerca do metabolismo do colesterol e das lipoproteínas plasmáticas. A partir destes estudos, cada etapa do metabolismo celular do colesterol foi meticulosamente definida (Goldstein e Brown, 1973, 1974, 2009; Brown e Goldstein, 1974, 1986).

Atualmente, estima-se que em todo o mundo existam cerca de 20 milhões de indivíduos com hipercolesterolemia familiar, sendo esta reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema de saúde mundial (Santos et al., 2012; Watts et al., 2014). No Brasil, a estimativa é que existam cerca de 300.000 indivíduos com hipercolesterolemia familiar (Santos et al., 2012). Devido à alta incidência, a Sociedade Brasileira de Cardiologia preocupou-se em reunir os melhores especialistas em hipercolesterolemia familiar do país e publicou, em 2012, a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar, um documento informativo que define critérios sobre o diagnóstico e o tratamento desta doença (Santos et al., 2012).

A hipercolesterolemia familiar é uma doença autossômica codominante do metabolismo das lipoproteínas, caracterizada por níveis aumentados de colesterol da LDL plasmática e, conseqüente, aumento do risco de desenvolvimento de doença cardiovascular prematura (Muller, 1938; Brown e Goldstein, 1986). Mutações no gene que codifica o receptor da LDL são as principais causas da hipercolesterolemia familiar, representando cerca de 90% dos casos (Brown e Goldstein, 1974; Brown e Goldstein, 1986). Até o momento, mais de 1.600 mutações e polimorfismos distintos já foram identificados no gene do receptor de LDL em pacientes com hipercolesterolemia familiar (Nair, 2013; Nordestgaard et al., 2013). No entanto, como representado na Figura 5, outras raras mutações que podem ocorrer no gene que codifica a apoB100 (Soria et al., 1989), no gene pró-proteína convertase subtilisina / Kexina tipo 9 (PCSK9), o qual codifica a protease responsável pela degradação dos receptores de LDL (Abifadel et al., 2003), ou ainda, no gene que codifica a proteína adaptadora de receptores de LDL (LDLRAP1) são responsáveis por outras formas de hipercolesterolemia hereditária com fenótipos clínicos muito similares a hipercolesterolemia familiar (Myant, 1993; Civeira et al., 2004).

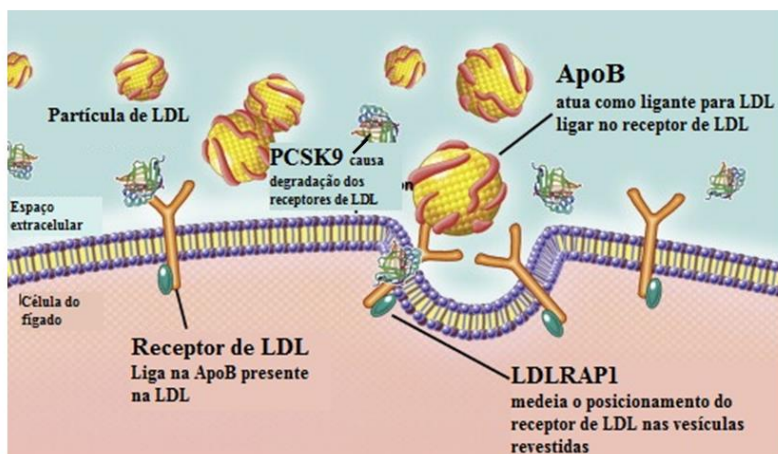


Figura 5. Principais causas moleculares de hipercolesterolemia hereditária. Além de mutações no gene dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL), a hipercolesterolemia hereditária também pode ser resultado de mutações no gene da apolipoproteína B (apoB), no gene pró-proteína convertase subtilisina / Kexina tipo 9 (PCSK9), o qual codifica a protease responsável pela degradação dos receptores de LDL, bem como, no gene da proteína adaptadora de receptores de LDL (LDLRAP1) (adaptado de Sniderman et al., 2014).

A hipercolesterolemia familiar manifesta-se de duas formas genéticas (Khachadurian, 1964). Na forma mais rara da hipercolesterolemia familiar (homozigótica; prevalência de 1 em 1 milhão de pessoas), ambos os alelos do gene do receptor de LDL estão mutados e a função do receptor de LDL é reduzida severamente ou completamente ausente, resultando em elevações de seis a dez vezes nos níveis de LDL plasmáticos desde o nascimento (níveis de colesterol total acima de 500 mg/dL)³, potencialmente levando ao infarto agudo do miocárdio já no início da infância, antes dos 15 anos de idade (Khachadurian, 1964; Brown e Goldstein, 1986; Ridker, 2014).

Em contraste, os indivíduos heterozigotos possuem cerca de 50% de deficiência dos receptores de LDL, o que produz um aumento de duas a três vezes na concentração de LDL no plasma (níveis de colesterol total entre 300 a 400 mg/dL). Esses indivíduos são susceptíveis a sofrer infarto do miocárdio a partir dos 30 anos de idade (Khachadurian, 1964; Rader et al., 2003; Liyanage et al., 2011; Ridker, 2014). A hipercolesterolemia familiar heterozigótica é consideravelmente mais comum, usualmente é assumido que a prevalência seja de 1 em 500 pessoas, todavia, a prevalência na população em geral é aparentemente maior do que se pensava (Benn et al., 2012; dos Santos e Maranhao, 2014). Benn e colaboradores (2012) avaliando aproximadamente 70.000 indivíduos provenientes do *Copenhagen General Population Study* mostraram uma prevalência de 1 em 137 nesses indivíduos.

Clinicamente a hipercolesterolemia familiar é caracterizada pela presença de xantomas de tendões, xantelasmas e aumentada deposição de colesterol nos vasos arteriais, levando ao desenvolvimento acelerado de aterosclerose associada com alta incidência de eventos cardiovasculares, particularmente a doença arterial coronariana (DAC) (Khachadurian, 1964; Goldstein e Brown, 1977; Soufi et al., 2002). A hipercolesterolemia familiar é responsável por cerca de 5% - 10% dos casos de DAC em indivíduos abaixo dos 55 anos (Burnett et al., 2005). Quando não tratada, a hipercolesterolemia familiar confere um risco cem vezes maior para o desenvolvimento de DAC em homens jovens. Mulheres com hipercolesterolemia familiar também apresentam um risco substancial de desenvolvimento de DAC, contudo o risco é menor do que

³ De acordo com a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (Xavier et al., 2013) e com o Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue dos Estados Unidos, níveis de colesterol plasmático igual ou maior que 240 mg/dL já são considerados muito alto. Os valores desejáveis são menores que 200 mg/dL.

em homens, e, em média, as mulheres desenvolvem a doença 10 anos mais tarde (Jansen et al., 2002; Watts et al., 2007). Sem tratamento, 50% dos homens heterozigotos desenvolverão DAC antes dos 50 anos e 100%, aos 70 anos; entre as mulheres heterozigóticas, 12% terão alguma manifestação de DAC aos 50 anos e 74%, aos 70 anos (Marks et al., 2000). Por fim, inúmeros estudos vêm demonstrando que a principal causa de morte entre os pacientes com hipercolesterolemia familiar é a doença cardiovascular, e que cerca de 200.000 pessoas no mundo morrem a cada ano de infartos do miocárdio precoces devido à hipercolesterolemia familiar (Civeira, 2004).

Nesse sentido, o principal objetivo no tratamento dos pacientes com hipercolesterolemia familiar vem sendo reduzir a mortalidade cardiovascular prematura, bem como a incidência de infartos do miocárdio (Reiner et al., 2011). De particular importância, segundo a OMS, o uso de terapia hipolipemiante pode aumentar a expectativa de vida desses indivíduos em até 30 anos (Watts et al., 2014). De fato, a expectativa de vida na hipercolesterolemia familiar aumentou dramaticamente com o advento da terapia com estatinas (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group, 1999). Neil e colaboradores (2008) acompanharam prospectivamente 3.382 pacientes com hipercolesterolemia familiar heterozigótica entre 1980 e 2006, antes e após a terapia com estatinas. A mortalidade por DAC foi significativamente menor entre os usuários de estatinas, com uma redução de 48% entre pacientes sem doença cardiovascular prévia e uma redução de 25% naqueles com a doença estabelecida. Resultados similares foram observados em um grande estudo de coorte seguido por quase 10 anos na Holanda (Versmissen et al., 2008). Outro estudo de coorte com indivíduos sul-africanos com hipercolesterolemia familiar homozigótica demonstrou um retardo na ocorrência de morte e maior sobrevida com a terapia hipolipemiante (Koeijvoets et al., 2005).

As estatinas, fármacos inibidores da enzima HMG-CoA redutase, foram desenvolvidas na década de 70, a partir dos estudos do microbiologista japonês Akira Endo⁴ (Endo, 2008, 2010), e são o tratamento de escolha na hipercolesterolemia familiar.

⁴ A primeira estatina comercializada foi a lovastatina em 1987. Desde então seis estatinas estão no mercado: duas semi-sintéticas (sinvastatina e pravastatina) e quatro sintéticas (fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina) (Endo, 2010). Atualmente, estima-se que 30 milhões de pessoas em todo mundo utilizam as estatinas. O faturamento de toda a classe de estatinas foi de \$35,3 bilhões em todo o mundo em 2009 e de \$19,7 bilhões em 2012.

Especificadamente, as estatinas de alta potência (atorvastatina e rosuvastatina) e geralmente na máxima dose tolerada. Caso o paciente não responda à monoterapia com estatinas, outros fármacos hipolipemiantes podem ser usados concomitantemente tais como a ezetimiba, resinas sequestradoras de ácidos biliares, fibratos ou derivados do ácido nicotínico (Reiner et al., 2011; Ito et al., 2011, Santos et al., 2012; Watts et al., 2014). As estatinas ao inibirem a HMG-CoA redutase consequentemente inibem a biossíntese do colesterol, diminuindo o conteúdo intra-hepático de colesterol livre e reciprocamente regulando os níveis de receptores de LDL hepáticos, o que por sua vez melhora o catabolismo das partículas de lipoproteína contendo apoB (Ooi et al., 2013).

Na hipercolesterolemia familiar heterozigótica, a qual se manifesta com somente 50% dos receptores de LDL em funcionamento, há em geral uma boa resposta as estatinas que aumentam a expressão desses receptores ao determinarem o bloqueio da síntese intracelular de colesterol (Sniderman et al., 2014). Por outro lado, em pacientes homozigotos, existe uma deficiência severa ou total na função do receptor de LDL, resultando em uma resposta à terapia com estatinas marcadamente menor. As estatinas podem reduzir os níveis de colesterol presente na LDL em pacientes homozigotos por potencialmente diminuir a secreção hepática de apoB, no entanto esses pacientes usualmente requerem a aferese (Watts et al., 2014). A aferese de lipoproteínas é realizada quando a terapia medicamentosa é ineficiente ou não tolerada pelos pacientes, sendo normalmente uma opção para a hipercolesterolemia familiar homozigótica, ou para aqueles pacientes com hipercolesterolemia familiar heterozigótica severa (McGowan, 2013).

O desenvolvimento recente de anticorpos monoclonais contra a PCSK9, protease responsável pela degradação dos receptores de LDL, é uma revolução no tratamento da hipercolesterolemia familiar e de outros tipos de hipercolesterolemia. Estas moléculas, administradas por via subcutânea a cada 15 ou 30 dias, ligam-se a PCSK9 no plasma reduzindo sua concentração, e assim, aumentando o ciclo intra-hepático do receptor de LDL. Os estudos clínicos já estão em Fase II e III e mostram reduções nos níveis de colesterol LDL de até 70% em pacientes com hipercolesterolemia familiar heterozigótica (Stein et al., 2012; Raal et al., 2012). Além disso, outros pequenos estudos também reportaram que alguns destes compostos podem ser eficazes em pacientes homozigotos que apresentarem atividade do receptor de LDL residual (i.e., pelo menos 2%) (Stein et al., 2013).

O avanço no tratamento da hipercolesterolemia familiar vem resultando em um aumento na expectativa de vida, e conseqüentemente aspectos que anteriormente eram impossíveis de serem visualizados devido à alta mortalidade por eventos cardiovasculares começaram a se destacar. De particular interesse, Daniel Zambon e colaboradores (2010), em um estudo com a participação de 47 indivíduos que apresentavam hipercolesterolemia familiar e 70 indivíduos que não apresentavam hipercolesterolemia familiar (participantes com mais de 50 anos), demonstraram que a proporção de indivíduos com hipercolesterolemia familiar que satisfazem os critérios diagnósticos de comprometimento cognitivo leve (CCL) foi significativamente maior que a encontrada em indivíduos controle sem hipercolesterolemia familiar. Os dados obtidos neste estudo excederam a prevalência na população em geral nesta idade específica, prevista a partir de outros estudos epidemiológicos ou ainda a prevalência observada em estudos epidemiológicos com indivíduos que apresentavam hipercolesterolemia esporádica. Nessa linha de evidência, um estudo do nosso grupo de pesquisa (Moreira et al., 2012) e um estudo de Ramirez e colaboradores (2011) corroboraram esta observação em modelos experimentais de hipercolesterolemia familiar, ao demonstrar que camundongos $LDL^{-/-}$ e $LDL^{-/-}/apoB100$ de “meia-idade” apresentam características indicativas de CCL.

O termo CCL refere-se a indivíduos que têm algum grau de perda cognitiva quando comparados a pessoas normais da mesma faixa etária, mas que não preenchem critérios para demência, podendo representar, em alguns casos, um estágio de transição entre as alterações cognitivas que fazem parte do envelhecimento normal e os primeiros sintomas da doença de Alzheimer (Petersen et al., 1999; Mariani et al., 2007).

1.4. DOENÇA DE ALZHEIMER

Aproximadamente 36 milhões de pessoas em todo o mundo manifestam a doença de Alzheimer, e em decorrência do aumento na expectativa de vida, é esperado que a prevalência global aumente para 115 milhões de pessoas em 2050 (Querfurth e LaFerla, 2010; Wisniewski e Goñi, 2014). A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa crônica relacionada com a idade, responsável pela maioria dos casos de demência em idosos (Rocchi et al., 2003; Blennow et al., 2006; Castellani et al., 2010). A doença de Alzheimer é caracterizada por um substancial e irreversível declínio no número de neurônios colinérgicos que se projetam, principalmente, do prosencéfalo basal para áreas corticais e

formação hipocampal (Gallagher e Colombo, 1995; Mufson et al., 2003; Schliebs e Arendt, 2011).

Clinicamente, esta neuropatologia está relacionada a um severo prejuízo cognitivo, perda de memória e mudanças na personalidade (como, e.g., uma mistura de comportamento agressivo com alucinações) (McKhann et al., 1984; Waldemar et al., 2007; Van Beek e Claassen, 2011). Por outro lado, as características neuropatológicas da doença de Alzheimer são emaranhados neurofibrilares intracelulares, primariamente formados pela proteína tau hiperfosforilada, e placas amiloides extracelulares em regiões cerebrais como o córtex, hipocampo e amígdala (Merz et al., 1983; Braak e Braak, 1988; Mattson et al., 2004; Querfurth e LaFerla, 2010). As placas amiloides são depósitos de agregados fibrilares e amorfos de pequenos peptídeos denominados β -amiloide ($A\beta$) no parênquima cerebral e nas paredes de vasos sanguíneos (Mann, 1989; Palop e Mucke, 2010).

O $A\beta$, um peptídeo de 36 a 43 aminoácidos, é produto do metabolismo amiloidogênico da proteína precursora de amiloide (APP) por grupos de enzimas denominadas secretases (Haass e De Strooper, 1999; Haass e Selkoe, 2007; Herring et al., 2011), como demonstrado na Figura 6. A clivagem da APP pode ocorrer pelas vias não amiloidogênica⁵, via mais comum, ou pela via amiloidogênica. A produção do $A\beta$ requer a ação inicial da β -secretase (BACE-1) sobre a APP formando um fragmento C-terminal, que é substrato imediato para a γ -secretase⁶. A γ -secretase pode atuar principalmente nas posições 40 e 42 gerando os $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$, respectivamente (LaFerla et al., 2007). As placas amiloides consistem principalmente do $A\beta_{1-42}$, enquanto as propriedades de solubilidade do $A\beta_{1-40}$ permitem a sua deposição nos vasos cerebrais (Weller et al., 1998).

⁵ Na via não amiloidogênica, ocorre a clivagem da APP dentro da sequência do $A\beta$ pela α -secretase seguida da γ -secretase, o que resulta na produção de um fragmento denominado p3 e impede a produção do $A\beta$ (Haass e Selkoe, 2007).

⁶ A γ -secretase é um complexo enzimático de alto peso molecular composto minimamente por quatro proteínas: presenilinas (incluindo a presenilina 1 - PS1), nicastrina, APH-1 e PEN-2 (Haass e Selkoe, 2007).

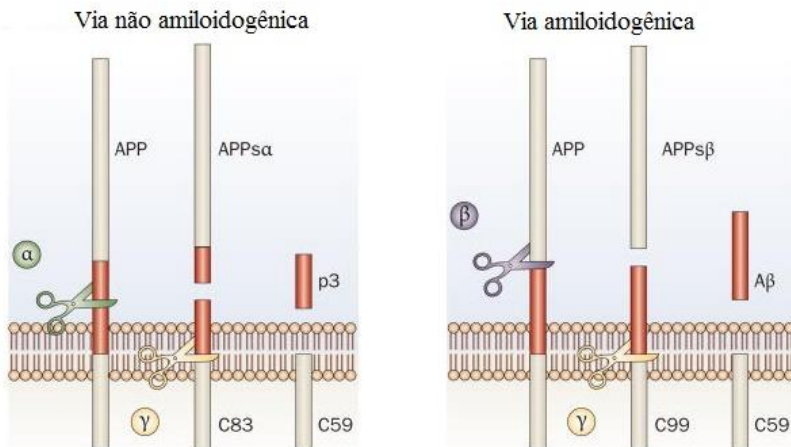


Figura 6. Processamento da proteína precursora amiloide (APP) pelas secretases. Na via não amiloidogênica, a APP é clivada primeiramente pela α -secretase dentro da sequência do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) liberando APPs α . Posterior processamento do resíduo carbóxi-terminal resultante pela γ -secretase libera o fragmento p3. A via amiloidogênica é iniciada quando a β -secretase (BACE-1) cliva a APP na região amino-terminal do $A\beta$ e libera APPs β . Em seguida a clivagem do resíduo carbóxi-terminal pela γ -secretase resulta na formação do $A\beta$ (adaptado de De Strooper et al., 2010).

Grande parte das investigações sobre a doença de Alzheimer tem sido focada na hipótese da cascata amiloide. Até o momento, esta hipótese é a mais aceita para explicar as alterações neuropatológicas observadas na doença de Alzheimer. A hipótese postula que o dano neuronal característico da doença, em parte, é atribuído a alterações no metabolismo do $A\beta$, e.g., aumento da produção e/ou redução na degradação e eliminação. Os níveis aumentados de $A\beta$ resultam em sua agregação e formação dos oligômeros solúveis. Subsequente agregação forma as fibrilas insolúveis, as quais finalmente precipitam-se como placas amiloides extracelulares. Esta cascata tóxica está associada com vários processos neuropatológicos como hiperfosforilação da proteína tau, astrogliose, estresse oxidativo, e disfunção sináptica levando à perda progressiva da função neuronal e prejuízo cognitivo. Recentemente, esta cascata foi revista e agora propõe os oligômeros solúveis como as formas mais patogênicas do $A\beta$ (Haass e Selkoe, 2007; Ferreira e Klein, 2011).

Mutações nos genes relacionados com o processamento da APP caracterizam a doença de Alzheimer de origem genética (doença de Alzheimer familiar de início precoce, pacientes com menos de 65 anos).

Os principais genes envolvidos são os genes que codificam a APP, presenilina 1 (PS1) e presenilina 2 (PS2) (Levy et al., 1990; Goate et al., 1994; Bertram e Tanzi, 2008). Dessa maneira, na forma familiar da doença de Alzheimer o acúmulo e deposição de A β estão relacionados com o aumento na produção deste peptídeo. No entanto, as mutações nesses genes representam apenas uma pequena proporção, sendo a doença de Alzheimer de origem esporádica (início tardio) responsável por 99% dos casos de doença de Alzheimer. A etiologia dos depósitos de A β na doença de Alzheimer esporádica, na maioria dos casos é desconhecida (Rocchi et al., 2003, 2009).

Como os mecanismos patofisiológicos envolvidos na doença de Alzheimer ainda não estão completamente elucidados torna-se complicado o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes. Todavia, tendo em mente que o prejuízo da neurotransmissão colinérgica no SNC contribui significativamente para os sintomas cognitivos associados com a doença de Alzheimer, as estratégias terapêuticas para esta doença foram direcionadas e, em 1997, o primeiro fármaco inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi comercializado (Bartus, 2000). Os inibidores de AChE ainda são os principais fármacos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer leve à moderada, juntamente com antagonistas não competitivos de moderada afinidade dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA)⁷ (Blennow et al., 2006; Mount e Downton, 2006). Os inibidores da AChE (donepezil, galantamina e rivastigmina) aumentam a disponibilidade de acetilcolina no cérebro, fornecendo uma melhora temporária dos sintomas clínicos da doença de Alzheimer e estabilizam ou retardam por algum tempo o declínio da função cognitiva e da capacidade funcional dos indivíduos (Jacobsen, 2002; Nygaard, 2013). Apesar de representarem um importante passo no tratamento da doença, estes compostos são basicamente paliativos e possuem efeitos limitados (Jackson, 2014). Estes fármacos não interferem diretamente com os mecanismos dos processos neurodegenerativos, ou seja, não alteram o curso da doença (Grutzendler e Morris, 2001).

⁷ A memantina é utilizada na clínica desde 1982 em pacientes com doença de Alzheimer moderada a severa. É um bloqueador de receptor NMDA. A excitotoxicidade é um mecanismo implicado na morte neuronal característica desta doença, e que ocorre, em parte, devido ao aumento na ativação dos receptores NMDA e consequente excesso de influxo de cálcio intracelular (Mount e Downton, 2006).

1.5. HIPERCOLESTEROLEMIA COMO FATOR DE RISCO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Evidências acumuladas ao longo das duas últimas décadas apontam a hipercolesterolemia como um possível fator desencadeador do acúmulo de A β na doença de Alzheimer de origem esporádica (Sparks et al., 1990, 1994; Kuo et al., 1998; Solomon et al., 2009). Os estudos iniciaram nos anos 90 com Larry Sparks e colaboradores (1990 e 1993) quando estes demonstraram que em torno de 70% dos indivíduos que haviam falecido em decorrência de DAC também apresentavam placas amiloides em seus cérebros. Por outro lado, indivíduos com a mesma idade e que haviam falecido devido a outras causas eram bem menos susceptíveis a desenvolverem placas amiloides cerebrais. Posteriormente, os mesmos pesquisadores (1994) demonstraram por meio de tratamento crônico com dieta rica em colesterol a coelhos, que a conexão entre hipercolesterolemia e doença de Alzheimer parece envolver o aumento na formação de placas amiloides cerebrais. Do mesmo modo, Refolo e colaboradores (2000) demonstraram que a exposição a uma dieta hipercolesterolêmica resulta em um aumento significativo no acúmulo de A β no SNC de camundongos PSAPP⁸, e que esse aumento se correlaciona fortemente com os níveis de colesterol plasmático (Refolo et al., 2000). Em seguida, os autores demonstraram que o tratamento com um fármaco redutor dos níveis de colesterol reduz os níveis de A β cerebral bem como as placas amiloides neste mesmo modelo animal de doença de Alzheimer (Refolo et al., 2001).

Nesse sentido, estudos clínicos e epidemiológicos vêm indicando que indivíduos hipercolesterolêmicos são mais susceptíveis a desenvolver a doença de Alzheimer (Kivipelto et al., 2001, 2002, 2005). Em especial, um estudo prospectivo de coorte realizado por Kivipelto e colaboradores (2001) demonstrou que indivíduos que apresentam elevados níveis de colesterol plasmático durante a meia-idade apresentam um aumentado risco de desenvolvimento de CCL e doença de Alzheimer em idades mais avançadas. Ademais, Sparks e colaboradores em 2005 demonstraram que quando indivíduos hipercolesterolêmicos recebem terapias que reduzem os níveis de colesterol, i.e., estatinas, apresentam uma menor prevalência da doença de Alzheimer e uma diminuição da deterioração cognitiva (Sparks et al., 2005).

⁸ Camundongo PSAPP: Modelo de camundongo transgênico para doença de Alzheimer.

Além disso, os estudos *in vitro* indicam que o colesterol modula diretamente o processamento da APP e produção de $A\beta$ em células neuronais (Simons et al., 1998; Ehehalt et al., 2003). Simons e colaboradores (1998) demonstraram que a produção de $A\beta$ em neurônios hipocâmpais é inibida completamente quando os níveis de colesterol na membrana celular são reduzidos por compostos extratores de colesterol (metil- β -ciclodextrina). Especificadamente, a redução dos níveis de colesterol na membrana diminuiu a atividade da enzima BACE-1 (Simons et al., 1998). O colesterol é principalmente concentrado em microdomínios de membranas, os *lipid rafts*, os quais parecem ser o principal local para o processamento amiloidogênico da APP (Vetrivel e Thinakaran, 2010). Em contraste, a enzima α -secretase, a qual previne a formação do $A\beta$, necessita de membranas com menos colesterol, como os domínios fosfolipídicos ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, os quais são mais fluidos (Kojro et al., 2001). Portanto, o aumento dos níveis de colesterol celular parece favorecer a associação da APP com as enzimas BACE-1 e γ -secretase nos *lipid rafts*, então estimulando a clivagem da APP em $A\beta$ (Figura 7) (Ehehalt et al., 2003; Xiong et al., 2008).

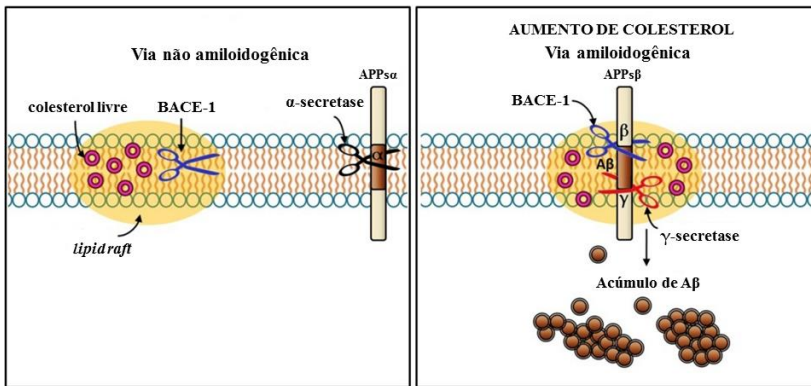


Figura 7. O aumento de colesterol nas membranas celulares pode afetar a produção do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) cerebral. Em condições de aumento de colesterol celular, há uma associação da APP com a β -secretase (BACE-1) nos *lipid rafts*, estimulando a clivagem da APP em $A\beta$ (adaptado de Moreira et al., 2014).

1.6. RECEPTOR DE LDL E O PEPTÍDEO β -AMILOIDE

Os níveis de $A\beta$ no cérebro são rigorosamente regulados por meio de vários processos: (i) sua síntese a partir da APP; (ii) degradação proteolítica por enzimas degradadoras de amiloide; (iii) transporte da circulação para o cérebro e (iv) sua depuração através da BHE (Prasanthi et al., 2008). O transporte de $A\beta$ através da BHE está representando na Figura 8A. O receptor de produtos de glicação avançada (RAGE) é responsável pelo transporte do $A\beta$ da circulação para o cérebro. Este receptor é pertencente à superfamília das imunoglobulinas de superfície celular e, possui uma grande gama de ligantes incluindo o $A\beta$ (Yan et al., 2000). Enquanto, a depuração do $A\beta$ através da BHE, é mediada pelos receptores da família de receptores de LDL, principalmente pelo LRP-1, o qual é amplamente expresso pelos neurônios, astrócitos e micróglia do parênquima cerebral, como também pelas células endoteliais, astrócitos e células musculares na BHE e artérias cerebrais (Herz e Marschang, 2003; Bu, 2009). Enquanto diversos trabalhos definem o papel do LRP-1 na depuração do $A\beta$, estudos recentes apontam que o receptor de LDL também desempenha papel importante no metabolismo e depuração do $A\beta$, assim como na patogênese da doença de Alzheimer (Castellano et al., 2012).

Inicialmente Cao e colaboradores em 2006 observaram que a deleção do receptor de LDL em camundongos Tg2576⁹, resulta em um aumento significativo na deposição amiloide cerebral. Após a formação das placas esses animais deficientes para o receptor de LDL apresentam prejuízos cognitivos significativamente maiores (Cao et al., 2006). Em seguida no ano de 2011, Katsouri e Georgopoulos também mostraram que a falta do receptor de LDL aumenta a deposição amiloide em camundongos 5XFAD¹⁰ (Katsouri e Georgopoulos, 2011). Por outro lado, o estudo de Kim e colaboradores (2009) mostrou que a superexpressão do receptor de LDL no cérebro de camundongos transgênicos para doença de Alzheimer reduziu marcadamente a agregação do $A\beta$ cerebral e aumentou a depuração deste peptídeo do cérebro (Kim et al., 2009). Ademais, Basak e colaboradores (2012) mostraram que o receptor de LDL regula a captação e o metabolismo celular de $A\beta$ pelos astrócitos. O aumento da expressão do receptor de

⁹ Camundongos Tg2576: Modelo de camundongo transgênico para doença de Alzheimer.

¹⁰ Camundongos 5XFAD: Modelo de camundongo transgênico para doença de Alzheimer.

LDL aumentou a captação e depuração de ambos A β 1-40 e A β 1-42 pelos astrócitos, enquanto a deleção deste receptor apresentou o efeito oposto (Basak et al., 2012). Finalmente, Castellano e colaboradores (2012) mostraram que a depuração de A β exógeno administrado no cérebro de camundongos é aumentada com a superexpressão do receptor de LDL. Além disso, os autores observaram que a superexpressão do receptor de LDL aumenta a taxa de depuração do A β do cérebro de camundongos PDAPP¹¹. Especificamente, estes resultados sugerem um mecanismo onde o receptor de LDL regula o acúmulo de A β cerebral via eliminação do cérebro mediada pela BHE (Castellano et al., 2012).

1.7. INFLUÊNCIA DA HIPERCOLESTEROLEMIA NA INTEGRIDADE DA BHE

Estudos experimentais utilizando modelos animais de hipercolesterolemia indicam que alterações metabólicas e disfuncionais na BHE e a consequente neuroinflamação parecem preceder a produção e deposição cerebral de A β induzida pela hipercolesterolemia (Sparks et al., 2000; Ghribi et al., 2006; Takechi et al., 2010; Ullrich et al., 2010). Sparks e colaboradores (2000) demonstraram que a hipercolesterolemia afeta a integridade da BHE e desencadeia o aumento no extravasamento de IgG em coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol (Sparks et al., 2000). Além disso, Sparks e Streit (1997) reportaram um aumento de ativação microglial e infiltração de leucócitos no cérebro de coelhos hipercolesterolêmicos.

Inflamação crônica com ativação microglial tem sido implicada como um evento importante na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer. A micróglia ativada pode contribuir para a neurodegeneração por meio da produção de citocinas e espécies reativas. De fato, muitas linhas de evidência têm apontado para um ciclo oxidativo-inflamatório na vasculatura cerebral induzido pela hipercolesterolemia que poderia impactar áreas relevantes para a cognição (Thirumangalakudi et al., 2008; Evola et al., 2010). Nesse sentido, Thirumangalakudi e colaboradores (2008) utilizando os camundongos LDLr^{-/-} tratados com uma dieta hipercolesterolêmica observaram que alterações neuroinflamatórias parecem ter papel primário na disfunção cognitiva induzida pela hipercolesterolemia. De acordo com estas observações, nós recentemente evidenciamos uma correlação

¹¹ Camundongos PDAPP: Modelo de camundongo transgênico para doença de Alzheimer.

positiva entre os níveis elevados de colesterol periférico e disfunção mitocondrial no córtex cerebral, o que foi associado com estresse oxidativo e prejuízo de memória e aprendizado espacial em camundongos LDLr^{-/-} (de Oliveira et al., 2011).

Há algum tempo vem sendo sugerido que danos vasculares presentes na doença de Alzheimer podem ser importantes no desenvolvimento desta doença (Scheibel et al., 1989). A partir de 1993, com os trabalhos de Jack C. de la Torre, surgiu a hipótese vascular para a forma esporádica da doença de Alzheimer. Este autor propôs que dois fatores precisam estar presentes antes que ocorram a disfunção cognitiva e neurodegeneração características da doença de Alzheimer: (i) o envelhecimento e (ii) a presença de uma condição que diminua a perfusão cerebral (e.g., aterosclerose das artérias carótidas) (de la Torre e Mussivand, 1993; de la Torre, 1999). Na mesma época, inúmeros estudos clínicos e histopatológicos apontaram uma ligação entre os fatores de risco vasculares, tais como hipertensão e hipercolesterolemia, e o desenvolvimento da doença de Alzheimer (Sparks et al., 1990, 1995; Soneira e Scott, 1996). Nesse sentido, o estudo epidemiológico de Strand e colaboradores (2013) demonstrou que a disfunção vascular associada a níveis elevados de colesterol periférico é uma das mais prováveis explicações para a associação entre a hipercolesterolemia e a doença de Alzheimer (Strand et al., 2013).

Evidências clínicas e pré-clínicas vêm demonstrando que a disfunção da BHE pode ser mais prevalente na doença de Alzheimer do que previamente se pensou. Neste contexto, Ujiie e colaboradores (2003) observaram que em camundongos Tg2576¹² de 10 meses de idade a permeabilidade da BHE é maior que em camundongos controle da mesma idade. Os autores observaram que o aumento na permeabilidade da BHE já é evidente aos 4 meses de idade, antes mesmo do início da doença e da deposição de A β (Ujiie et al., 2013).

A condição inflamatória periférica associada à hipercolesterolemia desencadeia danos na BHE levando ao extravasamento de proteínas séricas. As células do sistema imune periférico interagem com o endotélio cerebral ativado, induzindo cascatas de sinalização intracelular, produção de mediadores inflamatórios e alterações nas junções oclusivas. A migração de células do sistema imune periférico para o SNC resulta na amplificação da produção de mediadores

¹² Camundongos Tg2576: Modelo de camundongo transgênico para doença de Alzheimer.

inflamatórios e consequentemente danos ao tecido cerebral (Figura 8B) (Xiong et al., 2008; Takeda et al., 2014).

Além disso, prejuízos da função da BHE podem ainda levar a um aumento nos níveis de $A\beta$ cerebral por meio da desregulação da entrada e saída deste peptídeo no SNC. Nesse sentido, foi demonstrado no modelo experimental de coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol, que a hipercolesterolemia aumenta o acúmulo de $A\beta$ no cérebro por meio da diminuição dos níveis de LRP-1 e aumento dos níveis de RAGE na BHE (Prasanthi et al., 2008). A Figura 8B mostra os principais eventos envolvidos na disfunção da BHE induzida pela hipercolesterolemia.

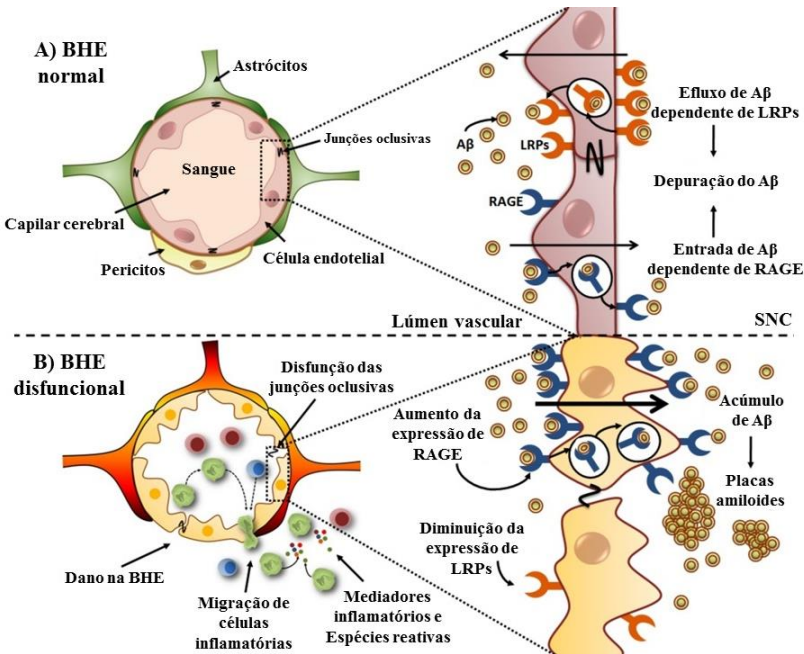


Figura 8. Influência da hipercolesterolemia na integridade da barreira hematoencefálica (BHE). A BHE é formada pelas junções oclusivas que conectam as células endoteliais aos capilares que irrigam o parênquima cerebral. Juntamente com a lâmina basal, os processos astrocíticos e os pericitos formam a unidade neurovascular. (A) Situações normais e (B) Situações patológicas, e.g., a hipercolesterolemia, onde ocorrem danos na BHE (disfunção das junções oclusivas) (adaptado de Moreira et al., 2014).

Portanto, as evidências acumuladas ao longo dos últimos vinte anos indicam uma associação importante entre alterações na homeostase do colesterol, em particular as encontradas em indivíduos com hipercolesterolemia familiar, e a fisiopatologia da doença de Alzheimer de origem esporádica.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A hipercolesterolemia familiar resulta em níveis elevados de partículas de LDL circulantes, sendo responsável por altos índices de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares e grande importância do ponto de vista epidemiológico. Segundo a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (2012) estima-se que no Brasil existam de 250.000 a 300.000 portadores desta doença. É importante destacar, que estes dados poderiam ser ainda muito maiores se não fosse o desafio de demonstrar a severidade desta condição fazendo com que inúmeros casos sejam subdiagnosticados.

Por outro lado, outro grande desafio enfrentado pela sociedade brasileira é o expressivo aumento da população idosa, um fenômeno de caráter mundial. Segundo dados de 2012 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), atualmente a relação entre a população idosa (pessoa de 60 anos ou mais) e pessoas com menos de 15 anos de idade é 1:2. Embora estes números reflitam um claro avanço na qualidade de vida de parte da população, eles também alertam para a possibilidade de que em um futuro próximo cresça significativamente o número de pessoas acometidas por doenças relacionadas à idade, dentre elas a doença de Alzheimer. A doença de Alzheimer é a causa mais comum de prejuízos cognitivos em pessoas com mais de 65 anos de idade. Atualmente estima-se haver cerca de 36 milhões de pessoas com doença de Alzheimer no mundo. Este número praticamente irá dobrar a cada 20 anos, segundo dados fornecidos pelo Relatório de 2012 da Organização Mundial da Saúde (OMS) realizado juntamente com a associação Internacional de Doença de Alzheimer (ADI). Não há dados claros sobre a incidência da doença de Alzheimer no Brasil, entretanto, com base em pesquisas de outros países e dados do IBGE, estima-se que 1,2 milhão de pessoas sofram com a doença, cerca de 100 mil novos casos por ano (ABRAz, 2014).

Dois aspectos inerentes à hipercolesterolemia familiar são potencialmente relacionados à patofisiologia da doença de Alzheimer esporádica. Inicialmente, destaca-se que o defeito primário na hipercolesterolemia familiar é **uma mutação no gene que codifica para o receptor de LDL**, resultando em redução funcional (parcial à completa) deste. Salienta-se aqui que diversas evidências vêm demonstrando o envolvimento do receptor de LDL no metabolismo e depuração do A β cerebral. Ademais, em decorrência da mutação no gene que codifica o receptor de LDL, os indivíduos com esta patologia são, por conseguinte, expostos a **níveis muito elevados de colesterol**

plasmático desde o nascimento. Diversas linhas de evidência também indicam o colesterol como um fator modulador da produção e depuração do A β e, subsequente, acúmulo de placas amiloides.

Nesse sentido, nossa hipótese de trabalho é que os efeitos neurotóxicos induzidos pelo A β podem ser potencializados em indivíduos com hipercolesterolemia familiar, uma vez que a depuração deste peptídeo estaria comprometida. Para avaliar experimentalmente esta hipótese, camundongos nocautes para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}), modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana, foram expostos à administração intracerebroventricular do A β e marcadores comportamentais e bioquímicos de neurotoxicidade foram avaliados. Ademais, os camundongos LDLr^{-/-} também foram expostos ao envelhecimento e ao tratamento com uma dieta rica em colesterol e a integridade da BHE e metabolismo do A β foram avaliados. Conjuntamente, os resultados deste estudo irão contribuir para o entendimento da relação entre hipercolesterolemia familiar e o desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve em indivíduos de meia-idade. Outrossim, também poderão indicar o receptor de LDL como um possível alvo terapêutico na doença de Alzheimer, com o intuito de potencializar o metabolismo e depuração do A β cerebral.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos moleculares que relacionam a hipercolesterolemia familiar à doença de Alzheimer, com particular ênfase na neurotoxicidade induzida pelo A β e integridade da BHE.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Verificar os efeitos da administração intracerebroventricular do A β 1-40 nos camundongos LDLr^{-/-} sobre a função cognitiva, colinérgica, antioxidante e resposta neuroinflamatória;
- ❖ Verificar se os prejuízos cognitivos presentes em camundongos LDLr^{-/-} jovens e de “meia-idade” se relacionam a alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo e depuração do A β e no processo apoptótico;
- ❖ Avaliar se os prejuízos cognitivos e alterações na permeabilidade da BHE em camundongos LDLr^{-/-} são, ainda, potencializados pela exposição a uma dieta hipercolesterolêmica;
- ❖ Avaliar se a exposição à LDL prejudica a homeostase de células neuronais;
- ❖ Avaliar se o tratamento de camundongos *Swiss* com o composto Genfibrozila aumenta expressão gênica hepática e cerebral do receptor de LDL.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

Albumina de soro bovino, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida, Glutaciona oxidada, Glutaciona redutase, Glutaciona reduzida, Peróxido de *tert*-butila, Iodeto de Acetilcolina, 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato, Triton X-100, Peptídeo β -amiloide 1-40, Genfibrozila, Hidrato de cloral, Fluoresceína de sódio, os anticorpos anti-GFAP e anti-tubulina, o meio de montagem CC/mount e a Tioflavina-S foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O anticorpo anti-aquaporina 4 foi obtido da empresa Santa Cruz Biotechnology. O Isoflurano foi obtido da empresa Abbot Laboratórios do Brasil. Os reagentes para a extração de RNA, síntese de cDNA e reação de PCR em tempo real foram obtidos da Promega Brasil e Applied Biosystems. Soro de cavalo, 2',7'- diclorodihidrofluoresceína acetato e os anticorpos secundários Alexa fluor foram adquiridos da empresa Life Technologies. O Iodeto de propídeo foi adquirido da Calbiochem-Vovabiochem. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. ANIMAIS

Camundongos da linhagem selvagem C57BL/6 e nocautes para o receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$) foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil. Os progenitores foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA). Além disso, foram utilizados camundongos *Swiss* albinos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm), com condição controlada de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 7 horas às 19 horas), e com livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC), Processo 23080.040932/2010-28, PP00553, que segue normas internacionais de utilização de animais para pesquisa científica.

O camundongo $LDLr^{-/-}$ é um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana desenvolvido e descrito por Ishibashi e colaboradores (1991 e 1993). Algumas características deste modelo animal podem trazer vantagens para sua utilização, tais como: (i) semelhança à condição humana de hipercolesterolemia familiar, causada

por mutações no gene para o receptor de LDL; (ii) o perfil de lipoproteínas plasmáticas, que se assemelha ao de humanos, estando a maior parte do colesterol confinado na fração LDL; e (iii) o grau de dislipidemia intermediário, desenvolvendo lesões menos avançadas do que outros modelos de hipercolesterolemia (Zadelaar et al., 2007).

4.3. ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DO PEPTÍDEO β -AMILOIDE

Primeiramente foi realizado o protocolo de agregação do $A\beta_{1-40}$. O fragmento $A\beta_{1-40}$ foi dissolvido em PBS 0,1 M (pH 7,4) e incubado a 37°C por 4 dias, como descrito previamente (Prediger et al., 2007; Piermartiri et al., 2010; Figueiredo et al., 2011; Santos et al., 2012). A forma agregada do $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/sítio) ou a solução veículo (PBS) foram administradas por via intracerebroventricular (i.c.v.) como descrito por Laursen e Belknap (1986). Para isso, os camundongos foram anestesiados com isoflurano 0,96% e uma microseringa Hamilton com agulha 28 gauges de 3 mm de comprimento foi utilizada. A agulha foi inserida unilateralmente (1 mm) no ponto médio equidistante entre os olhos e a uma distância igual entre os olhos e as orelhas, perpendicular ao plano do crânio. Um volume de 3 μ L das soluções foi injetado gradualmente durante um intervalo de 5 s no ventrículo lateral.

4.4. CULTIVO PRIMÁRIO DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS

As culturas primárias de neurônios hipocampais de fetos de ratos *Wistar* (com 18 a 19 dias gestacionais) foram preparadas conforme descrito por Cáceres e colaboradores (1986), com pequenas modificações. As ratas prenhas foram anestesiadas com isoflurano 0,96%, eutanasiadas por deslocamento cervical e os fetos removidos. Os cérebros foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo uma solução estéril de tampão de Hank's gelado. Os hipocampus foram dissecados, as meninges foram retiradas, o tecido triturado e as células dissociadas por meio de leve tripsinização (tripsina 0,25%, 15 minutos, 37°C) e mecanicamente com pipetas Pasteur de pontas flambadas. Em seguida, as células foram semeadas na presença de meio de cultura MEM contendo 10% de soro de cavalo, 2 mM de glutamina, piruvato de sódio e 5000 U/mL de penicilina/estreptomicina. O plaqueamento foi feito em placas de cultura contendo *coverslips* previamente tratados com solução de poli-L-lisina a 10 μ g/mL. As

culturas foram mantidas em estufa com 95% de umidade, 5% CO₂ a 37°C. Depois de 2 horas, o meio MEM foi trocado pelo meio Neurobasal suplementado com 1% de B27, 0,5% de glutamax e 5000 U/mL de penicilina/estreptomicina, o qual foi mantido durante o período de cultura.

4.5. DESENHOS EXPERIMENTAIS

4.5.1. Experimento 1: Camundongos LDLr^{-/-} são mais susceptíveis a neurotoxicidade induzida pela injeção i.c.v. do A β ₁₋₄₀?

O objetivo do primeiro desenho experimental foi avaliar se a ausência do receptor de LDL, e consequente hipercolesterolemia, potencializam a neurotoxicidade induzida pelo A β . Dessa forma, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de 5 meses de idade machos foram injetados pela via i.c.v. com o A β ₁₋₄₀ agregado ou com a solução veículo (PBS), totalizando quatro grupos experimentais. A administração aguda i.c.v. do A β ₁₋₄₀ agregado (400 pmol/sítio) em camundongos permite a investigação de mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade induzida pelo A β (Prediger et al., 2007, 2008; Takeda et al., 2009; Piermartiri et al., 2010; Figueiredo et al., 2011; Santos et al., 2012). Ademais, o modelo experimental da administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀ apresenta validade preditiva e de analogia (Takeda et al., 2009). Dez dias após o tratamento com o A β ₁₋₄₀, os camundongos foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: realocação de objeto, alternância espontânea e labirinto em cruz elevado (grupos independentes de animais foram usados em cada teste, 8 animais por grupo experimental). Após a realização do teste realocação do objeto, no 14º dia, os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, intraperitoneal - i.p.) e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis plasmáticos de colesterol total e de colesterol HDL. Os animais foram, então, eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, o córtex pré-frontal e o hipocampo dissecados para a determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), da atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), para a quantificação dos níveis de glutatona (GSH), e para a mensuração dos níveis de espécies reativas. Após o teste da alternância espontânea, cinco animais de cada grupo experimental foram anestesiados (hidrato de cloral 40%) e perfundidos com paraformaldeído 4% para a coloração por Tioflavina-S e para ensaios de imunofluorescência. Nos ensaios de

imunofluorescência foi avaliada a densidade das proteínas ácido fibrilar glial (GFAP) e aquaporina 4 (AQP-4). Após o teste do labirinto em cruz elevado, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, o hipocampo foi dissecado, e, fatias de 400 μm de espessura foram obtidas para realização do ensaio de captação de iodeto de propídeo. O esquema do primeiro desenho experimental está representado na Figura 9.

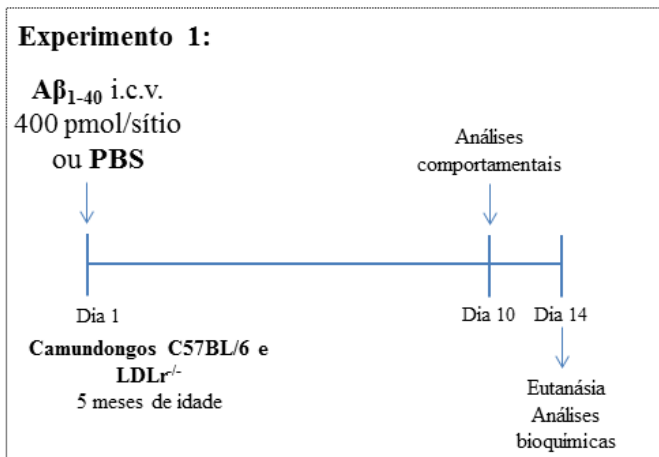


Figura 9. Desenho experimental 1: Camundongos LDLr^{-/-} são mais susceptíveis a neurotoxicidade induzida pela injeção i.c.v. do A β_{1-40} ?

4.5.2. Experimento 2: Os prejuízos cognitivos nos camundongos LDLr^{-/-} jovens e de “meia-idade” estão associados com alterações no metabolismo do A β e em proteínas anti- e pró-apoptóticas?

O objetivo específico do segundo desenho experimental foi buscar evidências que associam os prejuízos cognitivos presentes nos camundongos LDLr^{-/-} a alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo do A β e no processo apoptótico. Dessa forma, foram utilizados camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e camundongos LDLr^{-/-} adultos jovens (três meses) e de “meia-idade” (quatorze meses) machos. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, o córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados para a determinação dos níveis de RNAm de proteínas envolvidas no metabolismo do A β (LRP-1, APP, BACE-1 e PS-1), e de proteínas anti- e pró-apoptóticas (Bcl-2 e Bax respectivamente) por qPCR (Figura 10).

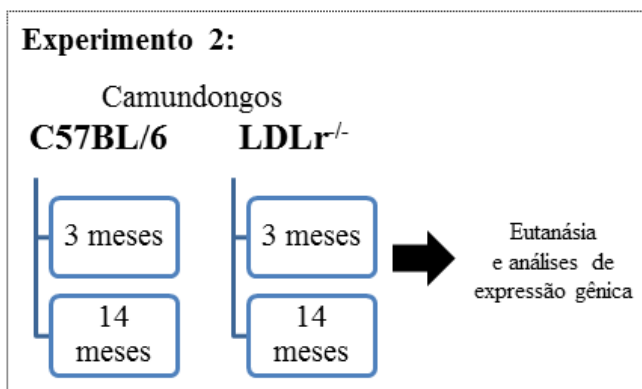


Figura 10. Desenho experimental 2: Os prejuízos cognitivos nos camundongos LDLr^{-/-} jovens e de “meia-idade” estão associados com alterações no metabolismo do A β e em proteínas anti- e pró-apoptóticas?

4.5.3. Experimento 3: Os prejuízos cognitivos e alterações na BHE em camundongos LDLr^{-/-} são potencializados por uma dieta hipercolesterolêmica?

O objetivo específico deste terceiro desenho experimental foi investigar se os prejuízos cognitivos e alterações na permeabilidade da BHE observados em camundongos LDLr^{-/-} seriam potencializados pela exposição à dieta hipercolesterolêmica. Nesse sentido, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e os camundongos LDLr^{-/-} de três meses de idade machos foram expostos a uma dieta hipercolesterolêmica (constituída por 20% de gordura saturada e 1,25% de colesterol como descrito na Tabela 1, produzida na Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, Tabela 2) (de Oliveira et al., 2011, 2013) ou uma dieta padrão para roedores durante trinta dias. Após trinta dias de tratamento com as dietas, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais de realocação do objeto, reconhecimento do objeto, alternância espontânea e labirinto em cruz elevado (grupos independentes de animais foram usados em cada teste, 8 animais por grupo experimental). Após a realização do protocolo de testes comportamentais, os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, i.p.), o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis de colesterol total e de colesterol HDL e, posteriormente, o córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados para

a determinação dos níveis de RNAm de proteínas integrantes das junções oclusivas da BHE (claudina-5 e ocludina). Em um grupo independente de animais a permeabilidade da BHE dos animais à fluoresceína de sódio foi avaliada no córtex pré-frontal, hipocampo e bulbo olfatório (Figura 11).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dieta padrão	Dieta hipercolesterolêmica
Proteína	22	21
Gordura	4	20
Carboidrato	46,5	47,75
Ácido cólico	-	0,5
Colina bitartrate	-	0,5
Colesterol	-	1,25

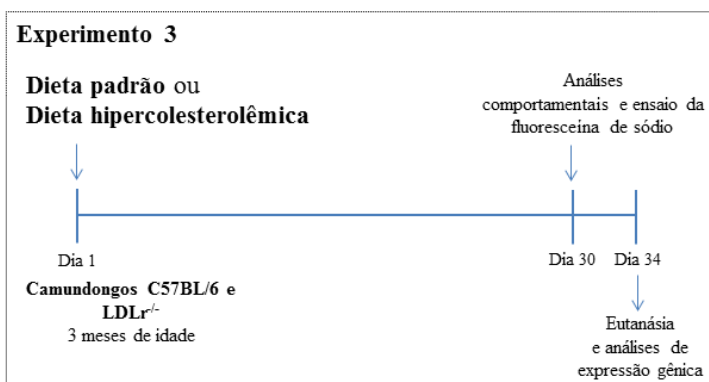


Figura 11. Desenho experimental 3: Os prejuízos cognitivos e alterações na BHE em camundongos LDL^{r/-} são potencializados por uma dieta hipercolesterolêmica?

4.5.4. Experimento 4: Quais as consequências da exposição de células neuronais à LDL humana isolada?

Tendo em mente que a disfunção da BHE pode desencadear a entrada de partículas de LDL plasmáticas no SNC (Hui et al., 2012), no desenho experimental 4 nós investigamos se a exposição à LDL humana isolada modifica a homeostase de células neuronais. Cultura primária de neurônios hipocámpais de rato (dia *in vitro* 0 ou dia *in vitro* 1) foi exposta à LDL na concentração de 50 µg/mL durante 24 horas e o

desenvolvimento neuronal foi avaliado por meio de ensaios de imunofluorescência utilizando marcadores para actina e tubulina (Figura 12). Estes experimentos foram realizados no Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra na Universidad Nacional de Córdoba durante o estágio sanduiche realizado no grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Alfredo Cáceres.

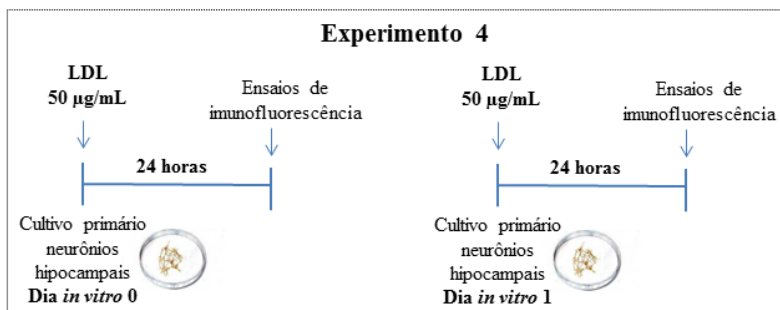


Figura 12. Desenho experimental 4: Quais as consequências da exposição de células neuronais à LDL humana isolada?

4.5.5. Experimento 5: Em busca de uma terapia capaz de aumentar a expressão do receptor de LDL ao nível cerebral.

Nosso desenho experimental 5 tem como objetivo avaliar se o composto Genfibrozila, um fibrato hipolipemiante, é capaz de aumentar a expressão gênica hepática e cerebral do receptor de LDL em camundongos. Para este fim, camundongos *Swiss* de três meses de idade machos foram tratados com o fármaco Genfibrozila (três doses diferentes: 1,3; 13 e 130 mg/kg, i.p.) ou com a solução veículo (salina) diariamente durante trinta dias. Ao final do tratamento, os camundongos foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, i.p.) e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis de colesterol total. Em seguida, os animais foram, então, eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, o fígado e o hipocampo dissecados para a determinação dos níveis de RNAm do receptor de LDL (Figura 13).

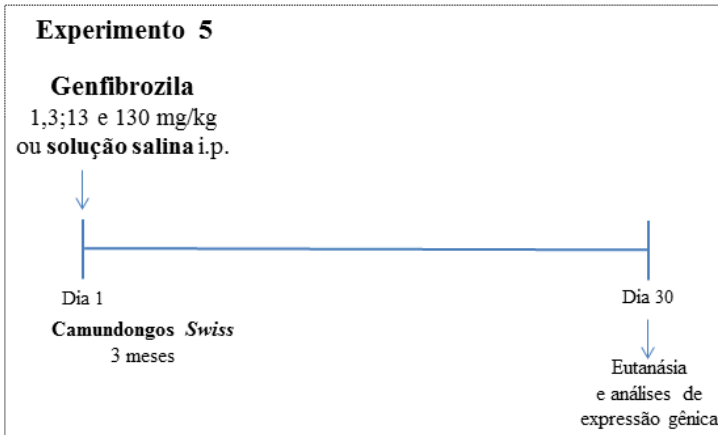


Figura 13. Desenho experimental 5: Em busca de uma terapia capaz de aumentar a expressão do receptor de LDL ao nível cerebral.

4.6. TESTES COMPORTAMENTAIS

4.6.1. Teste do campo aberto:

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora dos animais (Prut e Belzung, 2003). O aparelho feito de acrílico transparente com assoalho cinza foi dividido por linhas pretas em 25 quadrados (10 x 10 cm) e cercado por paredes elevadas em 40 cm de altura. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e o número total de cruzamentos foi registrado por 5 minutos. Um cruzamento foi registrado quando o animal atravessou o quadrado com as quatro patas.

4.6.2. Teste da realocação do objeto:

A memória espacial dos camundongos foi avaliada no teste de realocação de objeto. Este teste, baseado na tendência espontânea de roedores, previamente expostos a dois objetos idênticos, a posteriormente, explorar um dos objetos (realocado para uma nova localização espacial) por um tempo maior que o objeto não deslocado, tem sido utilizado na avaliação de memórias dependentes do hipocampo (Ferguson e Sapolsky, 2007; Assini et al., 2009). O aparelho utilizado para o teste foi o campo aberto. Os objetos eram dois retângulos plásticos idênticos (3 cm lado x 4,5 cm lado x 4,5 cm altura) os quais foram colados

ao chão de maneira equidistante 7 cm de dois lados da caixa. O procedimento consistiu em uma sessão de habituação ao campo aberto com duração de 5 minutos, na qual o animal era colocado na caixa e explorava-a livremente. Após 24 horas, ocorreu a sessão treino, onde dois objetos idênticos eram apresentados aos animais. Neste momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa, durante 5 minutos. Depois do treino os animais retornavam às suas gaiolas e aguardavam até o momento do teste, 180 minutos após o treino. No momento do teste, porém, um dos objetos era colocado em uma nova posição no campo aberto. Neste momento registrava-se, novamente, o tempo de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Este tempo de exploração dos objetos foi utilizado para o cálculo do índice de localização de objetos, o qual foi utilizado como parâmetro de memória (Assini et al., 2009). Índice de localização = $[t(s) A1' \times 100 / \{t(s) A1' + t(s) A1\}]$. Onde A1' foi o tempo gasto pelos animais explorando o objeto deslocado e A1 foi o tempo gasto pelos animais explorando o objeto não deslocado.

4.6.3. Teste do reconhecimento do objeto:

O teste de reconhecimento do objeto também foi utilizado para avaliar memórias dependentes do hipocampo (Ainge et al., 2006). Neste teste, o animal está familiarizado com um objeto, e então, após um tempo, é apresentado simultaneamente ao mesmo objeto e a um novo objeto. Os objetos utilizados apresentam nível exploratório, complexidade física e tamanho similares. Primeiramente, no dia anterior ao teste os animais foram individualmente habituados ao campo aberto durante 5 minutos. Na sessão treino, dois objetos idênticos eram apresentados aos camundongos. Neste momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa, durante 5 minutos. Os animais retornaram às suas gaiolas imediatamente depois do treino. Uma hora após o treino, os animais foram reintroduzidos no campo aberto que continha um objeto novo e um objeto previamente explorado. Neste período registrava-se, novamente, o tempo de exploração de cada um dos objetos durante 5 minutos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Um índice de discriminação - $[t(s) A2 \times 100 / \{t(s) A2 + t(s) A1\}]$, onde A2 foi o tempo gasto pelos animais explorando o objeto novo e A1 foi o tempo gasto pelos animais

explorando o objeto velho - foi utilizado para medir a memória de reconhecimento (Greco et al., 2010).

4.6.4. Teste de alternância espontânea:

O teste de alternância espontânea realizado no labirinto em “T” foi utilizado como um parâmetro qualitativo para avaliação da memória operacional em camundongos. A alternância espontânea ocorre quando há a escolha do braço do labirinto em “T” que não foi selecionado no treino anterior pelos animais (Spowart-Manning e van der Staay, 2004). O aparato experimental foi feito de acrílico transparente preto contendo um braço central e dois braços laterais posicionados em um ângulo de 90° em relação ao braço central. Os braços tinham 10 cm de largura e as paredes tinham 30 cm de altura. Na primeira sessão treino, os animais foram forçados a escolher um dos braços (direita, por exemplo), enquanto o outro estava trancado. Após o camundongo explorar o braço direito, eventualmente poderia voltar a posição inicial, onde era confinado por 5 segundos, enquanto a barreira do braço esquerdo era retirada. A partir deste primeiro treino, ocorreram os treinos de livre escolha, nos quais os camundongos podiam escolher livremente entre os braços da direita ou esquerda. Quando o animal entrava em um braço o outro era trancado, e voltando ao braço inicial eram retidos por mais 5 segundos (início de uma nova sessão treino). O teste acaba quando os camundongos realizam 14 treinos ou após 30 minutos (Spowart-Manning e van der Staay, 2004).

4.6.5. Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado é o teste mais utilizado para avaliar o comportamento do “tipo ansioso” em roedores (Rodgers et al., 2010). Por outro lado, a repetição do teste 24 horas após no labirinto em cruz elevado (sessão reteste) está associada com mudanças comportamentais acentuadas indicativas de aprendizado aversivo (Rodgers et al., 1996). O aparato, feito de madeira e fórmica, consiste de dois braços abertos (18 x 6 cm), opostos a dois braços fechados (18 x 6 cm), elevados 60 cm do chão. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) mede 6 x 6 cm. Os experimentos foram conduzidos em ambiente com baixa luminosidade (12 lux), sendo que os comportamentos dos animais no labirinto em cruz elevado foram registrados por uma câmera de vídeo acoplada a um gravador de DVD instalado na sala adjacente à sala de experimentos. Cada camundongo foi colocado na plataforma central de frente para um braço fechado. Os animais foram observados durante um

período de 5 minutos. Foram analisados os seguintes parâmetros: o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o tempo de permanência nos braços abertos e nos fechados (foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estivessem no interior do braço). Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos [%EA: entradas nos braços abertos / (entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados) x 100]; porcentagem de permanência nos braços abertos [%TBA: tempo nos braços abertos / (tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados) x100]. Além disso, foi utilizado o número total de entradas nos braços fechados como uma medida de locomoção.

4.7. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE LIPÍDEOS PLASMÁTICOS

A quantificação do colesterol total (CT) e colesterol HDL no plasma dos camundongos foi realizada utilizando reagentes comerciais (Gold Analisa), seguindo as especificações do fabricante. A concentração plasmática de colesterol contida nas lipoproteínas (VLDL, LDL + IDL) foi determinada indiretamente através da diferença entre os níveis de CT e colesterol HDL e denominada de colesterol não-HDL (Sanchez-Muniz e Bastida, 2008). Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.8.1. Preparação tecidual para as análises bioquímicas:

Os animais foram eutanasiados e os tecidos cerebrais (cortéx pré-frontal e hipocampo) homogeneizados (1: 10 m/v) em tampão HEPES 20 mM (pH 7,0). Em seguida os homogenatos foram centrifugados a 3.000 g (4° C) por 5 minutos e uma alíquota do sobrenadante foi separada para a determinação da atividade da AChE. Posteriormente, os sobrenadantes da primeira centrifugação foram novamente centrifugados a 16.000 g (4° C) por 20 minutos e o sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas GR, GPx, SOD, e os níveis de GSH e espécies reativas.

4.8.2. Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE):

A atividade da AChE foi determinada de acordo com o método proposto por Ellman et al. (1961). Este método baseia-se na taxa de hidrólise do iodeto de acetiltiocolina, que é medida em 412 nm. O

grupamento tiol (-SH) da tiocolina reage com o ácido 5',5 - ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) formando o ânion ácido 2-nitro-5-mercaptop - benzóico (TNB) com cor amarela. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do TNB ($\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. Os dados foram expressos como nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína.

4.8.3. Sistema antioxidante vinculado à glutationa (GSH):

Os níveis de GSH foram determinados por meio do ensaio fluorimétrico descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas modificações. Este ensaio baseia-se no princípio de que os grupos tíóis (-SH) da GSH reagem especificamente com orto-ftalaldeído (OPT) (em pH 8,0), resultando na produção de um produto altamente fluorescente. Primeiramente para a precipitação das proteínas, a amostra (sobrenadante 1) foi misturada ao ácido perclórico 0,6 M, e centrifugado a 14.000 rpm (4°C) durante 10 minutos. O sobrenadante resultante (sobrenadante 2) foi incubado com 0,1% (m/v em metanol) de orto-ftalaldeído em Na_2HPO_4 100 mM, durante 15 minutos à temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi lida a um comprimento de onda de emissão de 420 nm e de excitação de 350 nm. O conteúdo de GSH foi calculado utilizando uma curva padrão e expresso como μmol de GSH/mg proteína.

A GR catalisa a redução da glutationa oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG, a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado em 340 nm. A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (Carlberg e Mannervik, 1985). O meio de reação continha tampão fosfato 0,25 M (pH 7,0), 1 mM de EDTA e NADPH 0,2 mM. Após adicionar a amostra, o consumo inespecífico de NADPH foi mensurado por 5 min a 340 nm. Ao adicionar o substrato GSSG 1 mM a leitura foi realizada por 5 minutos adicionais e descontou-se o consumo inespecífico de NADPH do decaimento por minuto obtido. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. Os dados foram expressos como nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

A GPx catalisa a redução de H_2O_2 , bem como outros lipoperóxidos e peróxidos orgânicos, utilizando a GSH reduzida como co-substrato e produzindo GSSG. A GSSG é reduzida pela GR com o consumo de NADPH, que foi mensurado através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm (Wendel, 1981). Para este ensaio, o meio de reação continha tampão fosfato 0,25 M (pH 7,0) 1 mM de EDTA, GSH 100 mM, GR 5

U/ mL e NADPH 0,1 mM. Adicionou-se, neste meio, a amostra para mensurar o consumo inespecífico de NADPH através de uma leitura por 5 minutos, a 340 nm. Ao adicionar o substrato (1 mM peróxido de *tert*-butila), a leitura foi realizada por mais 5 minutos. Ao decréscimo de absorbância (340 nm) por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. Os dados foram expressos como nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

4.8.4. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD):

A SOD dismuta os ânions superóxidos em H_2O_2 e oxigênio molecular. A atividade da SOD foi determinada como descrito por Misra e Fridowich (1972). Este método tem como base a capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação da adrenalina em adrenocromo. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de oxidação da epinefrina em 50%. A amostra foi adicionada a um tampão glicina 50 mM (pH 10,2). A reação enzimática foi iniciada pela adição de epinefrina e a cor foi medida a 480 nm. A atividade enzimática foi expressa em unidades (U)/mg de proteína.

4.8.5. Determinação dos níveis de espécies reativas:

Os níveis de espécies reativas foram mensurados com base na oxidação da sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína acetato (DCF-DA) em um composto fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF), como previamente descrito (Hempel et al., 1999). A amostra foi incubada com DCF-DA 80 mM a 37°C durante 15 minutos. A DCF-DA é desesterificada no interior das células por esterases endógenas para o ácido livre ionizado, DCFH. DCFH é oxidado em DCF pelas espécies reativas. A formação deste derivado oxidado fluorescente foi monitorada com os comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente. A produção de espécies reativas foi quantificada utilizando uma curva padrão de DCF e os dados foram expressos como mol DCF/mg de proteína.

4.8.6. Determinação dos níveis de proteínas:

O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Lowry (1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

4.9. DETERMINAÇÃO DO IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL (GFAP) E AQUAPORINA 4 (AQP-4)

As densidades de GFAP e AQP-4 foram avaliadas por meio de ensaios de imunofluorescência. Os camundongos foram anestesiados com hidrato de cloral (40%) e logo perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina (NaCl 0,9%), seguida por uma solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M (pH 7,4). Após a perfusão, os cérebros foram removidos e pós-fixados na mesma solução fixadora durante 24 horas à temperatura ambiente e crioprotégidos por imersão em solução de sacarose 30% em PBS 0,1 M a 4°C até afundarem. Após, os cérebros foram congelados por imersão em isopentano resfriado e armazenados em congelador (-80°C) para as análises posteriores. Cortes coronais (40 µm) em série de hipocampo foram obtidos com um criostato (Leica) a -25°C. Os cortes foram primeiramente bloqueados com 5% de soro de cavalo, diluído em PBS 0,1 M contendo 2% de Triton X-100, durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* a 4 °C com o anticorpo de camundongo anti-GFAP e o anticorpo feito em cabra anti- AQP4, em 1% de soro de cavalo diluído em PBS 0,1 M contendo 0,5% de Triton X-100. Após três lavagens em PBS 0,1 M, os cortes de tecido foram incubados com o anticorpo anti-camundongo Alexa fluor 488 e anti-cabra Alexa fluor 568 em 1% de soro de cavalo diluído em PBS 0,1 M contendo 0,5% de Triton X-100, durante 2 horas à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados três vezes com PBS 0,1 M e, então, incubados com DAPI 0,5 µg/mL em PBS 0,1 M durante 10 minutos. Por fim, os cortes foram novamente lavados três vezes com PBS 0,1 M e montados em lâminas com meio de montagem CC/mount e cobertos com lamínulas. As imagens dos cortes de hipocampo foram capturadas em um microscópio confocal Olympus FVi-10 e examinadas com o software Image J (Moreira et al., 2012; dos Santos et al., *in press*).

4.10. COLORAÇÃO PELA TIOFLAVINA-S

Para visualização de placas amiloides foi realizada o método de coloração pela Tioflavina-S. Os cortes hipocampais (40 µm) foram incubados em 0,5% de Tioflavina-S em etanol 50% durante 10 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados duas vezes em etanol 50% e uma vez em PBS 0,1 M. Por fim, os cortes foram montados com o meio de montagem C/C Mount e cobertos com lamínulas. As imagens foram

capturadas em um microscópio confocal Olympus FVi-10 (Medeiros et al., 2012).

4.11. ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDEO EM FATIAS HIPOCAMPAIS

Os animais foram eutanasiados e os hipocampos rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH 7,4. As fatias (400 µm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain e pré-incubadas em placas de 96 poços em tampão KRB por 1 hora a 37 °C. Após este período de incubação, as fatias foram submetidas ao ensaio de captação de iodeto de propídeo. O iodeto de propídeo é um composto polar que entra apenas em células mortas ou com a membrana plasmática bastante danificada. Uma vez dentro das células, o iodeto de propídeo complexa-se com o DNA e induz uma intensa fluorescência vermelha. Após o período pré-incubação as fatias hipocampais foram incubadas por 30 minutos com o iodeto de propídeo 7 µg/mL à 37° C e depois lavadas uma vez com o tampão KRB para a subsequente análise em um microscópio de epifluorescência invertido. As fotos foram tiradas utilizando-se uma máquina fotográfica. As imagens foram capturadas e então analisadas usando um software Scion Image. A área fluorescente pela incorporação do iodeto de propídeo (transformada em pixels) foi detectada e analisada usando a opção *density slice* do software Scioncorp através da divisão da fluorescência do iodeto de propídeo pela área total da fatia (Piermartiri et al., 2010).

4.12. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA (RNAm)

A expressão gênica (RNAm) foi determinada através de *real-time* PCR quantitativo (qRT-PCR) como descrito por Engel e colaboradores (2013). O córtex pré-frontal e hipocampo dos animais foram homogeneizados em tampão de lise e o RNA total foi extraído com o kit *SV Total RNA Isolation*. Cerca de 400 a 500 ng de RNA total foi utilizado na síntese de cDNA, utilizando o kit *Taqman Reverse Transcriptase* e a enzima Transcriptase Reversa (Multiscribe II). A reação foi realizada num Termociclador (Eppendorf), de acordo com o seguinte protocolo: 25°C por 10 minutos para o *primer annealing*, 48°C durante 1 hora para síntese e 95°C por 5 minutos para inativação da enzima, seguindo as

instruções do manual do produto. O qRT-PCR foi realizado num equipamento ABI PRISM série 7900 da Applied Biosystems, utilizando cerca de 10-100 ng de cDNA e o kit *Power SYBR Green PCR Master Mix* da Applied Biosystems, na presença de 0,5 μ M de *primers* “forward” (F) ou “reverse” (R). Os *primers* foram desenhados utilizando o programa PrimerExpress (da Applied Biosystems). A reação de RT-PCR foi realizada com o seguinte protocolo: 50°C por 2 minutos (incubação), 95°C por 10 minutos (ativação da Taq polimerase), seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 1 minuto. Para cada amostra, a expressão dos genes foi quantificada utilizando uma curva-padrão de cDNA de lisado celular total. Os resultados foram normalizados pela expressão de genes “padrões” (*housekeeping genes*) de β -actina (ACTB).

4.13. DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA BHE

A permeabilidade da BHE ao corante de baixo peso molecular, fluoresceína de sódio, foi avaliada no córtex pré-frontal, hipocampo e bulbo olfatório dos camundongos. Os animais foram anestesiados com isoflurano e a fluoresceína de sódio 4% (4 mL/kg) foi injetada na veia peniana. Após 30 minutos da administração, os animais foram anestesiados com a solução de hidrato de cloral (40%) e posteriormente perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%) e as estruturas cerebrais dissecadas e processadas para análise da concentração de fluoresceína de sódio (Hawkins et al., 2007; Bohara et al., 2014).

4.14. ENSAIOS *IN VITRO*

4.14.1. Preparo da LDL humana

A fração LDL foi purificada a partir de plasma humano proveniente do banco de sangue do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Os procedimentos experimentais para utilização de plasma humano e isolamento da LDL foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos desta Universidade (parecer 943/10, FR 363814).

O isolamento da LDL foi realizado por ultracentrifugação de gradiente de densidade descontínua, conforme descrito por Silva e colaboradores (1998). Ao plasma foi adicionado EDTA 1 mg/mL e sacarose 0,5% para evitar a agregação de LDL. Cinco mL de plasma-EDTA foi ajustado a uma densidade de 1,22 g/mL com KBr 0,326 g/mL, e em seguida foi adicionado NaCl 1,006 g/mL. A ultracentrifugação foi

executada a 191.000 g por 2 horas a 4 °C em ultracentrífuga Hitachi Himac CP80WX, rotor 40ST. Após este processo, a camada contendo LDL (porção superior) foi coletada e dialisada (25 x 16 mm) durante 16 horas a 4°C em PBS 148 mM (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 136mm, pH 7,4). O teor de proteína da LDL isolada foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951).

4.14.2. Determinação da polaridade neuronal

Para análise da polaridade neuronal foi realizada a técnica de imunofluorescência utilizando marcadores para actina e tubulina. Após o tratamento com a LDL plasmática 50 µg/mL durante 24 horas, o meio de cultura foi retirado e os neurônios foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 20 minutos. Em seguida, os neurônios foram lavados com PBS 0,1 M e, então, bloqueados com 5% de soro de cavalo diluído em PBS 0,1 M contendo 2% de Triton X-100, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo primário de camundongo anti-tubulina e a sonda rodamina faloidina (marcador de actina) em 1% de soro de cavalo diluído em PBS 0,1 M contendo 0,5% de Triton X-100 durante 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens em PBS 0,1 M, as células foram incubadas com o anticorpo anti-camundongo Alexa fluor 488 em 1% de soro de cavalo diluído em PBS 0,1 M contendo 0,5% de Triton X-100, durante 1 hora à temperatura ambiente. Para finalizar, as células foram lavadas três vezes com PBS 0,1 M e montadas em lâminas com meio de montagem CC/mount (Kunda et al., 2001). As imagens foram capturadas em um microscópio confocal Olympus FV 1000 e examinadas com o software Image J.

4.15. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM). No teste de realocação de objeto, reconhecimento do objeto e alternância espontânea, o teste t de *Student* foi utilizado para avaliar se o índice de localização, índice de discriminação e a porcentagem de alternâncias foram diferentes de um valor teórico de 50% (i.e., nível de chance).

As demais comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de *Student*, ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias. Na sessão resultados, os testes estatísticos realizados estão explicitados de acordo com cada metodologia experimental. Quando significante as

ANOVAs, múltiplas comparações *post hoc* foram feitas utilizando o teste de Duncan. O nível de significância adotado em todos os experimentos foi $p \leq 0.05$. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica®. As estatísticas estão também descritas nas legendas das respectivas figuras.

5. RESULTADOS

5.1. EXPERIMENTO 1: Camundongos LDLr^{-/-} são mais susceptíveis a neurotoxicidade induzida pela injeção i.c.v. do A β ₁₋₄₀?

Diversas evidências vêm demonstrando o envolvimento do receptor de LDL no metabolismo e depuração do A β cerebral. É importante mencionar que a remoção contínua do A β do cérebro para o sangue é importante para prevenir o acúmulo potencialmente neurotóxico deste peptídeo (Kim et al., 2009; Castellano et al., 2012). Por outro lado, a hipercolesterolemia tem sido considerada um possível fator desencadeador do acúmulo de A β no SNC (Sparks et al., 1994; Refollo et al., 2001). Nesse sentido, a primeira hipótese deste estudo foi que camundongos LDLr^{-/-}, um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana, são mais susceptíveis a neurotoxicidade induzida pela injeção i.c.v. do A β ₁₋₄₀ que camundongos selvagens da mesma idade. Para testar esta hipótese, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de 5 meses de idade foram tratados com o A β ₁₋₄₀ ou com a solução veículo PBS intracerebroventricularmente. Primeiramente, a memória espacial de referência foi avaliada por meio do teste de realocação do objeto. Como demonstrado na Figura 14A, somente os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com PBS apresentaram um índice de localização significativamente maior que um valor teórico de 50% (i.e., nível de chance). Por outro lado, os camundongos selvagens tratados com A β ₁₋₄₀ e os camundongos LDLr^{-/-} (independentemente da administração do A β ₁₋₄₀) não foram capazes de identificar a mudança espacial no campo aberto, caracterizando prejuízo de aprendizado e memória espacial.

Ademais, a memória operacional foi avaliada por meio do teste de alternância espontânea realizado no labirinto em “T”. Como demonstrado na Figura 14B, somente os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com a solução PBS mostraram uma porcentagem de alternâncias espontâneas significativamente maior que o valor teórico de 50%, enquanto os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com A β ₁₋₄₀ e os camundongos LDLr^{-/-} (independentemente da administração do A β ₁₋₄₀) apresentaram um índice de alternâncias espontâneas similar a 50%. Posteriormente foi realizado o teste do labirinto em cruz elevado. O labirinto em cruz elevado é o teste mais utilizado para avaliar o comportamento do “tipo ansioso” em roedores (Rodgers et al., 2010). Todavia, o reteste (24 horas após) dos animais no labirinto em cruz elevado está associado com mudanças comportamentais indicativas de aprendizagem aversiva (Rodgers et al., 1996). Como demonstrado na

Figura 14C, não foram observadas diferenças na porcentagem de entradas nos braços abertos entre o Dia 1 e o Dia 2 no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos LDLr^{-/-} tratados com A β ₁₋₄₀, caracterizando déficit cognitivo. Em contraste, em camundongos C57BL/6 selvagens tratados com PBS ou A β ₁₋₄₀ bem como em camundongos LDLr^{-/-} tratados com PBS foi observada uma diminuição significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos entre o Dia 1 e Dia 2.

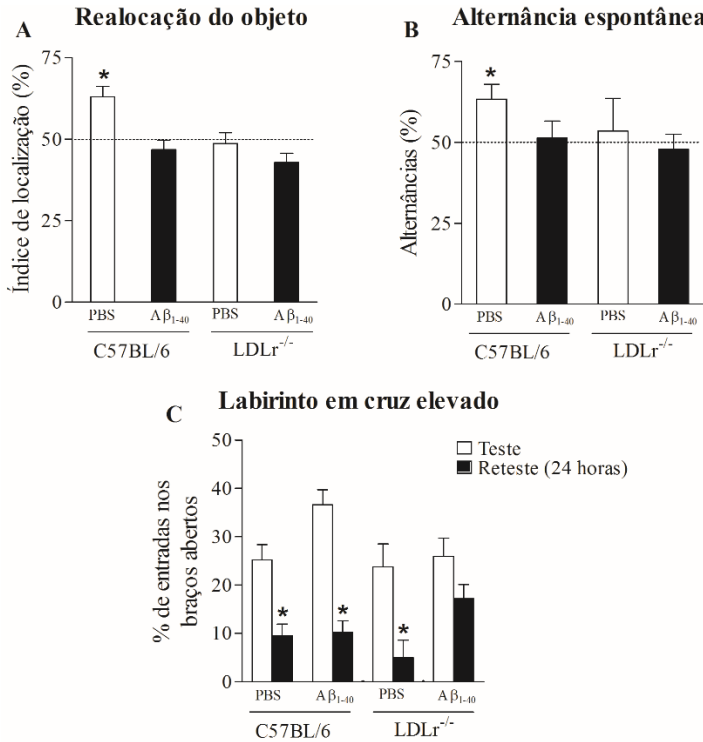


Figura 14. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀ sobre a cognição de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} nos testes (A) realocação do objeto, (B) alternância espontânea e (C) labirinto em cruz elevado. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (8 animais/grupo). O teste “*t*” foi utilizado para a análise do teste de realocação do objeto e alternância espontânea para determinar se o índice de localização e a porcentagem de alternâncias diferiam significativamente de um valor teórico de 50% (i.e., nível de chance). O teste “*F*” também foi utilizado para análise do teste do labirinto em cruz elevado. **p*<0,05 versus 50% (realocação do objeto e alternância espontânea) e versus Dia 1 (labirinto em cruz elevado).

Os níveis de colesterol total e colesterol não-HDL dos camundongos C57BL/6 do tipo selvagens e LDLr^{-/-} estão apresentados na Tabela 1. Como esperado, os níveis de colesterol total e de colesterol não-HDL foram significativamente maiores nos camundongos LDLr^{-/-} quando comparados com os camundongos selvagens.

Tabela 2. Hipercolesterolemia em camundongos LDLr^{-/-}. Avaliação dos níveis plasmáticos de colesterol não-HDL e colesterol total em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}.

	Colesterol não-HDL (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)
C57BL/6 PBS	47,40±4,19	121,20±2,35
C57BL/6 Aβ ₁₋₄₀	36,85±6,12	115,60±3,49
LDLr ^{-/-} PBS	112,70±3,89*	234,00±6,82*
LDLr ^{-/-} Aβ ₁₋₄₀	125,60±11,10 [#]	231,90±15,26 [#]

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (7 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da linhagem para os níveis de colesterol não-HDL [F(1,24)=130,84, p<0,05] e para os níveis de colesterol total [F(1,24)=163,94, p<0,05]. *p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com PBS e [#]p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com Aβ₁₋₄₀.

Tendo em vista a estreita relação entre a disfunção do sistema colinérgico e déficits de memória espacial de referência e operacional (Deiana et al., 2011), nós avaliamos a atividade da AChE, enzima que hidrolisa e inativa a acetilcolina regulando as concentrações deste neurotransmissor nas sinapses (Soreq e Seidman, 2001), no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos. Camundongos LDLr^{-/-} tratados com Aβ₁₋₄₀ apresentaram um aumento significativo na atividade da AChE no hipocampo em comparação com os camundongos LDLr^{-/-} tratados com a solução veículo, bem como, em comparação aos camundongos selvagens tratados com Aβ₁₋₄₀ (Figura 15B). Por outro lado, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais na atividade da AChE no córtex pré-frontal dos camundongos (Figura 15A).

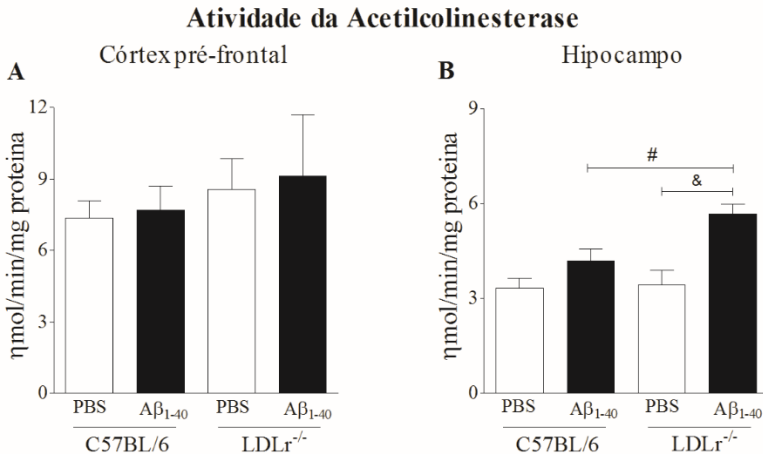


Figura 15. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do Aβ₁₋₄₀ na atividade da AChE de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no (A) córtex pré-frontal e (B) hipocampo. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (4 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da linhagem [F(1,12)=4,39, p<0,05] e do tratamento [F(1,12)=16,87, p<0,05] na atividade da AChE no hipocampo. #p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com Aβ₁₋₄₀ e &p<0,05 comparado com camundongos LDLr^{-/-} tratados com PBS.

Considerando que, (i) a GSH desempenha papel fundamental na proteção celular contra o estresse oxidativo, principalmente no SNC (Dringen e Hirrlinger, 2003), e que (ii) trabalhos anteriores têm demonstrado que o sistema antioxidante vinculado à GSH pode ser ativado como resposta ao estresse oxidativo em cérebros de pacientes com doença de Alzheimer (Lovell et al., 1995) como também de roedores tratados com Aβ (Prediger et al., 2007); nós investigamos os níveis de GSH e a atividade da GPx e GR no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos. De maneira geral, a ausência do receptor de LDL resultou em um comprometimento no sistema antioxidante vinculado à GSH, aqui demonstrado pela redução na concentração de GSH e nas atividades de GPx e GR no córtex pré-frontal (Figura 16A, C e E) e no hipocampo (Figura 16B, D e F) dos camundongos LDLr^{-/-}. Paralelamente, o tratamento de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem com o Aβ₁₋₄₀ também diminuiu significativamente os níveis de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR no córtex pré-frontal (Figura 16A, C e

E) e hipocampo (Figura 16B, D e F). De modo notável, a administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀ em camundongos LDLr^{-/-} levou a um aumento significativo no conteúdo de GSH e na atividade da GPx no córtex pré-frontal (Figura 16A e C) e hipocampo (Figura 16B e D) em comparação aos camundongos C57BL/6 selvagens tratados com A β ₁₋₄₀ e LDLr^{-/-} tratados com PBS.

Sistema antioxidante vinculado à glutatona

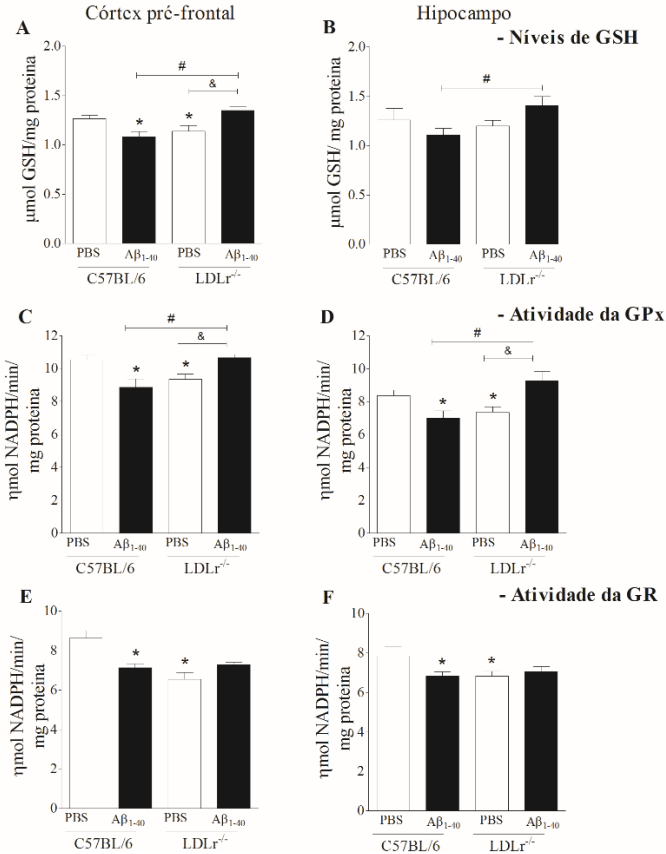


Figura 16. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ sobre o sistema antioxidante vinculado à GSH de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no córtex pré-frontal e hipocampo. (A e B) Níveis de GSH, (C e D) Atividade da GPx e (E e F) Atividade da GR. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (7 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da interação entre linhagem e tratamento nos níveis de GSH [F(1,24)=17,54, p<0,05; F(1,24)=4,12, p<0,05] e na atividade da GPx [F(1,24)=19,11, p<0,05; F(1,24)=23,65, p<0,05] e GR [F(1,24)=16,34, p<0,05; F(1,24)=7,40, p<0,05] no córtex pré-frontal e no hipocampo respectivamente. *p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com PBS, #p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com $A\beta_{1-40}$ e &p<0,05 comparado com camundongos LDLr^{-/-} tratados com PBS.

A atividade da SOD e os níveis de espécies reativas também foram aferidos no córtex pré-frontal e hipocampo dos grupos experimentais. A administração i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ diminuiu significativamente a atividade da SOD no hipocampo dos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (Figura 17B). Além disso, os camundongos LDLr^{-/-} tratados com PBS apresentaram uma forte tendência ($p=0,10$) de diminuição na atividade da SOD no hipocampo. Por outro lado, os camundongos LDLr^{-/-} tratados com $A\beta_{1-40}$ apresentaram um aumento significativo na atividade da SOD no hipocampo (Figura 17B). No córtex pré-frontal não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos estudados na atividade da SOD (Figura 17A). No que diz respeito aos níveis de espécies reativas, os camundongos C57BL/6 tratados com $A\beta_{1-40}$ apresentaram um aumento significativo nos níveis de espécies reativas em ambas estruturas cerebrais estudadas (Figura 17C e D). Além disso, os camundongos LDLr^{-/-} (independentemente do tratamento com $A\beta_{1-40}$) apresentaram um aumento significativo nos níveis de espécies reativas no córtex pré-frontal e hipocampo em comparação com os camundongos C57BL/6 selvagens tratados com a solução PBS (Figura 17C e D).

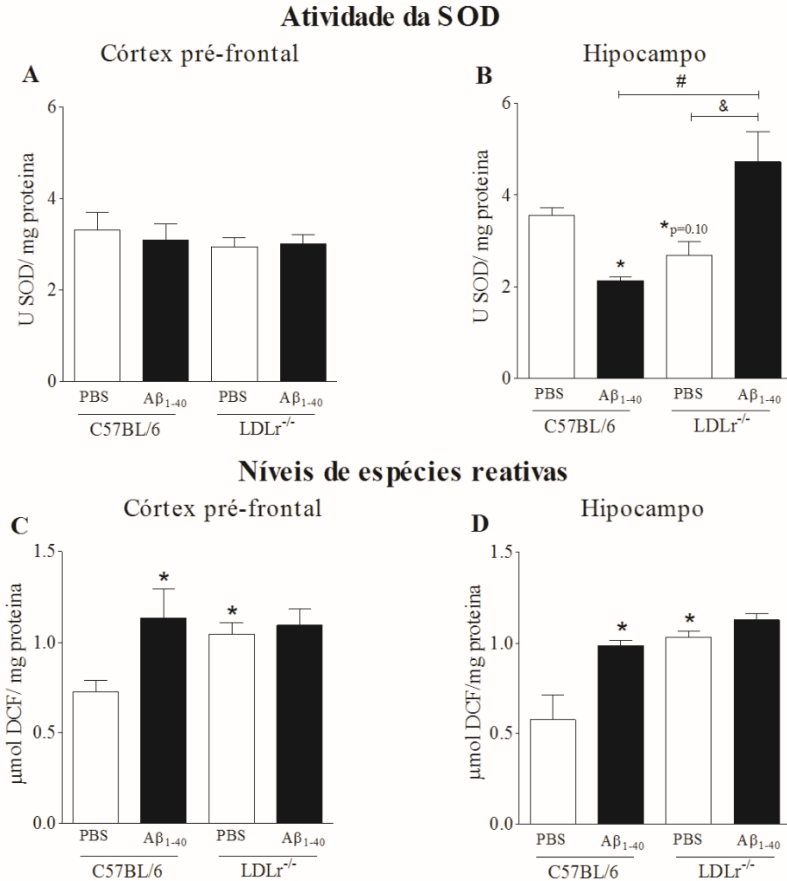


Figura 17. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do Aβ₁₋₄₀ na atividade da SOD e nos níveis de espécies reativas de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no (A e C) córtex pré-frontal e (B e D) hipocampo. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (7 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da interação entre linhagem e tratamento [F(1,24)=22,02, p<0,05] na atividade da SOD no hipocampo, do tratamento [F(1,24)=5,08, p<0,05] nos níveis de espécies reativas no córtex pré-frontal, e da interação entre linhagem e tratamento [F(1,24)=6,39, p<0,05] nos níveis de espécies reativas no hipocampo. *p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com PBS, #p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com Aβ₁₋₄₀ e &p<0,05 comparado com camundongos LDLr^{-/-} tratados com PBS.

Considerando a habilidade do A β em desencadear ativação glial e consequentemente uma reação neuroinflamatória intensa (Vehmas et al., 2003), nós também investigamos o imunoconteúdo da proteína GFAP (utilizada como marcador de astrogliose) no hipocampo dos camundongos. Os camundongos C57BL/6 tratados com A β_{1-40} apresentaram uma forte tendência ($p=0,09$) de aumento na imunorreatividade para a GFAP. Por outro lado, também observamos uma forte tendência ($p=0,06$) de aumento na imunorreatividade para a GFAP nos camundongos LDLr^{-/-} tratados com PBS. De modo notório, observamos um aumento significativo na imunorreatividade para a GFAP no hipocampo dos camundongos LDLr^{-/-} tratados com A β_{1-40} comparados com os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com A β_{1-40} e LDLr^{-/-} tratados com a solução veículo (Figura 18C). Especificamente, na Figura 18B pode-se observar a abundante astrogliose apresentada nos camundongos LDLr^{-/-} tratados com A β_{1-40} .

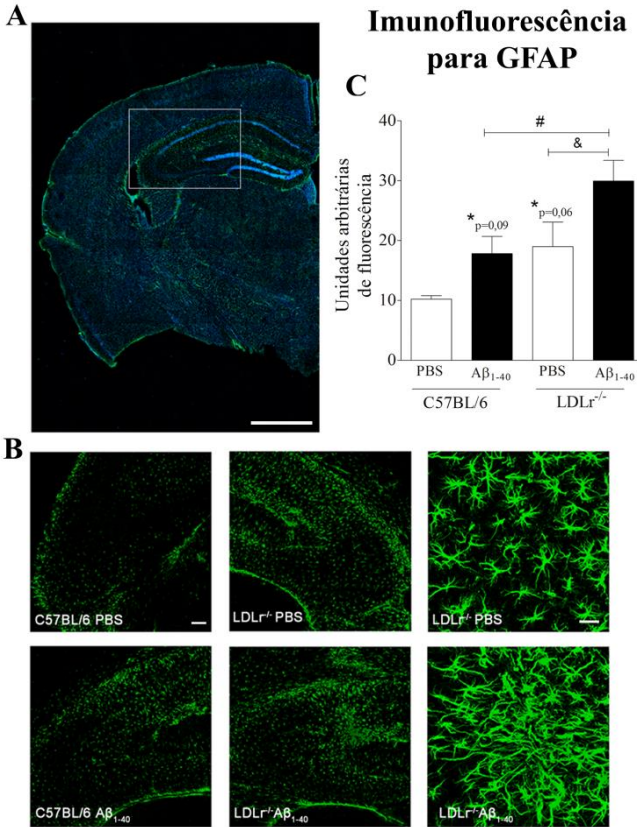


Figura 18. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do A β_{1-40} na imunorreatividade para GFAP em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no hipocampo. As imagens seriais de imunofluorescência para a proteína GFAP (verde) foram obtidas com um microscópio confocal Olympus FV-10i. (A) Localização no hipocampo das áreas adotadas para as imagens representativas, barra de escala = 1000 μ m. (B) Imagens representativas dos grupos experimentais, barra de escala = 100 μ m e 20 μ m. (C) Quantificação da densidade de marcação positiva para a GFAP. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (5 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da linhagem [F(1,16)=11,90, $p<0,05$] e do tratamento [F(1,16)=9,40, $p<0,05$] na imunorreatividade para a GFAP no hipocampo. * $p<0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com PBS, # $p<0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com A β_{1-40} e & $p<0,05$ comparado com camundongos LDLr^{-/-} tratados com PBS.

Em seguida, utilizamos a AQP-4, um canal de água expresso primariamente nos processos astrocíticos (Nagelhus et al., 2004), como um biomarcador de aumento de permeabilidade da BHE (Nicchia et al., 2004). Um aumento significativo na imunorreatividade para a AQP-4 foi observado no hipocampo dos camundongos $LDLr^{-/-}$, independentemente do tratamento com $A\beta_{1-40}$ (Figura 19A e B).

Imunofluorescência para AQP-4

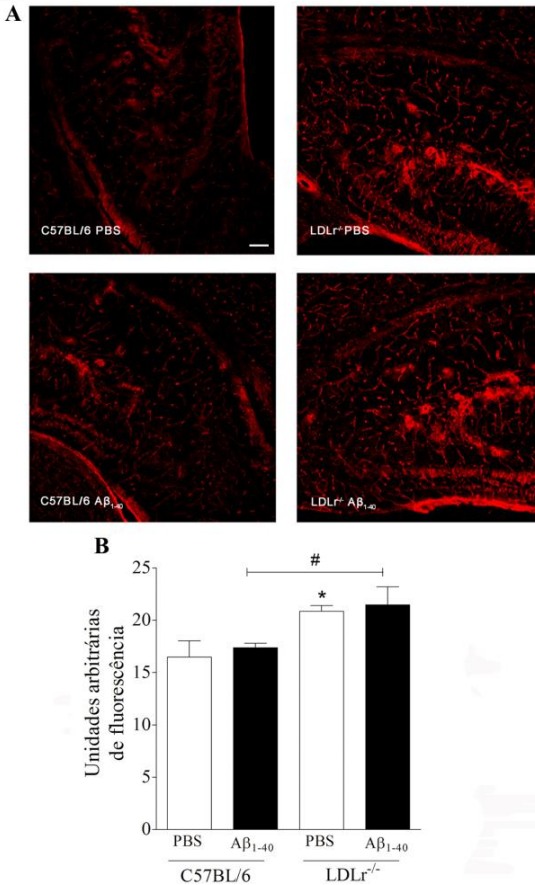


Figura 19. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do A β_{1-40} na imunorreatividade para AQP-4 em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no hipocampo. As imagens seriais de imunofluorescência para a proteína AQP-4 (vermelho) foram obtidas com um microscópio confocal Olympus FV-10i. (A) Imagens representativas dos grupos experimentais, barra de escala = 100 μ m. (B) Quantificação da densidade de marcação positiva para AQP-4. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (5 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da linhagem [F(1,16)=8,69, $p < 0,05$] na imunorreatividade para a AQP-4 no hipocampo. * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com PBS e # $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com A β_{1-40} .

Estudos anteriores demonstraram alterações na permeabilidade das membranas celulares após administração central do A β (Piermartiri et al., 2010). Nesse sentido, realizamos o ensaio de captação de iodeto de propídeo em fatias hipocâmpais obtidas de camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-} após a injeção i.c.v. de A β ₁₋₄₀. O tratamento com o A β ₁₋₄₀ aumentou a captação do iodeto de propídeo no hipocampo de camundongos C57BL/6 selvagens (Figura 20A e B). Além disso, camundongos LDLr^{-/-} tratados com a solução PBS apresentaram um aumento na captação de iodeto de propídeo em comparação com os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com PBS, indicando uma alta permeabilidade das células hipocâmpais como uma consequência da ausência do receptor de LDL (Figura 20A e B). De modo interessante, observamos um aumento significativo na captação de iodeto de propídeo em camundongos LDLr^{-/-} tratados com A β ₁₋₄₀ em comparação com os camundongos selvagens tratados com A β ₁₋₄₀ e com os LDLr^{-/-} tratados com PBS (Figura 20A e B).

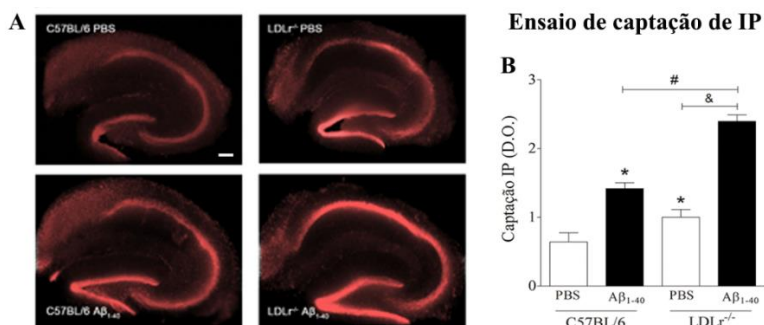


Figura 20. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀ na permeabilidade celular analisada por meio do ensaio de captação de iodeto de propídeo (IP) em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no hipocampo. (A) Imagens representativas dos grupos experimentais, barra de escala = 100 μ m. (B) Quantificação da área onde a fluorescência de IP foi detectada por meio de análise densitométrica. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (4 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da interação entre linhagem e tratamento [F(1,12)=8,24, p<0,05] na captação de IP no hipocampo. *p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com PBS, #p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com A β ₁₋₄₀ e &p<0,05 comparado com camundongos LDLr^{-/-} tratados com PBS.

Para finalizar este primeiro desenho experimental, com o objetivo de investigar a presença de placas amiloides no hipocampo dos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e $LDLr^{-/-}$ após a infusão do $A\beta_{1-40}$ realizamos a coloração por Tioflavina-S. Por meio da análise de microscopia confocal nós observamos a ausência de placas amiloides no hipocampo dos camundongos dos diferentes grupos experimentais estudados (Figura 21).

Coloração para placas amiloides

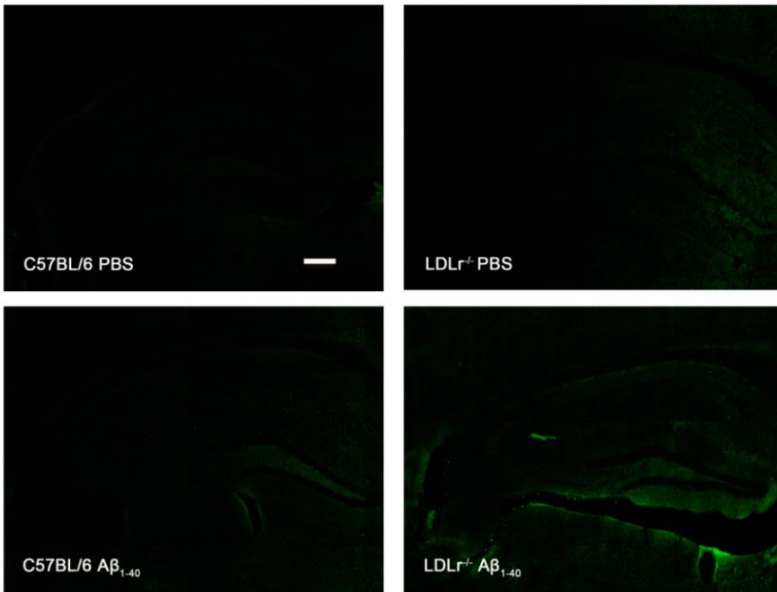


Figura 21. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e administração i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ na formação de placas amiloides analisadas por meio da coloração por Tioflavina-S em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e $LDLr^{-/-}$ no hipocampo. As imagens seriais da coloração por Tioflavina-S (verde) foram obtidas com um microscópio confocal Olympus FV-10i (4 animais/grupo). Imagens representativas dos grupos experimentais, barra de escala = 1000 μ m.

5.2. EXPERIMENTO 2: Os prejuízos cognitivos nos camundongos LDLr^{-/-} jovens e de “meia-idade” estão associados com alterações no metabolismo do A β e em proteínas anti- e pró-apoptóticas?

Em um trabalho anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, corroboramos experimentalmente os achados clínicos de Daniel Zambon (2010), indicando os camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade” (quatorze meses) como um modelo animal de CCL. Observamos que o envelhecimento está relacionado a uma intensificação dos prejuízos cognitivos nos camundongos LDLr^{-/-}, que aos quatorze meses apresentaram prejuízos cognitivos em todos os testes realizados (testes de memória operacional, de referência espacial e procedural) (Moreira et al., 2012). Nesse sentido, no desenho experimental 2, objetivamos verificar se os prejuízos cognitivos presentes nos camundongos LDLr^{-/-} jovens e de “meia-idade” estão associados com alterações na expressão gênica cerebral de proteínas envolvidas no processamento e metabolismo do A β e no processo apoptótico. Para este fim, foram utilizados camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} adultos jovens (três meses) e de “meia-idade” (quatorze meses).

O LRP-1, receptor membro da família dos receptores de LDL, é também responsável pelo efluxo de A β através da BHE (Zlokovic, 2004). Considerando que pacientes com doença de Alzheimer esporádica parecem apresentar prejuízo na depuração de A β do SNC para a circulação sanguínea (Kanekiyo et al., 2013), e que em modelos experimentais de doença de Alzheimer a expressão do LRP-1 na BHE está diminuída (Deane et al., 2009), neste trabalho nós investigamos os níveis de RNAm deste receptor no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos. De maneira geral, os nossos resultados mostraram que tanto o envelhecimento como a ausência do receptor de LDL modularam diferentemente a expressão gênica do LRP-1 nas diferentes estruturas cerebrais analisadas dos camundongos (Figura 22). No córtex pré-frontal, a expressão gênica do LRP-1 foi reduzida nos camundongos LDLr^{-/-} jovens e nos camundongos selvagens de “meia-idade” ($p=0,07$) (Figura 22A). Já no hipocampo, observamos um aumento significativo na expressão gênica do LRP-1 nos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem decorrente do envelhecimento (Figura 22B). A falta do receptor de LDL também resultou no aumento significativo da expressão gênica de LRP-1 no hipocampo, independentemente da idade dos animais (Figura 22B).

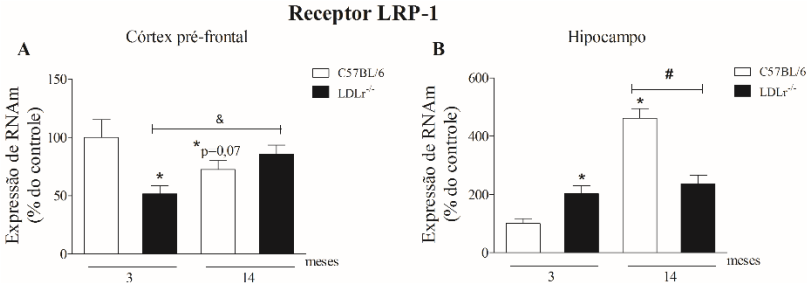


Figura 22. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e do envelhecimento na expressão gênica do LRP-1 em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no (A) córtex pré-frontal e no (B) hipocampo. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (6-8 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da interação entre linhagem e idade [F(1,28)=9,68, $p < 0,05$] na expressão gênica do LRP-1 no córtex pré-frontal e da interação entre linhagem e idade [F(1,26)=37,83, $p < 0,05$] na expressão gênica do LRP-1 no hipocampo. * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de 3 meses de idade, # $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de 14 meses de idade e & $p < 0,05$ comparado com camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses de idade.

Inúmeros estudos *in vitro* demonstraram que o colesterol parece modular diretamente o processamento da APP nas células neuronais (Bodovitz e Klein 1996; Simons et al., 1998; Frears et al., 1999; Eehalt et al., 2003). Neste estudo, nós analisamos parâmetros relacionados com o processamento da APP, i.e., a expressão gênica da APP, BACE-1 (β -secretase) e PS-1 (proteína componente do complexo enzimático γ -secretase), no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais. A Figura 23B mostra que o envelhecimento causou um aumento significativo nos níveis de RNAm da APP no hipocampo dos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, enquanto no hipocampo dos camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade” não foram observadas alterações na expressão gênica da APP. Já no córtex pré-frontal, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais na expressão gênica da APP (Figura 23A).

A modulação da expressão gênica da BACE-1 foi evidenciada somente no córtex pré-frontal. Nesta estrutura, a ausência do receptor de LDL induziu um aumento significativo nos níveis de RNAm da BACE-1 nos animais jovens (Figura 23C). No hipocampo não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais em relação à expressão gênica da BACE-1 (Figura 23D).

De maneira interessante, a expressão gênica da PS-1 aumentou significativamente em ambas estruturas cerebrais dos camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade” quando comparados com os camundongos C57BL/6 selvagens de mesma idade (Figura 23E e F). Por outro lado, o envelhecimento também desencadeou um aumento nos níveis de RNAm da PS-1 no hipocampo dos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (p=0,08) (Figura 23F).

Processamento do A β

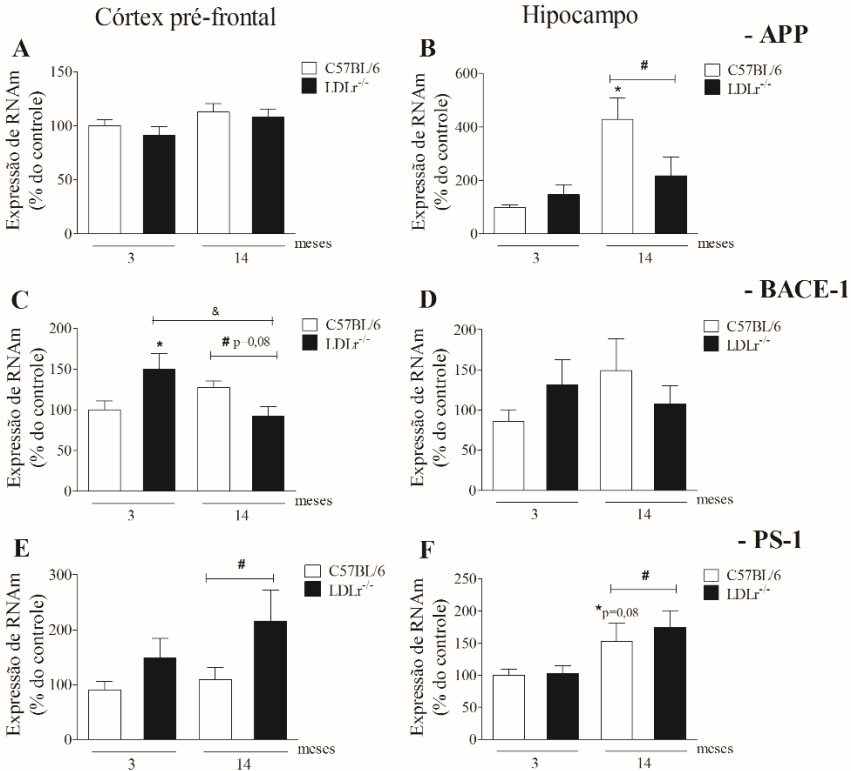


Figura 23. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e do envelhecimento na expressão gênica de proteínas envolvidas no processamento do A β : (A e B) APP, (C e D) BACE-1 e (E e F) PS-1 em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} no córtex pré-frontal e no hipocampo. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (6-8 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da interação entre linhagem e idade [F(1,26)=5,83, $p < 0,05$] na expressão gênica da APP no hipocampo, da interação entre linhagem e idade [F(1,28)=10,44, $p < 0,05$] na expressão gênica da BACE-1 no córtex pré-frontal, da linhagem [F(1,26)=5,43, $p < 0,05$] na expressão gênica da PS-1 no córtex pré-frontal, e do envelhecimento [F(1,26)=10,10, $p < 0,05$] na expressão gênica da PS-1 no hipocampo. * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de 3 meses de idade, # $p < 0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de 14 meses de idade e & $p < 0,05$ comparado com camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses de idade.

Acredita-se que a degeneração neuronal característica na doença de Alzheimer é em parte mediada por processos apoptóticos induzidos pelo A β (Shimohama, 2000). Nesse sentido, nós também analisamos a expressão gênica de proteínas pertencentes à família Bcl-2: Bcl-2 e Bax. De maneira interessante, já aos três meses de idade, os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram uma diminuição significativa na razão Bcl-2/Bax (níveis de RNAm) em ambas estruturas cerebrais estudadas quando comparados com os camundongos selvagens de mesma idade (Figura 24A e B). Além disso, também observamos que o envelhecimento diminuiu significativamente a razão Bcl-2/Bax (níveis de RNAm) no córtex pré-frontal dos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de “meia-idade” (Figura 24A).

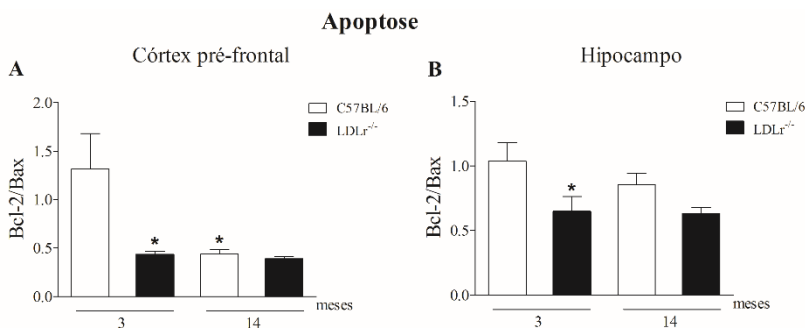


Figura 24. Efeitos da ausência do receptor de LDL/hipercolesterolemia e do envelhecimento na razão Bcl-2/Bax (expressão gênica) no (A) córtex pré-frontal e (B) hipocampo de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (6-8 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da interação entre linhagem e idade [$F(1,28)=5,00$, $p<0,05$] na razão Bcl-2/Bax no córtex pré-frontal e da linhagem [$F(1,26)=7,91$, $p<0,05$] na razão Bcl-2/Bax no hipocampo. * $p<0,05$ comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de 3 meses de idade.

5.3. EXPERIMENTO 3: Os prejuízos cognitivos e alterações na BHE em camundongos LDLr^{-/-} são potencializados por uma dieta hipercolesterolêmica?

No desenho experimental 3, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de três meses de idade foram expostos à uma dieta hipercolesterolêmica por trinta dias. O objetivo específico neste desenho experimental foi exacerbar os níveis de colesterol plasmático dos

camundongos LDLr^{-/-} e avaliar se os prejuízos cognitivos e a disfunção da BHE já observados nestes camundongos seriam potencializados.

Primeiramente, a atividade locomotora espontânea dos animais foi avaliada no teste do campo aberto. Os camundongos LDLr^{-/-} tratados com a dieta padrão apresentaram um número de cruzamentos totais no campo aberto significativamente maior quando comparados com camundongos C57BL/6 selvagens também tratados com dieta padrão (Figura 25A). Além disso, quando os camundongos LDLr^{-/-} foram tratados com a dieta hipercolesterolêmica o número de cruzamentos totais no campo aberto foi ainda maior (Figura 25A).

Em seguida, o teste de realocação do objeto foi utilizado novamente para avaliar a memória espacial de referência. Camundongos LDLr^{-/-} apresentaram prejuízo de memória espacial independentemente da dieta. Como demonstrado na Figura 25B, os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem apresentaram um índice de localização maior que um valor teórico de 50%, enquanto os camundongos LDLr^{-/-} tratados com a dieta padrão ou tratados com a dieta hipercolesterolêmica não foram capazes de identificar a alteração espacial no campo aberto. A dieta hipercolesterolêmica não causou déficits cognitivos nos camundongos C57BL/6 selvagens (Figura 25B).

Posteriormente, a memória espacial de referência também foi avaliada por meio do teste de reconhecimento do objeto. Como mostrado na Figura 25C, camundongos LDLr^{-/-} (independentemente da dieta) passaram um tempo significativamente maior explorando o objeto velho. Por outro lado, os camundongos C57BL/6 (independentemente da dieta) exploraram o objeto novo por um período de tempo significativamente maior, como indicado pelo aumento significativo no índice de reconhecimento em comparação com um valor teórico de 50% (Figura 25C). A memória operacional dos animais foi novamente avaliada por meio do teste de alternância espontânea. Camundongos LDLr^{-/-} (independente da dieta) apresentaram índices de alternâncias espontâneas similares ao valor teórico de 50%, enquanto os camundongos C57BL/6 tratados com dieta padrão ou com dieta hipercolesterolêmica não apresentaram prejuízo cognitivo neste teste comportamental, pois seus índices de alternâncias espontâneas foram significativamente maiores que 50% (Figura 25D).

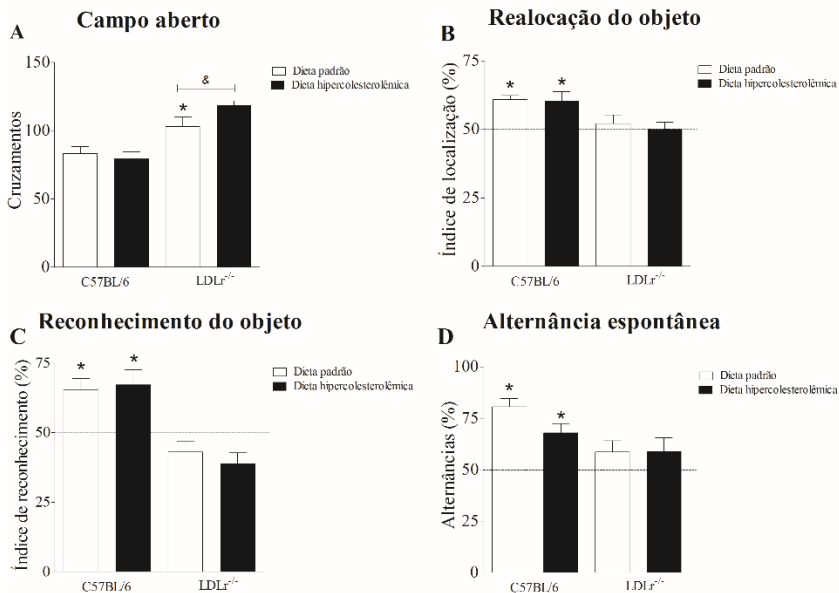


Figura 25. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica sobre a cognição e a atividade locomotora espontânea de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. (A) campo aberto, (B) teste de realocação do objeto, (C) teste de reconhecimento do objeto e (D) teste de alternância espontânea. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (8 animais/grupo). Os resultados da análise da locomoção espontânea foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da linhagem [$F(1,28)=30,24$, $p<0,05$] na atividade locomotora. O teste “*t*” foi utilizado para a análise do teste de realocação do objeto, reconhecimento do objeto e alternância espontânea, para determinar se o índice de localização, o índice de reconhecimento e a porcentagem de alternâncias diferiam significativamente de um valor teórico de 50% (i.e., nível de chance). * $p<0,05$ versus camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com dieta padrão (atividade locomotora) e versus 50% (realocação do objeto, reconhecimento do objeto e alternância espontânea), & $p<0,05$ versus camundongos LDLr^{-/-} tratados com dieta padrão (atividade locomotora).

Por fim, a aprendizagem aversiva dos camundongos foi novamente avaliada no reteste do labirinto em cruz elevado. Em todos os grupos experimentais foi observada uma diminuição significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos entre o Dia 1 e Dia 2, caracterizando o aprendizado da tarefa (Figura 26).

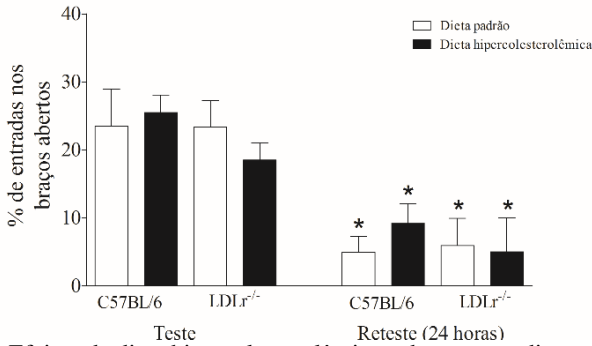


Figura 26. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica sobre a aprendizagem aversiva, no reteste do labirinto em cruz elevado, de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (8 animais/grupo). O teste “*t*” foi utilizado. **p*<0,05 versus Dia 1 (teste).

Os níveis de colesterol plasmático total e de colesterol não-HDL dos camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-} estão demonstrados na Figura 27. Os níveis de colesterol total e de colesterol não-HDL dos camundongos LDLr^{-/-} tratados com dieta padrão foram significativamente maiores quando comparados com os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (Figura 27A e B). Ademais, quando os camundongos LDLr^{-/-} foram tratados com uma dieta hipercolesterolêmica, os níveis de colesterol total e de colesterol não-HDL foram maiores em comparação aos camundongos LDLr^{-/-} tratados com uma dieta padrão, bem como em comparação aos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem expostos à dieta hipercolesterolêmica. Por outro, os níveis de colesterol total e colesterol não-HDL nos camundongos C57BL/6 não foram modificados significativamente pela dieta hipercolesterolêmica (Figura 27A e B). No entanto, é importante destacar que houve um aumento de aproximadamente 16% nos níveis plasmáticos de colesterol total nos camundongos selvagens quando foram tratados com uma dieta hipercolesterolêmica (Figura 27C).

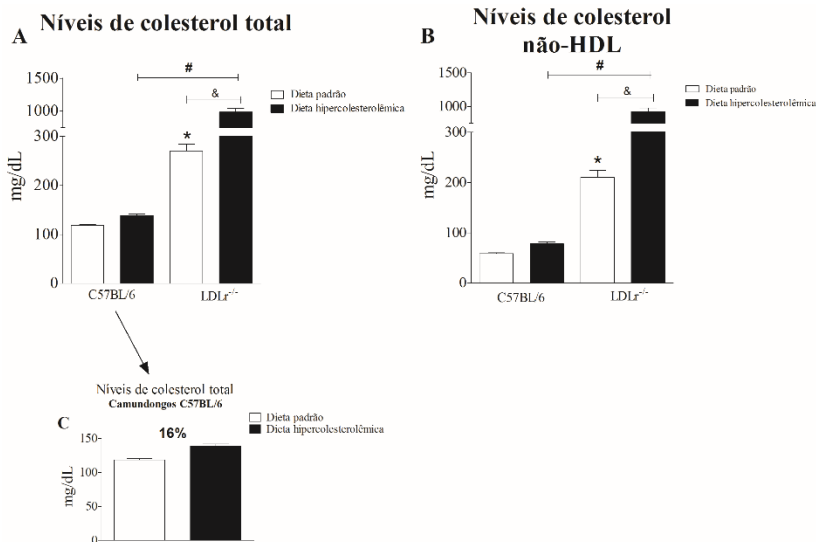


Figura 27. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica nos níveis plasmáticos de (A) colesterol total e (B) colesterol não-HDL em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} e (C) de colesterol total nos camundongos C57BL/6 selvagens. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (5 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da interação entre linhagem e dieta nos níveis plasmáticos de colesterol total [F(1,16)=152,78, $p < 0,05$] e de colesterol não-HDL [F(1,16)=139,47, $p < 0,05$]. * $p < 0,05$ versus camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com dieta padrão, # $p < 0,05$ versus camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com dieta hipercolesterolêmica e & $p < 0,05$ versus camundongos LDLr^{-/-} tratados com dieta padrão.

Considerando que alterações metabólicas e disfuncionais na BHE e a consequente neuroinflamação parecem preceder o aumento na produção e deposição de A β induzida pela hipercolesterolemia (Ghribi et al., 2006; Ullrich et al., 2010), a permeabilidade da BHE foi avaliada nos camundongos através do ensaio da fluoresceína de sódio (um composto que normalmente não ultrapassa a BHE). Como demonstrado na Figura 28 os camundongos LDLr^{-/-} tratados com a dieta padrão apresentaram um aumento na permeabilidade ao corante de baixo peso molecular fluoresceína de sódio no córtex pré-frontal ($p = 0,09$) (Figura 28A) e no hipocampo (Figura 28B) quando comparados aos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem também tratados com a dieta padrão. Ademais, a dieta hipercolesterolêmica desencadeou um aumento do

extravasamento da fluoresceína de sódio no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos C57BL/6 selvagens e dos camundongos LDLr^{-/-}. No caso dos LDLr^{-/-} tratados com a dieta hipercolesterolêmica o aumento na permeabilidade da BHE nestas estruturas cerebrais foi significativamente maior que nos camundongos LDLr^{-/-} tratados com dieta padrão e que os camundongos selvagens tratados com a dieta hipercolesterolêmica (Figura 28A e B). Em relação ao bulbo olfatório, os camundongos LDLr^{-/-} (independentemente da dieta) apresentaram aumento na permeabilidade da BHE à fluoresceína de sódio (Figura 28C).

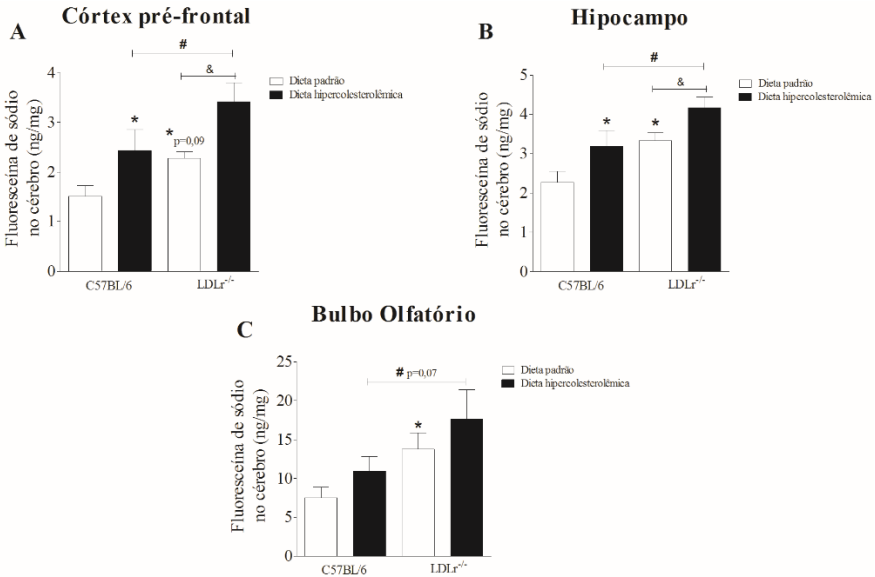


Figura 28. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica na permeabilidade da BHE à fluoresceína de sódio no (A) córtex pré-frontal, (B) hipocampo e (C) bulbo olfatório em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (6-7 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da linhagem [$F(1,24)=7,99$, $p<0,05$] e da dieta [$F(1,24)=11,08$, $p<0,05$] na permeabilidade da BHE à fluoresceína de sódio no córtex pré-frontal, da linhagem [$F(1,23)=10,96$, $p<0,05$] e da dieta [$F(1,23)=8,18$, $p<0,05$] na permeabilidade da BHE à fluoresceína de sódio no hipocampo e da linhagem [$F(1,24)=7,14$, $p<0,05$] na permeabilidade da BHE à fluoresceína de sódio no bulbo olfatório. * $p<0,05$ versus camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com dieta padrão, # $p<0,05$ versus camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com dieta hipercolesterolêmica, & $p<0,05$ versus camundongos LDLr^{-/-} tratados com dieta padrão.

A BHE é formada principalmente pelas junções oclusivas presentes entre as células endoteliais dos capilares que perfundem o parênquima cerebral (Weiss et al., 2009). Nós também avaliamos a expressão gênica das proteínas integrantes das junções oclusivas, claudina-5 e ocludina, no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos. De modo interessante, os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram uma diminuição nos níveis de RNAm de ambas as proteínas integrantes junções oclusivas no hipocampo (Figura 29B e D). A exposição à dieta hipercolesterolêmica nos camundongos C57BL/6 selvagens causou uma diminuição nos níveis de RNAm de claudina-5 e ocludina no hipocampo (Figura 29B e D). Em contraste, a dieta hipercolesterolêmica nos camundongos LDLr^{-/-} desencadeou um aumento na expressão gênica hipocampal proteínas integrantes das junções oclusivas em comparação aos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com a dieta padrão (Figura 29B e D). No córtex pré-frontal, não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica das proteínas integrantes das junções oclusivas estudadas (Figura 29A e C).

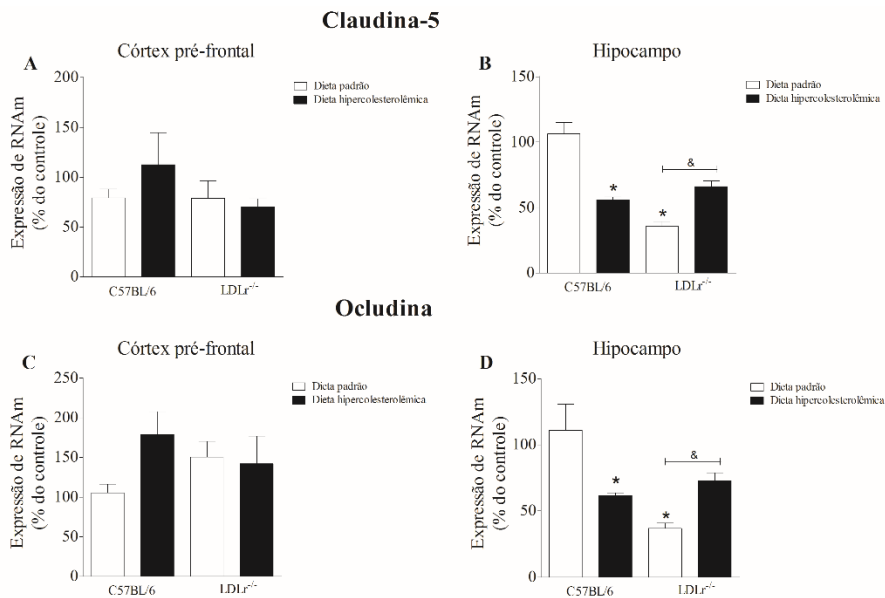


Figura 29. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica na expressão gênica da (A e B) claudina-5 e (C e D) ocludina no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (5 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da interação entre linhagem e dieta [F(1,16)=56,81, $p < 0,05$] na expressão gênica da claudina-5 no hipocampo e interação entre linhagem e dieta [F(1,16)=16,00, $p < 0,05$] na expressão gênica da ocludina no hipocampo. * $p < 0,05$ versus camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com dieta padrão e $\& p < 0,05$ versus camundongos LDLr^{-/-} tratados com dieta padrão.

5.4. EXPERIMENTO 4: Quais as consequências da exposição de células neuronais à LDL isolada humana?

A disfunção da BHE pode desencadear a entrada de partículas de LDL plasmáticas no SNC (Hui et al., 2012). Um número considerável de evidências demonstrou a presença de apoB100, apolipoproteína constituinte da LDL, em cérebros de animais hipercolesterolêmicos (Chen et al., 2010; Löffler et al., 2013). Nesse sentido, nossa hipótese no desenho experimental 4 foi de que a exposição à LDL isolada humana modifica a homeostase de células neuronais. O desenvolvimento neuronal requer dramáticas mudanças morfológicas (Cáceres et al., 2012). A Figura 30 demonstra que neurônios de dia *in vitro* 0 expostos à

LDL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas, apresentaram diminuição do desenvolvimento neuronal do estágio 2 para o estágio 3 de polaridade, indicando que a exposição à LDL resulta na inibição da formação axonal. Enquanto, os neurônios não expostos à LDL desenvolveram até o estágio 3 de polaridade, estendendo um único e longo axônio e inúmeros neuritos curtos (Figura 30).

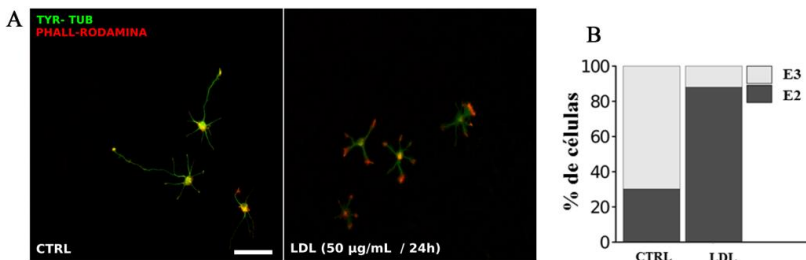


Figura 30. Efeitos da exposição à LDL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas no desenvolvimento de neurônios primários hipocâmpais. Marcação para actina (vermelho) e para tubulina (verde). (A) Imagens representativas, barra de escala = 100 μm . As imagens foram obtidas com um microscópio confocal Olympus FV-1000. (B) Quantificação da porcentagem de células no estágio 2 e estágio 3 de polaridade.

Ademais, os neurônios em estágio 3 de polaridade (dia *in vitro* 1) incubados 24 horas com LDL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram uma diminuição significativa no comprimento dos axônios (Figura 31).

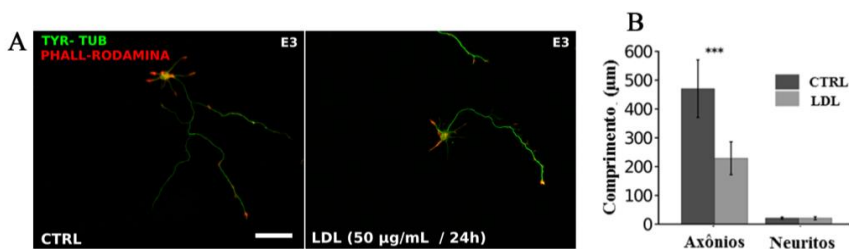


Figura 31. Efeitos da exposição à LDL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas no comprimento axonal em neurônios primários hipocâmpais em desenvolvimento. Marcação para actina (vermelho) e para tubulina (verde). (A) Imagens representativas, barra de escala = 100 μm . As imagens foram obtidas com um microscópio confocal Olympus FV-1000. (B) Quantificação do comprimento axonal dos neurônios no estágio 3 de polaridade. O teste "*t*" foi utilizado para a análise do comprimento axonal. * $p < 0,05$ versus neurônios controle.

5.5. EXPERIMENTO 5: Em busca de uma terapia capaz de aumentar a expressão do receptor de LDL ao nível cerebral.

Recentes estudos apontam o receptor de LDL como uma via importante na regulação dos níveis de A β cerebral e que o aumento nos níveis de receptor de LDL no cérebro pode promover a degradação do A β (Kim et al., 2009; Castellano et al., 2012). Nós hipotetizamos que o receptor de LDL possa ser um possível alvo terapêutico na doença de Alzheimer. Neste contexto, o quinto objetivo específico deste estudo foi avaliar se o composto Genfibrozila, um fibrato hipolipemiante, seria capaz de aumentar a expressão gênica do receptor de LDL no hipocampo e fígado de camundongos. Inicialmente, o efeito do Genfibrozila nos níveis plasmáticos de colesterol total nos camundongos foi investigado. Como ilustrado na Figura 32C, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de colesterol total entre os grupos experimentais. Além disso, o tratamento de trinta dias com o Genfibrozila (doses de 1,3; 13; 130 mg/kg) não foi capaz de alterar a expressão gênica do receptor de LDL no hipocampo de camundongos *Swiss* (Figura 32A). Enquanto no fígado, o Genfibrozila na dose de 1,3 mg/kg aumentou significativamente os níveis de RNAm do receptor de LDL (Figura 32B).

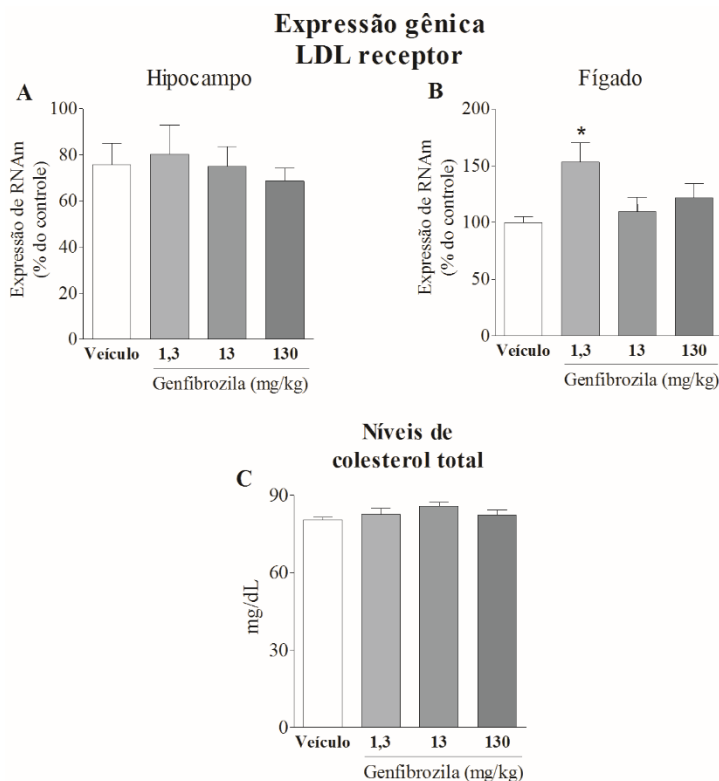


Figura 32. Efeito do tratamento com o Genfibrozila (1,3; 13 e 130 mg/kg) na expressão gênica do receptor de LDL (A) no hipocampo e (B) no fígado, (C) e nos níveis plasmáticos de colesterol total em camundongos *Swiss*. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (6 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste Duncan. * $p < 0,05$ versus camundongos *Swiss* tratados com a solução veículo.

6. DISCUSSÃO

Há mais de duas décadas o envolvimento da hipercolesterolemia na patofisiologia da doença de Alzheimer vem sendo intensamente estudado (Sparks et al., 1994; Kivipelto et al., 2001). Contudo, evidências mais recentes também indicam o envolvimento do receptor de LDL no metabolismo e depuração do A β cerebral (Castellano et al., 2012). Nesse sentido, a hipercolesterolemia familiar é uma condição que propicia uma observação única acerca da relação entre anormalidades na função do receptor de LDL e o posterior desenvolvimento da doença de Alzheimer: **os indivíduos afetados por esta condição apresentam redução funcional do receptor de LDL e, por conseguinte, níveis elevados de colesterol plasmático desde o nascimento.** Nessa linha de evidência, Daniel Zambon e colaboradores (2010) demonstraram que pacientes com hipercolesterolemia familiar de meia-idade (média de 50 anos de idade) apresentaram um aumento particular na incidência de CCL (Zambon et al., 2010). Nesse sentido, considerando os estudos prévios que evidenciaram que a falta do receptor de LDL resulta em detrimento na metabolização e depuração do A β cerebral, bem como os estudos que indicam que o aumento nos níveis de colesterol plasmático é capaz de desencadear o aumento na deposição de A β cerebral, pode-se supor que os efeitos neurotóxicos induzidos pelo A β podem, ainda, ser potencializados em indivíduos com hipercolesterolemia familiar, uma vez que a depuração deste peptídeo estaria comprometida. Dessa forma, a primeira pergunta nesta tese foi: *Camundongos LDLr^{-/-}, modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana, são mais susceptíveis a neurotoxicidade induzida pela administração i.c.v. do A β ?*

Primeiramente, nossos resultados demonstraram que camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e os camundongos LDLr^{-/-} tratados com A β ₁₋₄₀ apresentaram prejuízos de memória operacional e espacial de referência. No caso dos camundongos LDLr^{-/-}, no entanto, os déficits de memória ocorreram independentemente do tratamento com o A β ₁₋₄₀, como previamente demonstrado (Mulder et al., 2004; Thirumangalakudi et al., 2008; de Oliveira et al., 2011). De fato, um estudo preliminar de Mulder e colaboradores (2004), o qual avaliou diversos parâmetros comportamentais de camundongos LDLr^{-/-}, demonstrou que estes animais apresentam déficits de memória operacional e espacial de referência (nos testes labirinto aquático de Morris e alternância espontânea), os quais foram posteriormente associados à diminuição na proliferação celular e densidade sináptica no hipocampo, devido à diminuição na captação do colesterol celular em

decorrência a falta do receptor de LDL (Mulder et al., 2004, 2007). Todavia, em parte devido à natureza qualitativa dos testes de realocação do objeto e de alternância espontânea, no presente estudo nós não conseguimos identificar um efeito adicional do tratamento com o $A\beta_{1-40}$ nos camundongos $LDLr^{-/-}$ em relação a intensificação do declínio cognitivo. Assim, na sequência, nós realizamos outro teste comportamental, o labirinto em cruz elevado, com o objetivo de tentar visualizar diferenças entre os grupos experimentais. Os efeitos observados no reteste do labirinto em cruz elevado representam uma forma biologicamente adaptativa de aprendizado e memória, onde a experiência de um ambiente novo rapidamente leva à redução no conflito aproximação/aversão (Rodgers et al., 1996). Em resumo, no teste os animais adquirem informações sobre as áreas seguras e perigosas do labirinto, enquanto a reexposição ao labirinto em cruz elevado, usualmente 24 horas após o primeiro teste, induz alterações comportamentais dependentes da experiência anterior e representa um índice de aquisição, consolidação, e retenção de memória. Quando os roedores são expostos à sessão reteste, a exploração aos braços abertos é reduzida, significando aprendizagem (índice de memória aversiva) (Rodgers et al., 1996). De maneira notável, não foram observadas diferenças na porcentagem de entradas nos braços abertos entre o Dia 1 e o Dia 2 nos camundongos $LDLr^{-/-}$ tratados com o $A\beta_{1-40}$, caracterizando um déficit cognitivo neste paradigma comportamental. Por outro lado, para os camundongos C57BL/6 tratados com o $A\beta_{1-40}$ e $LDLr^{-/-}$ tratados com PBS, houve uma diminuição na porcentagem de entradas nos braços abertos durante o Dia 2 em comparação ao Dia 1.

Embora não induza todas as características patológicas da doença de Alzheimer, como placas amiloides (Takeda et al., 2009), a infusão aguda de $A\beta_{1-40}$ no cérebro de roedores é um modelo experimental útil para a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos tóxicos induzidos pelo $A\beta$ (Prediger et al., 2007). Nesse sentido, trabalhos anteriores demonstraram que os prejuízos de aprendizado e memória induzidos pela injeção i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ agregado em camundongos estão associados com estresse oxidativo, neuroinflamação, déficits sinápticos, excitotoxicidade glutamatérgica, e morte neuronal (Prediger et al., 2007, 2008; Piermartiri et al., 2010; Santos et al., 2012; Figueiredo et al., 2011; dos Santos et al., 2013). Portanto, com a intenção de responder a nossa pergunta inicial, nós investigamos alguns dos principais mecanismos relacionados aos prejuízos cognitivos induzidos pelo $A\beta_{1-40}$. Em particular, nós observamos que o tratamento dos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem com o $A\beta_{1-40}$ induziu uma

ativação astrocitária pronunciada no hipocampo destes animais. Em contraste, camundongos LDLr^{-/-} apresentaram níveis basais de ativação glial elevados. Nesse sentido, a disfunção da BHE com infiltração de componentes sanguíneos ao parênquima cerebral podem levar ao dano neuronal e glial combinados com uma persistente ativação de micróglia e astrócitos (Rapp et al., 2008). De particular interesse, os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram uma imunorreatividade para a AQP-4 no hipocampo aumentada. A AQP-4 é o principal canal de água expresso no SNC, sendo particularmente expresso nos processos astrocíticos que se comunicam com a BHE (Nagelhus et al., 2004). A localização de AQP-4 nos processos astrocíticos próximos às células endoteliais é consistente com o papel que os astrócitos desempenham na indução, desenvolvimento e manutenção da integridade da BHE, garantindo assim um ambiente cerebral adequado para a função neuronal (Nicchia et al., 2004). Segundo Tomás-Camardiel e colaboradores (2005), os primeiros sinais de disfunção da BHE coincidem com um forte aumento nos níveis de RNAm da AQP-4 em células glias perivasculares. A disfunção da BHE também pode permitir a entrada no cérebro do A β circulante. O A β é transportado através da BHE via dois receptores: RAGE e LRP-1 (Deane et al., 2004). O influxo do A β do sangue para o cérebro é mediado pelo RAGE, enquanto o efluxo do cérebro para sangue é mediado pelo LRP-1 (Zlokovic et al., 2004). A depuração do cérebro para o sangue é essencial para a regulação dos níveis de A β no cérebro e uma desregulação da BHE pode contribuir para o aumento nos níveis de A β cerebral (Prasanthi et al., 2008). Todavia, um resultado importante do nosso estudo foi a observação de uma interação entre os fatores linhagem e tratamento na ativação glial, evidenciando que em camundongos LDLr^{-/-} a reatividade astrocitária foi ainda mais intensa quando estes animais foram tratados com A β ₁₋₄₀.

Embora os astrócitos proporcionem neuroproteção por meio da liberação de fatores neurotróficos, os astrócitos reativos podem provocar e potencializar processos neuropatológicos, devido ao aumento da produção de mediadores inflamatórios e espécies reativas (Wyss-Coray e Rogers, 2012; Sofroniew e Vinters, 2010). Nesse cenário, a capacidade das células de resistir ao estresse oxidativo é dependente dos mecanismos de defesas antioxidantes que detoxificam as espécies reativas antes que estas causem danos celulares (Le et al., 2011). Em particular, a GSH é o principal antioxidante endógeno, que desempenha um papel fundamental na detoxificação de espécies reativas e regulação do ambiente redox intracelular (Lewerenz e Maher, 2011). No presente estudo, nós observamos uma diminuição significativa no sistema antioxidante

dependente da GSH no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos C57BL/6 tratados com $A\beta_{1-40}$, evidenciada pela diminuição no conteúdo de GSH e na atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR. Por outro lado, os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram um desequilíbrio do sistema da GSH como demonstrado pela diminuição nos níveis de GSH, e nas atividades das enzimas GPx e GR nas estruturas cerebrais estudadas. Nessa linha de evidência, Oliveira e colaboradores (2005) mostraram que o estresse oxidativo no tecido cerebral dos camundongos LDLr^{-/-} é devido primariamente ao baixo conteúdo de nucleotídeos de piridina no estado reduzido (NADPH), os quais são consumidos em virtude do aumento na lipogênese nos camundongos LDLr^{-/-}. Portanto, como a GR catalisa a redução da GSH oxidada à GSH reduzida à custa de NADPH, a inibição na atividade do sistema antioxidante dependente da GSH observada no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos LDLr^{-/-} provavelmente está relacionada ao baixo conteúdo celular de NADPH nos camundongos LDLr^{-/-}. De modo notório, quando os camundongos LDLr^{-/-} foram injetados com o $A\beta_{1-40}$ observamos uma indução no sistema da GSH, como indicada pelo aumento nos níveis de GSH e na atividade da GPx. De fato, as defesas antioxidantes vinculadas à GSH são conhecidas por serem estimuladas sob condições de estresse celular, incluindo após estresse oxidativo (Arumugam et al., 2006). Um dos caminhos pelos quais a célula regula sua capacidade antioxidante endógena é por meio da ativação do fator de transcrição relacionado ao fator E2 (Nrf2) (Joshi e Johnson, 2012). Este fator de transcrição quando ativo liga-se aos elementos responsivos antioxidantes (ARE) acelerando a transcrição de genes de enzimas antioxidantes (Ray et al., 2012).

De acordo com a ativação da via do Nrf2, nós também demonstramos que a atividade da SOD foi aumentada no hipocampo dos camundongos LDLr^{-/-} tratados com $A\beta_{1-40}$. No entanto, mesmo com essa resposta antioxidante compensatória, os níveis de espécies reativas ainda permaneceram aumentados. Como é evidente pela terminologia, espécies reativas são extremamente reativas para com diferentes moléculas fundamentais para a célula e iniciam uma cascata de reações oxidativas ao mesmo tempo em que levam a morte neuronal (Uttara et al., 2009). Nesse sentido, as membranas lipídicas neuronais são enriquecidas de ácidos graxos poli-insaturados, os quais são especialmente sensíveis ao ataque de radicais livres (LeBel e Bondy, 1991). Nesse trabalho, utilizamos o corante fluorescente iodeto de propídeo para analisar os danos às membranas plasmáticas em fatias de hipocampo. De modo interessante, a avaliação do dano celular nas fatias de hipocampo, por meio da captação do iodeto de propídeo pelas células mortas ou em

degeneração com as membranas danificadas, demonstrou uma forte incorporação do corante no hipocampo dos camundongos LDLr^{-/-} expostos ao A β ₁₋₄₀, evidenciando que estes camundongos foram mais vulneráveis às alterações oxidativas e inflamatórias induzidos pelo A β .

Anteriormente, Santos e colaboradores (2012) observaram um aumento na atividade da AChE no hipocampo de camundongos *Swiss* após a administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀. No presente trabalho os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com A β ₁₋₄₀ não apresentaram alterações na atividade da AChE. Nesse sentido, sabe-se que camundongos *Swiss* e C57BL/6 apresentam uma susceptibilidade diferente à toxicidade induzida pela administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀, em especial no que diz respeito ao estresse oxidativo (Prediger et al., 2007). De fato, em condições de estresse oxidativo a atividade da AChE pode ser aumentada (Moreira et al., 2012; Santos et al., 2012; Khadrawy et al., 2011). Digno de nota, em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa também indicamos que o aumento na atividade da AChE cerebral parece ser um evento inicial associado aos prejuízos cognitivos induzidos pela hipercolesterolemia em camundongos *Swiss* (Moreira et al., 2014). No presente estudo, observamos um aumento significativo na atividade da AChE no hipocampo de camundongos LDLr^{-/-} tratados com o A β ₁₋₄₀. Com base em tais observações, podemos supor que este evento (aumento da atividade da AChE) contribuiu para os prejuízos cognitivos mais intensos observados nos camundongos LDLr^{-/-} expostos ao A β ₁₋₄₀ no reteste do labirinto em cruz elevado. Rodgers e colaboradores (1996) demonstraram que mecanismos colinérgicos estão envolvidos na sensibilização ao medo que parece ocorrer entre a exposição inicial e subsequente ao labirinto em cruz elevado. Adicionalmente, trabalhos anteriores mostraram que a atividade da AChE está aumentada em placas amiloides, sendo um fenômeno precoce no processo de deposição amiloide (Moran et al., 1993). De fato, Sberna e colaboradores (1997) demonstraram que o distúrbio na homeostase do cálcio está relacionado com o aumento da atividade da AChE dentro de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares, sendo a relação entre os prejuízos da homeostase do cálcio e o estresse oxidativo bem caracterizada (Lafon-Cazal et al., 1993). Além disso, há uma clara conexão entre o sistema colinérgico e o metabolismo da APP, uma vez que prejuízos no sistema colinérgico podem também contribuir para a patologia amiloide (Yan e Feng, 2004). No entanto, no presente estudo não foram encontradas evidências de que a toxicidade induzida pelo A β foi associada com deposição amiloide no hipocampo dos camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-}. Novos estudos, contudo, são necessários para avaliar alterações na

deposição do A β nos camundongos LDLr^{-/-} utilizando técnicas que possam detectar mudanças iniciais nestes parâmetros, uma vez que as placas amiloides são formadas somente em estágios bastantes avançados de toxicidade do A β .

Desta forma, com o intuito de investigar melhor os eventos relacionados aos prejuízos cognitivos apresentados pelos camundongos LDLr^{-/-}, nós analisamos a expressão de genes envolvidos no metabolismo e depuração do A β em camundongos LDLr^{-/-} adultos jovens (três meses) e de “meia-idade” (quatorze meses). Previamente, nosso grupo de pesquisa corroborou experimentalmente os dados clínicos encontrados no estudo de Daniel Zambon, caracterizando os camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade” como um modelo experimental de CCL. Ademais, demonstramos que estes prejuízos cognitivos nos camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade” foram associados com desbalanço antioxidante, dano oxidativo e aumento na atividade da AChE em regiões cerebrais associadas com os processos de aprendizado e memória, particularmente no córtex pré-frontal (Moreira et al., 2012). Além disso, Ramirez e colaboradores, em 2011, demonstraram em camundongos LDLr^{-/-}/apoB100 de dezoito meses a presença de β -amiloidose em vasos cerebrais (Ramirez et al., 2011). Como originalmente proposto por Zlokovic e colaboradores (1993), o transporte através da BHE regula de maneira importante os níveis de A β cerebral. De acordo com esta teoria, receptores na BHE controlam os níveis de A β no cérebro por regularem de um lado o influxo do A β circulante para dentro do cérebro via RAGE, e por outro lado, o efluxo do A β do cérebro para o sangue através da BHE via LRP-1. Dessa forma, começamos investigando a expressão gênica do LRP-1. De modo notório, nossos resultados demonstraram que a idade modifica a expressão gênica do LRP-1 de maneira diferente nas duas linhagens de camundongos estudadas. Os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de quatorze meses apresentaram um aumento nos níveis de RNAm do LRP-1 no hipocampo. Em contraste, no estudo de Shibata publicado no ano de 2000, foi observado uma imunorreatividade diminuída para o LRP-1 em microvasos cerebrais em camundongos C57BL/6 de nove meses de idade. Por outro lado, a ausência do receptor de LDL foi acompanhada por um aumento na expressão gênica do LRP-1 no hipocampo dos camundongos jovens, mas não foi modulada com o envelhecimento. Enquanto que no córtex-pré-frontal os camundongos LDLr^{-/-} de três meses de idade apresentaram uma diminuição na expressão gênica do LRP-1, o que não foi mantido com a idade. Nessa linha de evidência, a doença de Alzheimer está associada com alterações nas distribuições de ambos receptores LRP-1 e RAGE na BHE no

hipocampo dos pacientes (Donahue et al., 2006). Segundo Donahue e colaboradores (2006), em casos severos de doença de Alzheimer há uma diminuição dos níveis de LRP-1 na microvasculatura cerebral, enquanto existe um aumento nos níveis de RAGE.

Estudos prévios utilizando coelhos (Ghribi et al., 2006) e camundongos (Thirumangalakudi et al., 2008) demonstraram um aumento no processamento amiloidogênico da APP em condições de hipercolesterolemia. O A β resulta da clivagem sequencial da APP pelas proteases de membrana denominadas BACE-1 e γ - secretases (Haass e Selkoe, 1993). Nossos resultados demonstraram um aumento na expressão gênica da APP no hipocampo dos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de “meia-idade”, o que não foi observado no córtex pré-frontal. A APP, um componente da patogênese da doença de Alzheimer, normalmente ajuda a manter as sinapses funcionais (Nicolas e Hassan, 2014). Os dados da literatura são bastante conflitantes em relação à modulação da expressão da APP pelo envelhecimento. Por exemplo, Lukiw (2004) observou o aumento da expressão da APP no cérebro de indivíduos idosos. No entanto, outros estudos demonstraram que a expressão da APP é uniforme com o envelhecimento. Recentemente, Primiani e colaboradores (2014) observaram em indivíduos de meia-idade que a expressão gênica da APP no córtex pré-frontal não se modifica com o envelhecimento. De maneira similar, em um estudo experimental foi demonstrado que o envelhecimento não causa modificações na expressão do gene da APP no hipocampo de camundongos C57BL/6 de 24 meses de idade (Csiszar et al., 2013). Ademais, nos camundongos LDLr^{-/-} não foram observadas modificações significativas na expressão da APP em ambas estruturas cerebrais estudadas. Nossos resultados estão de acordo com o estudo prévio de Thirumangalakudi e colaboradores (2008), onde não foram observadas diferenças na expressão da APP no córtex cerebral de camundongos LDLr^{-/-} jovens.

No estudo de Thirumangalakudi e colaboradores (2008), os autores também observaram que os camundongos LDLr^{-/-} apresentam um aumento nos níveis de RNAm da enzima BACE-1 no córtex cerebral, o que corrobora com nossos dados. Nós observamos um aumento na expressão gênica da BACE-1 no córtex pré-frontal dos camundongos LDLr^{-/-} de três meses de idade, o qual não foi mantido com o envelhecimento. Por outro lado, a expressão gênica da PS-1 está aumentada nos camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses no córtex pré-frontal e hipocampo. Uma consequência óbvia do aumento da expressão da BACE-1 e/ou PS-1 é o aumento do processamento da APP

(Thirumangalakudi et al., 2008). Este aumento no processamento amiloidogênico da APP pode ser uma influência direta do colesterol, ou mais precisamente de alterações na distribuição, transporte e metabolismo do colesterol nas membranas e em compartimentos subcelulares (Sambamurti et al., 2004). Ghribi e colaboradores (2006) observaram em neurônios hipocâmpais de coelhos hipercolesterolêmicos, a colocalização da BACE-1 e de colesterol e o aumento na expressão e atividade desta enzima, sugerindo que o colesterol pode modular a via amiloidogênica.

O acúmulo e deposição de A β no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer desencadeia morte neuronal apoptótica (Shimohama, 2000), assim como em cérebros de camundongos APP/PS1 (Long et al., 2013). Ademais, tem sido demonstrado que a APP, durante a apoptose, pode ser eficientemente clivada pela família de proteases associadas à apoptose, resultando na formação aumentada de A β (Pereira et al., 2004). Nesse sentido, nós observamos que os camundongos LDLr^{-/-} hipercolesterolêmicos (independentemente da idade) apresentaram uma diminuição na razão da expressão gênica Bcl-2/Bax em ambas estruturas cerebrais estudadas. Enquanto os camundongos selvagens de quatorze meses de idade apresentaram uma diminuição da razão Bcl-2/Bax no córtex pré-frontal. Os membros da família Bcl-2 desempenham um papel importante na via mitocondrial da apoptose, dentre eles a Bax é um fator promotor da apoptose. A Bax pode iniciar a abertura do poro mitocondrial induzindo a liberação de proteínas apoptóticas para o citoplasma, as quais executarão os eventos apoptóticos (Shimizu et al., 1999; Tsujimoto e Shimizu, 2000). Por sua vez a Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, estabiliza a integridade mitocondrial atenuando a liberação de citocromo c e impedindo a apoptose (Xian et al., 2014). Dessa forma, nossos resultados são indicativos de uma maior ativação dos mecanismos apoptóticos no cérebro dos camundongos LDLr^{-/-} já aos três meses de idade. O que vai de acordo com os resultados que encontramos no ensaio de captação de iodeto de propídeo, onde observamos que estes camundongos apresentam aumentada permeabilidade das membranas hipocâmpais.

Contudo, não está claro, ainda, como o colesterol plasmático poderia afetar as funções cerebrais, uma vez que colesterol presente nas lipoproteínas não permeia a BHE (Dietschy e Turley, 2001). Por outro lado, os oxisteróis, derivados metabólicos do colesterol, são capazes de transpassar as membranas lipofílicas (Björkhem et al., 2002). Há um fluxo contínuo de 27OH da circulação sanguínea para o SNC. Em pacientes com prejuízos da integridade da BHE ocorre um acúmulo no

liquor do principal produto de degradação do 27OH (Saeed et al., 2014). Saeed e colaboradores (2014) apontaram este metabólito do 27OH como um possível biomarcador para condições que causam danos na BHE.

Neste contexto, nosso próximo passo foi investigar se os prejuízos cognitivos e alterações na BHE em camundongos LDLr^{-/-} são, ainda, potencializados pela exposição a uma dieta hipercolesterolêmica. Nesse sentido, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} foram expostos durante trinta dias à dieta padrão para roedores ou à dieta hipercolesterolêmica (1,25% de colesterol). Nossos resultados demonstraram que, independentemente da dieta adotada, os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram prejuízo de memória operacional e espacial de referência. Novamente, devido os testes comportamentais realizados, fornecerem somente um índice qualitativo, não observamos uma maior redução na função cognitiva dos camundongos LDLr^{-/-} tratados com a dieta rica em colesterol, o que corrobora com nossos dados prévios (de Oliveira et al., 2011) e com trabalhos de outros grupos de pesquisa (Thirumangalakudi et al., 2008). Novamente, realizamos o teste e reteste do labirinto em cruz elevado, no entanto, ao contrário do A β a dieta hipercolesterolêmica não causou prejuízo de aprendizagem aversiva nos camundongos LDLr^{-/-}.

Por outro lado, ao contrário dos camundongos LDLr^{-/-}, o tratamento de camundongos C57BL/6 selvagens por um mês com a dieta hipercolesterolêmica, não foi capaz de modificar significativamente os níveis de colesterol (aumento de cerca de 16% em relação aos animais que ingeriram a dieta padrão) e desencadear déficits cognitivos. Contudo, estudos prévios que utilizaram um período maior de exposição à dieta hipercolesterolêmica (pelo menos dois meses) e/ou um maior teor de colesterol na dieta (até 5%) demonstraram prejuízos cognitivos em roedores não modificados geneticamente induzidos por uma hipercolesterolemia leve (Thirumangalakudi et al., 2008; Ullrich et al., 2010; Moreira et al., 2014). Nesse sentido, recentemente demonstramos que camundongos *Swiss* expostos à dieta hipercolesterolêmica (1,25%) por 60 dias apresentaram prejuízo cognitivo no teste de realocação de objeto. Este resultado demonstrou que, mesmo uma elevação leve nos níveis de colesterol plasmático (em torno de 50%), e por um período relativamente curto (dois meses), é capaz de induzir déficit cognitivo em camundongos (Moreira et al., 2014).

Cabe ressaltar que, mesmo sem diferenças estatísticas, pode-se observar que os camundongos C57BL/6 tratados com a dieta hipercolesterolêmica apresentaram um aumento moderado (16%) nos níveis plasmáticos de colesterol. Esta hipercolesterolemia leve induzida

pela exposição à dieta rica em colesterol nos camundongos C57BL/6 foi associada com aumento na permeabilidade da BHE à fluoresceína de sódio no córtex pré-frontal e hipocampo. Ademais, este aumento na permeabilidade da BHE à fluoresceína de sódio também foi observado nas estruturas cerebrais dos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com a dieta padrão. Notavelmente, quando estes camundongos foram tratados com a dieta hipercolesterolêmica o aumento na permeabilidade da BHE no córtex pré-frontal e hipocampo foi ainda mais pronunciado. Digno de nota, observamos também um aumento na permeabilidade da BHE no bulbo olfatório dos camundongos LDLr^{-/-} (independentemente da dieta).

Com intuito de investigar de maneira mais detalhada a integridade da BHE, nós analisamos os níveis de RNAm das proteínas integrantes das junções oclusivas. As junções oclusivas vedam o endotélio microvascular e representam o núcleo da BHE (Weiss et al., 2009). Neste estudo, a dieta hipercolesterolêmica causou uma diminuição na expressão gênica da claudina-5 e ocludina no hipocampo dos camundongos C57BL/6. Além disso, os camundongos LDLr^{-/-} tratados com dieta padrão também apresentaram diminuição na expressão gênica das proteínas pertencentes das junções oclusivas no hipocampo. Todavia, quando estes camundongos foram tratados com a dieta rica em colesterol ocorreu uma ativação da expressão gênica destas proteínas, provavelmente por um mecanismo compensatório. É importante mencionar que, apesar da verificação deste efeito compensatório na expressão gênica das proteínas integrantes das junções oclusivas, os valores nos níveis de expressão não se igualam aos níveis do grupo controle e a permeabilidade à fluoresceína de sódio (teste funcional da BHE), é bastante elevada nos camundongos LDLr^{-/-} submetidos à dieta hipercolesterolemica. Durante processos inflamatórios sistêmicos alterações na cinética das junções oclusivas e consequentemente disfunção da BHE têm sido descritas. O aumento na atividade imune periférica e consequente aumento na permeabilidade da BHE podem afetar o sistema imunológico cerebral desencadeando processos neuroinflamatórios (Takeda et al., 2014). No córtex pré-frontal a dieta hipercolesterolêmica não alterou os níveis de RNAm das proteínas claudina-5 e ocludina, desta forma podemos supor que possivelmente nesta estrutura cerebral a participação das outras células que formam a BHE foi mais proeminente para determinar a maior permeabilidade. As células gliais (especialmente os astrócitos), os pericitos, os neurônios juntamente com a lâmina basal estão próximos às células endoteliais cerebrais e constituem o que é denominado unidade neurovascular, um

conceito proposto para ressaltar as interações funcionais que controlam a integridade da BHE (Weiss et al., 2009).

Além dos oxisteróis, em situações de disfunção da BHE a LDL plasmática também pode ser encontrada no SNC. Recentemente, Löffler e colaboradores (2013) observaram em camundongos hipercolesterolêmicos apoB-APP, um acúmulo de apoB100 em vasos cerebrais. Ademais, Chen e colaboradores (2010) utilizando coelhos hipercolesterolêmicos demonstraram que o aumento na permeabilidade na BHE induzido pela dieta hipercolesterolêmica desencadeia o extravasamento de partículas contendo apoB100, i.e. LDL plasmáticas, para os cérebros destes animais. Ademais, os autores observaram que a presença destas lipoproteínas plasmáticas nos cérebros dos animais está associada com o acúmulo de colesterol intraneuronal, disfunção endossomal, e ainda aumento da produção de A β e prejuízo da integridade sináptica (Chen et al., 2010). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa investigou o impacto do tratamento com LDL plasmática em neurônios primários corticais. A LDL plasmática desencadeou o aumento de colesterol endossomal, o que desencadeou modificações no pH endossomal levando ao acúmulo e aumento na atividade da BACE-1, aumento nos níveis de A β e diminuição da proteína sinaptofisina (Hui et al., 2012). Neste cenário, em nosso trabalho observamos que a LDL plasmática prejudica o desenvolvimento de neurônios hipocâmpais: (i) impedindo o crescimento axonal de neurônios no estágio 2 de polaridade, e (ii) diminuindo o comprimento axonal de neurônios no estágio 3 de polaridade. Em conjunto estes resultados demonstraram que a exposição à LDL plasmática foi potencialmente prejudicial para o desenvolvimento e maturação das células neuronais, o que possivelmente está relacionado com o acúmulo e modificação na compartimentalização do colesterol celular.

Em conjunto as evidências levantadas ao longo desta Tese apontam a relação entre situações em que ocorre disfunção na homeostase do colesterol, particularmente a hipercolesterolemia familiar, e alterações no SNC características da doença de Alzheimer. Nesse sentido, considerando que estudos recentes têm identificado o receptor de LDL como uma via fisiológica importante que medeia a regulação celular dos níveis de A β cerebral e sugerem que o aumento nos níveis deste receptor pode promover o aumento na degradação deste peptídeo no cérebro, nós postulamos que o receptor LDL pode ser um importante alvo terapêutico na doença de Alzheimer (de Oliveira et al., 2014) e que compostos que induzam a expressão deste receptor no cérebro poderiam ser interessantes agentes moduladores do depósito de A β .

Neste estudo foi avaliado se o composto Genfibrozila poderia modular a expressão gênica do receptor de LDL a nível hepático e cerebral. Para isto, camundongos *Swiss* foram tratados durante trinta dias com três diferentes doses deste composto. Fibratos, como o Genfibrozila, reduzem os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos em pacientes com hiperlipidemia por meio de mecanismos que ainda não estão totalmente elucidados (Cámara-Lemarroy et al., 2015). Além disso, o Genfibrozila foi capaz de aumentar os níveis de RNAm do receptor de LDL em células hepáticas (células HepG2) por uma via diferente que as estatinas, a qual parece estar mais associada com o aumento da estabilidade do que da síntese do RNAm do receptor de LDL (Goto et al., 1997). De maneira interessante, nós observamos um aumento nos níveis de RNAm hepático do receptor de LDL na dose de 1,3 mg/kg. Contudo, não foram observadas diferenças na expressão gênica deste receptor no hipocampo dos camundongos tratados com o Genfibrozila. O porquê desta diferença entre os dois tecidos ainda precisa ser elucidado, nossos resultados são ainda incipientes, mas, pode-se especular a possibilidade do tratamento não ter resultado em concentrações efetivas da molécula no SNC. Ademais, não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos de colesterol dos animais após o tratamento com o fibrato. É importante mencionar, que diversas evidências vêm demonstrando que as estatinas diminuem os riscos para a doença de Alzheimer, no entanto, na maioria dos estudos sua ação foi relacionada principalmente aos seus efeitos pleiotrópicos (e.g., redução do estresse oxidativo e inflamação) não havendo dados conclusivos de que estes compostos possam aumentar os níveis de receptores de LDL no SNC (Chatterjee et al., 2014; Williams, 2015).

Nesta tese observamos experimentalmente que a hipercolesterolemia familiar está associada a uma maior susceptibilidade aos efeitos neurotóxicos induzidos pelo A β , bem como a alterações no metabolismo deste peptídeo, indução de apoptose e aumento na permeabilidade da BHE em regiões cerebrais associadas com os processos de aprendizagem e memória, como esquematizado na Figura 33. Os achados deste trabalho reforçam a associação da hipercolesterolemia familiar à patofisiologia da doença de Alzheimer esporádica. Finalmente, nos leva a pensar no receptor de LDL como um possível alvo terapêutico na doença de Alzheimer.

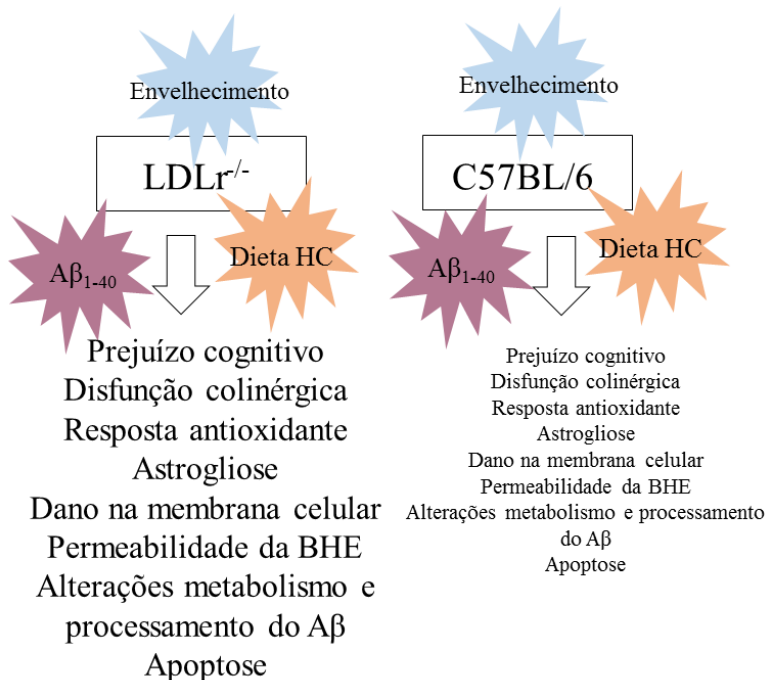


Figura 33. A ausência de função do receptor de LDL aumenta a susceptibilidade a neurotoxicidade induzida pelo peptídeo β -amiloide ($A\beta$), dieta hipercolesterolêmica (HC) e envelhecimento em camundongos. De maneira geral, os resultados obtidos nesta tese demonstraram que em comparação aos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram prejuízo cognitivo, disfunção colinérgica, resposta antioxidante, astroglíose, dano a membrana celular, astroglíose, disfunção da barreira hemato-encefálica (BHE), alterações no metabolismo e processamento do $A\beta$ e apoptose mais pronunciados após a administração do $A\beta$ e tratamento com a dieta HC, e devido ao envelhecimento.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta tese podemos inferir que:

❖ Camundongos LDLr^{-/-} são mais susceptíveis à neurotoxicidade induzida pela administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀ como sumarizado na Tabela 3. Especificadamente, em comparação com os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, os camundongos LDLr^{-/-} apresentam maior ativação glial, dano de membrana celular, permeabilidade da BHE, e desbalanço oxidativo no hipocampo após a administração do A β ₁₋₄₀;

Tabela 3. Sumário dos efeitos da administração i.c.v. do A β ₁₋₄₀ em parâmetros bioquímicos e comportamentais em camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-}.

Genótipo	Tratamento	Função cognitiva	Atividade AChE	Resposta Antioxidante	Astrogliose	Permeabilidade BHE	Captação IP
C57BL/6	PBS	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
C57BL/6	A β ₁₋₄₀	Prejuízo	Normal	Diminuição	Aumento	Normal	Aumento
LDLr ^{-/-}	PBS	Prejuízo	Normal	Diminuição	Aumento	Aumento	Aumento
LDLr ^{-/-}	A β ₁₋₄₀	Prejuízo mais intenso	Aumento	Aumento	Aumento mais intenso	Aumento	Aumento mais intenso

❖ Camundongos LDLr^{-/-} jovens e de “meia-idade” apresentam alterações na expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas no processamento da APP, na depuração do A β e apoptose;

❖ Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e camundongos LDLr^{-/-} expostos à dieta hipercolesterolêmica apresentaram um aumento na permeabilidade da BHE. No caso dos camundongos LDLr^{-/-} essa permeabilidade foi mais pronunciada e também foram observados prejuízos de memória operacional e espacial de referência, bem como aumento significativo nos níveis de colesterol plasmático;

❖ A exposição à LDL prejudicou o desenvolvimento e polarização de neurônios hipocampus;

❖ O composto Genfibrozila aumentou os níveis de RNAm do receptor de LDL no tecido hepático em camundongos *Swiss*, mas não no hipocampo.

8. PERSPECTIVAS

Alguns aspectos relacionados a este trabalho ainda precisam ser melhor elucidados, desta forma, nosso grupo propõe algumas perspectivas:

- ❖ Avaliar os níveis de A β no cérebro de camundongos LDLr^{-/-} jovens e de “meia-idade”. Além disso, realizar o ensaio de fluoro Jade B nos cortes cerebrais destes animais para avaliar a neurodegeneração;
- ❖ Investigar o efeito da dieta hipercolesterolêmica na expressão das proteínas integrantes das junções oclusivas nos cérebros dos camundongos LDLr^{-/-} e C57BL/6 selvagens;
- ❖ Avaliar o efeito do envelhecimento e da exposição à dieta hipercolesterolêmica em parâmetros neuroinflamatórios e de permeabilidade da BHE de camundongos LDLr^{-/-} por meios de ensaios de imunofluorescência.

REFERÊNCIAS

Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. **Nat Genet** 34(2):154-156, 2003.

Ainge JA, Heron-Maxwell C, Theofilas P, Wright P, de Hoz L, Wood ER. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. **Behav Brain Res** 167(1):183-195, 2006.

Arumugam TV, Gleichmann M, Tang SC, Mattson MP. Hormesis/preconditioning mechanisms, the nervous system and aging. **Ageing Res Rev** 5:165-178, 2006.

Assini FL, Duzzioni M, Takahashi RN. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behav Brain Res** 204:206-211, 2009.

Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. **Exp Neurol** 163(2):495-529, 2000.

Basak JM, Verghese PB, Yoon H, Kim J, Holtzman DM. Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of A β uptake and degradation by astrocytes. **J Biol Chem** 287(17):13959-13971, 2012.

Benn M, Watts GF, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Familial hypercholesterolemia in the Danish general population: Prevalence, coronary artery disease, and cholesterol-lowering medication. **J Clin Endocrinol Metab** 97:3956-3964, 2012.

Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: The implications of systematic meta-analyses. **Nat Rev Neurosci** 9(10):768-778, 2008.

Bjorkhem I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? **J Clin Invest** 110(6):725-730, 2002.

Bjorkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: Long secret life behind a barrier. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 24:806-815, 2004.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. **Lancet** 368:387-403, 2006.

Bloch K. The biological synthesis of cholesterol. **Science** 150(3692):19-28, 1965.

Bloch K. Summing up. **Annu. Rev Biochem** 56:1-19, 1987.

Bodovitz S, Klein WL. Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. **J Biol Chem** 271:4436-4440, 1996.

Bohara M, Kambe Y, Nagayama T, Tokimura H, Arita K, Miyata A. C-type natriuretic peptide modulates permeability of the blood-brain barrier. **J Cereb Blood Flow Metab** 34(4):589-596, 2014.

Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. **J Clin Invest** 76:1501-1513, 1985.

Braak H, Braak E. Neuropil threads occur in dendrites of tangle-bearing nerve cells. **Neuropathol Appl Neurobiol** 14:39-44, 1988.

Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 71(3):788-792, 1974.

Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. **Sci Am** 251(5):58-66, 1984.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science** 232:34-47, 1986.

Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis and therapy. **Nat Rev Neurosci** 10(5):333-344, 2009.

Burnett JR, Ravine D, van Bockxmeer FM, Watts GF. Familial hypercholesterolaemia: A look back, a look ahead. **Med J Aust** 182(11):552-553, 2005.

Cáceres A, Banker GA, Binder L. Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. **J Neurosci** 6(3):714-722, 1986.

Cáceres A, Ye B, Dotti CG. Neuronal polarity: Demarcation, growth and commitment. **Curr Opin Cell Biol** 24(4):547-553, 2012.

Cámara-Lemarroy CR, Guzman-DE LA Garza FJ, Cordero-Perez P, Ibarra-Hernandez JM, Muñoz-Espinosa LE, Fernandez-Garza NE. Gemfibrozil attenuates the inflammatory response and protects rats from abdominal sepsis. **Exp Ther Med** 9(3):1018-1022, 2015.

Cao D, Fukuchi K, Wan H, Kim H, Li L. Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice. **Neurobiol Aging** 27:1632-1643, 2006.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol** 113:484-490, 1985.

Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. **Dis Mon** 56:484-546, 2010.

Castellano JM, Deane R, Gottesdiener AJ, Verghese PB, Stewart FR, West T, Paoletti AC, Kasper TR, DeMattos RB, Zlokovic BV, Holtzman DM. Low-density lipoprotein receptor overexpression enhances the rate of brain-to-blood A β clearance in a mouse model of β -amyloidosis. **Proc Natl Acad Sci USA** 109(38):15502-15507, 2012.

Civeira F; International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. **Atherosclerosis** 173(1):55-68, 2004.

Chatterjee S, Krishnamoorthy P, Ranjan P, Roy A, Chakraborty A, Sabharwal MS, Ro R, Agarwal V, Sardar P, Danik J, Giri JS, DeGoma

EM, Kumbhani DJ. Statins and cognitive function: an updated review. **Curr Cardiol Rep** 17(2):559, 2015.

Chen X, Wagener JF, Morgan DH, Hui L, Ghribi O, Geiger JD. Endolysosome mechanisms associated with Alzheimer's disease-like pathology in rabbits ingesting cholesterol-enriched diet. **J Alzheimers Dis** 22(4):1289-1303, 2010.

Csiszar A, Tucsek Z, Toth P, Sosnowska D, Gautam T, Koller A, Deak F, Sonntag WE, Ungvari Z. Synergistic effects of hypertension and aging on cognitive function and hippocampal expression of genes involved in β -amyloid generation and Alzheimer's disease. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 305(8):H1120-1130, 2013.

de la Torre JC, Mussivand T. Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease? **Neurol Res** 15(3):146-153, 1993.

de la Torre JC. Critical threshold cerebral hypoperfusion causes Alzheimer's disease? **Acta Neuropathol** 98(1):1-8, 1999.

de Oliveira J, Hort MA, Moreira EL, Glaser V, Ribeiro-do-Valle RM, Prediger RD, Farina M, Latini A, de Bem AF. 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** 197:99-106, 2011.

de Oliveira J, Moreira EL, Mancini G, Hort MA, Latini A, Ribeiro-do-Valle RM, Farina M, da Rocha JB, de Bem AF. Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. **Neurochem Res** 38(10):2028-2036, 2013.

De Strooper B, Vassar R, Golde T. The secretases: Enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol** 6(2):99-107, 2010.

Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. **Stroke** 35:2628-2631, 2004.

Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets** 8(1):16-30, 2009.

Deiana S, Platt B, Riedel G. The cholinergic system and spatial learning. **Behav Brain Res** 221:389-411, 2011.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. **J Lipid Res** 34:1637-1659, 1993.

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. **Curr Opin Lipidol** 12:105-112, 2001.

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. **J Lipid Res** 45:1375-1397, 2004.

Dietschy JM. Central nervous system: Cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. **Biol Chem** 390:287-293, 2009.

Dos Santos AA, Naime AA, de Oliveira J, Colle D, Dos Santos DB, Hort MA, Moreira EL, Suñol C, de Bem AF, Farina M. Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events. **Arch Toxicol** *in press*.

Dringen R, Hirrlinger J. Glutathione pathways in the brain. **Biol Chem** 384:505-516, 2003.

dos Santos VV, Santos DB, Lach G, Rodrigues AL, Farina M, De Lima TC, Prediger RD. Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid-beta (A β (1-40)) administration in mice. **Behav Brain Res** 244, 107-115, 2013.

Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, Duncan JA 3rd, Silverberg GD, Miller MC, Tavares R, Yang W, Wu Q, Sabo E, Hovanesian V, Stopa EG. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol** 112(4):405-415, 2006.

Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. **J Cell Biol** 160(1):113–123, 2003.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol** 7:88-95, 1961.

Endo A. A gift from nature: the birth of the statins. **Nat Med** 14(10):1050-1052, 2008.

Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci** 86(5):484-493, 2010.

Engel D, Zomkowski AD, Lieberknecht V, Rodrigues AL, Gabilan NH. Chronic administration of duloxetine and mirtazapine downregulates proapoptotic proteins and upregulates neurotrophin gene expression in the hippocampus and cerebral cortex of mice. **J Psychiatr Res** 47(6):802-808, 2013.

Evola M, Hall A, Wall T, Young A, Grammas P. Oxidative stress impairs learning and memory in apoE knockout mice. **Pharmacol Biochem Behav** 96(2):181-186, 2010.

Ferguson D, Sapolsky R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. **J Neurosci** 27(30):8046-8052, 2007.

Ferreira ST, Klein WL. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiol Learn Mem** 96(4):529-543, 2011.

Figueiredo CP, Bicca MA, Latini A, Prediger RD, Medeiros R, Calixto JB. Folic acid plus alpha-tocopherol mitigates amyloid-beta-induced neurotoxicity through modulation of mitochondrial complexes activity. **J Alzheimers Dis** 24:61-75, 2011.

Frears ER, Stephens DJ, Walters CE, Davies H, Austen BM. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. **Neuroreport** 10:1699–1705, 1999.

Gallagher M, Colombo PJ. Ageing: The cholinergic hypothesis of cognitive decline. **Curr Opin Neurobiol** 5:161-168, 1995.

Ghribi O, Larsen B, Schrag M, Herman MM. High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. **Exp Neurol** 200:460-467, 2006.

Go GW, Mani A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. **Yale J Biol Med** 85(1):19-28, 2012.

Goate A. The future of Alzheimer's disease research: a molecular genetic perspective. **Neurobiol Aging** 15 Suppl 2:S161-4, 1994.

Goedeke L, Fernández-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. **Cell Mol Life Sci** 69(6):915-930, 2012.

Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: Identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. **Proc Natl Acad Sci USA** 70:2804-2808, 1973.

Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. **J Biol Chem** 249:5153-5162, 1974.

Goldstein JL, Brown MS. Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis. **Metabolism** 26(11):1257-1275, 1977.

Goldstein JL, Brown MS. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. **J Lipid Res** 25(13):1450-1461, 1984.

Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 29:431-438, 2009.

Goto D, Okimoto T, Ono M, Shimotsu H, Abe K, Tsujita Y, Kuwano M. Upregulation of low density lipoprotein receptor by gemfibrozil, a hypolipidemic agent, in human hepatoma cells through stabilization of

mRNA transcripts. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 17(11):2707-2712, 1997.

Greco SJ, Bryan KJ, Sarkar S, Zhu X, Smith MA, Ashford JW, Johnston JM, Tezapsidis N, Casadesus G. Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis** 19(4):1155-1167, 2010.

Grutzendler J, Morris JC. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Drugs** 61(1):41-52, 2001.

Haass C, Selkoe DJ. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. **Cell** 75(6):1039-1042, 1993.

Haass C, De Strooper B. The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key. **Science** 286:916-919, 1999.

Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8:101-112, 2007.

Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica Ilustrada*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Hawkins BT, Ocheltree SM, Norwood KM, Egleton RD. Decreased blood-brain barrier permeability to fluorescein in streptozotocin-treated rats. **Neurosci Lett** 411(1):1-5, 2007.

Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. **Nat Rev Genet**. 10(2):109-121, 2009.

Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic Biol Med** 27:146-159, 1999.

Herring A, Lewejohann L, Panzer AL, Donath A, Kroll O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. Preventive and therapeutic types of environmental

enrichment counteract beta amyloid pathology by different molecular mechanisms. **Neurobiol Dis** 42:530-538, 2011.

Herz J, Marschang P. Coaxing the LDL receptor family into the fold. **Cell** 112:289-292, 2003.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem** 74:214-226, 1976.

Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. **Annu Rev Genet** 24:133-170, 1990.

Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. **Hum Mutat** 1(6):445-466, 1992.

Hui L, Chen X, Geiger JD. Endolysosome involvement in LDL cholesterol-induced Alzheimer's disease-like pathology in primary cultured neurons. **Life Sci** 91(23-24):1159-1168, 2012.

Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. **Annu Rev Nutr** 19:141-172, 1999.

Ikonen E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. **Physiol Rev** 86(4):1237-1261, 2006.

Innerarity TL, Mahley RW. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. **Biochemistry** 17(8):1440-1447, 1978.

Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J Clin Invest** 92:883-893, 1993.

Ito MK, McGowan MP, Moriarty PM; National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. Management of familial hypercholesterolemias in adult patients: Recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. **J Clin Lipidol** 5(3 Suppl):S38-45, 2011.

Jackson GA. Drug treatments for Alzheimer's disease. **Nurs Times** 110(9):24-26, 2014.

Jacobsen JS. Alzheimer's disease: an overview of current and emerging therapeutic strategies. **Curr Top Med Chem** 2(4):343-352, 2002.

Jansen AC, van Wissen S, Defesche JC, Kastelein JJ. Phenotypic variability in familial hypercholesterolaemia: An update. **Curr Opin Lipidol** 13(2):165-171, 2002.

Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. **Annu Rev Biochem** 74:535-562, 2005.

Joshi G, Johnson JA. The Nrf2-ARE pathway: A valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. **Recent Pat CNS Drug Discov** 7:218-229, 2010.

Kanekiyo T, Cirrito JR, Liu CC, Shinohara M, Li J, Schuler DR, Shinohara M, Holtzman DM, Bu G. Neuronal clearance of amyloid- β by endocytic receptor LRP1. **J Neurosci** 33(49):19276-19283, 2013.

Katsouri L, Georgopoulos S. Lack of LDL receptor enhances amyloid deposition and decreases glial response in an Alzheimer's disease mouse model. **PLoS One** 6(7):e21880, 2011.

Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. **Am J Med** 37:402-407, 1964.

Khadrawy YA, Nour NA, Aboul Ezz HS. Effect of oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation on the activities of Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in the cortex and hippocampus of rat. **Transl Res** 157:100-107, 2011.

Kim J, Castellano JM, Jiang H, Basak JM, Parsadanian M, Pham V, Mason SM, Paul SM, Holtzman DM. Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. **Neuron** 64(5):632-644, 2009.

Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: Longitudinal, population based study. **BMJ** 322:1447-1451, 2001.

Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Iivonen S, Mannerman A, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. **Ann Intern Med** 137:149-155, 2002.

Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kareholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. **Arch Neurol** 62:1556-1560, 2005.

Koeijvoets KC, Rodenburg J, Hutten BA, Wiegman A, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Low-density lipoprotein receptor genotype and response to pravastatin in children with familial hypercholesterolemia: Substudy of an intima-media thickness trial. **Circulation** 112(20):3168-3173, 2005.

Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(10):5815-5820, 2001.

Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. **Biochem Biophys Res Commun** 252(3):711-715, 1998.

Kunda P, Paglini G, Quiroga S, Kosik K, Caceres A. Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. **J Neurosci** 21(7):2361-2372, 2001.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci** 8:499-509, 2007.

Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. **Nature** 364:535-537, 1993.

Laursen SE, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **Journal of pharmacological methods** 16:355-357, 1986.

Le TM, Jiang H, Cunningham GR, Magarik JA, Barge WS, Cato MC, Farina M, Rocha JB, Milatovic D, Lee E, Aschner M, Summar ML. Gamma-Glutamylcysteine ameliorates oxidative injury in neurons and astrocytes in vitro and increases brain glutathione in vivo. **Neurotoxicology** 32:518-525, 2011.

LeBel CP, Bondy SC. Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. **Neurotoxicol Teratol** 13:341-346, 1991.

Ledesma MD, Dotti CG. Amyloid excess in Alzheimer's disease: What is cholesterol to be blamed for? **FEBS Lett** 580(23):5525-5532, 2006.

Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. **Science** 248(4959):1124-1126, 1990.

Lewerenz J, Maher P. Control of redox state and redox signaling by neural antioxidant systems. **Antioxid Redox Signal** 14:1449-1465, 2011.

Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. **Circ Res** 96(12):1221-1232, 2005.

Li Y, Cam J, Bu G. Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction. **Mol Neurobiol** 23(1):53-67, 2001.

Liyanage KE, Burnett JR, Hooper AJ, van Bockxmeer FM. Familial hypercholesterolemia: Epidemiology, Neolithic origins and modern geographic distribution. **Crit Rev Clin Lab Sci** 48(1):1-18, 2011.

Löffler T, Flunkert S, Havas D, Sántha M, Hutter-Paier B, Steyrer E, Windisch M. Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPPsl mice. **Neurobiol Aging** 34(10):2379-2388, 2013.

Long Z, Zheng M, Zhao L, Xie P, Song C, Chu Y, Song W, He G. Valproic acid attenuates neuronal loss in the brain of APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease mice model. **Curr Alzheimer Res** 10(3):261-269, 2013.

Lovell MA, Ehmman WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. **Neurology** 45:1594-1601, 1995.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 193:265-275, 1951.

Lukiw WJ. Gene expression profiling in fetal, aged, and Alzheimer hippocampus: a continuum of stress-related signaling. **Neurochem Res** 29(6):1287-1297, 2004.

Mann DM. Cerebral amyloidosis, ageing and Alzheimer's disease; a contribution from studies on Down's syndrome. **Neurobiol Aging** 10:397-399; discussion 412-394, 1989.

Mariani E, Monastero R, Mecocci P. Mild cognitive impairment: a systematic review. **J Alzheimers Dis** 12(1):23-35, 2007.

Marks D, Wonderling D, Thorogood M, Lambert H, Humphries SE, Neil HAW. Screening for hypercholesterolaemia versus case finding for familial hypercholesterolaemia: Systematic review and cost effectiveness analysis. **Health Technol Assess** 4(29):1-123, 2000.

Mattson MP, Maudsley S, Martin B. A neural signaling triumvirate that influences ageing and agerelated disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. **Ageing Res Rev** 3:445-464, 2004.

Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. **Nature** 438(7068):612-621, 2005.

McGowan MP. Emerging low-density lipoprotein (LDL) therapies: Management of severely elevated LDL cholesterol-the role of LDL-apheresis. **J Clin Lipidol** 7:S21-26, 2013.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-

ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology** 34:939-944, 1984.

Medeiros R, Kitazawa M, Chabrier MA, Cheng D, Baglietto-Vargas D, Kling A, Moeller A, Green KN, LaFerla FM. Calpain inhibitor A-705253 mitigates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3xTgAD mice. **Am J Pathol** 181:616-625, 2012.

Merz PA, Wisniewski HM, Somerville RA, Bobin SA, Masters CL, Iqbal K. Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. **Acta Neuropathol** 60:113-124, 1983.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem** 247:3170-3175, 1972.

Moran MA, Mufson EJ, Gomez-Ramos P. Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. **Acta Neuropathol** 85:362-369, 1993.

Moreira EL, de Oliveira J, Nunes JC, Santos DB, Nunes FC, Vieira DS, Ribeiro-do-Valle RM, Pamplona FA, de Bem AF, Farina M, Walz R, Prediger RD. Age-related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}): evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **J Alzheimers Dis** 32(2):495-511, 2012.

Moreira EL, Aguiar AS Jr, de Carvalho CR, Santos DB, de Oliveira J, de Bem AF, Xikota JC, Walz R, Farina M, Prediger RD. Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia. **Neurosci Lett** 541:193-198, 2013.

Moreira EL, de Oliveira J, Engel DF, Walz R, de Bem AF, Farina M, Prediger RD. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? **J Neural Transm** 121(4):415-426, 2014.

Moreira EL, de Oliveira J, Prediger RD, Farina M, de Bem AF. Cholesterol Levels and Cognitive Impairments. In: Colin R Martin and

Victor R Preedy. (Org.). **Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline**. 1ed.: Elsevier, 2015, v. , p. 743-751.

Mount C, Downton C. Alzheimer disease: progress or profit? **Nat Med** 12(7):780-784, 2006.

Mufson EJ, Ginsberg SD, Ikonovic MD, DeKosky ST. Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. **J Chem Neuroanat** 26:233-242, 2003.

Mulder M, Jansen PJ, Janssen BJ, van de Berg WD, van der Boom H, Havekes LM, de Kloet RE, Ramaekers FC, Blokland A. Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. **Neurobiol Dis** 16(1):212-219, 2004.

Mulder M, Koopmans G, Wassink G, Al Mansouri G, Simard ML, Havekes LM, Prickaerts J, Blokland A. LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. **Neurosci Res** 59(3):251-256, 2007.

Mulder M. Sterols in the central nervous system. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 12(2):152-158, 2009.

Muller C. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. **Acta Med Scand** 89:75-84, 1938.

Myant NB. Familial defective apolipoprotein B-100: A review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis** 104:1-18, 1993.

Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. **Neuroscience** 129:905-913, 2004.

Nair, P. Brown and Goldstein: The cholesterol chronicles. **Proc Natl Acad Sci USA** 110(37):14829-14832, 2013.

Neil A, Cooper J, Betteridge J, Capps N, McDowell I, Durrington P, Seed M, Humphries SE. Reductions in all-cause, cancer, and coronary mortality in statin-treated patients with heterozygous

familial hypercholesterolaemia: A prospective registry study. **Eur Heart J** 29:2625-2633, 2008.

Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica Lehninger. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. Capítulo 21, Biossíntese de lipídeos; p. 805-850.

Nicchia GP, Nico B, Camassa LM, Mola MG, Loh N, Dermietzel R, Spray DC, Svelto M, Frigeri A. The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. **Neuroscience** 129:935-945, 2004.

Nicolas M, Hassan BA. Amyloid precursor protein and neural development. **Development** 141(13):2543-2548, 2014.

Nieweg K, Schaller H, Pfrieger FW. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. **J Neurochem** 109(1):125-134, 2009.

Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, Wiklund O, Hegele RA, Raal FJ, Defesche JC, Wiegman A, Santos RD, Watts GF, Parhofer KG, Hovingh GK, Kovanen PT, Boileau C, Averna M, Borén J, Bruckert E, Catapano AL, Kuivenhoven JA, Pajukanta P, Ray K, Stalenhoef AF, Stroes E, Taskinen MR, Tybjærg-Hansen A; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. **Eur Heart J** 34(45):3478-3490, 2013.

Nygaard HB. Current and emerging therapies for Alzheimer's disease. **Clin Ther** 35(10):1480-1489, 2013.

Oliveira HC, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Salerno AG, Dorighello GG, Velho JA, de Faria EC, Vercesi AE. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **FASEB J** 19:278-280, 2005.

Ooi EM, Barrett PH, Watts GF. The extended abnormalities in lipoprotein metabolism in familial hypercholesterolemia: Developing a new framework for future therapies. **Int J Cardiol** 168(3):1811-1818, 2013.

Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: From synapses toward neural networks. **Nat Neurosci** 13:812-818, 2010.

Pereira C, Ferreira E, Cardoso SM, de Oliveira CR. Cell degeneration induced by amyloid-beta peptides: implications for Alzheimer's disease. **J Mol Neurosci** 23(1-2):97-104, 2004.

Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. **Arch Neurol** 56(3):303-308, 1999.

Pfriefer FW. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. **Cell Mol Life Sci** 60(6):1158-1171, 2003a.

Pfriefer FW. Role of cholesterol in synapse formation and function. **Biochim Biophys Acta** 1610(2):271-280, 2003b.

Pfriefer FW. Outsourcing in the brain: Do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? **Bioessays** 25(1):72-78, 2003c.

Pfriefer FW, Ungerer N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. **Prog Lipid Res** 50(4):357-371, 2011.

Piermartiri TC, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, de Bem AF, Prediger RD, Tasca CI. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid-beta(1-40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Exp Neurol** 226:274-284, 2010.

Prasanthi JRP, Schommer E, Thomasson S, Thompson A, Feist G, Ghribi O. Regulation of b-amyloid levels in the brain of cholesterol-fed rabbit, a model system for sporadic Alzheimer's disease. **Mech Ageing Dev** 129:649-655, 2008.

Prediger RD, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, Figueiredo CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a

dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav Brain Res** 177:205-213, 2007.

Prediger RD, Medeiros R, Pandolfo P, Duarte FS, Passos GF, Pesquero JB, Campos MM, Calixto JB, Takahashi RN. Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience** 151:631-643, 2008.

Primiani CT, Ryan VH, Rao JS, Cam MC, Ahn K, Modi HR, Rapoport SI. Coordinated gene expression of neuroinflammatory and cell signaling markers in dorsolateral prefrontal cortex during human brain development and aging. **PLoS One** 9(10):e110972, 2014.

Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: The cholesterol connection. **Nat Neurosci** 6(4):345-351, 2003.

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):3-33, 2003.

Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. **N Engl J Med** 362:329-344, 2010.

Raal F, Scott R, Somaratne R, Bridges I, Li G, Wasserman SM, Stein EA. Low-density lipoprotein cholesterol-lowering effects of AMG 145, a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: the Reduction of LDL-C with PCSK9 Inhibition in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Disorder (RUTHERFORD) randomized trial. **Circulation** 126(20):2408-2417, 2012.

Rader DJ, Cohen J, Hobbs H. Monogenic hypercholesterolemia: New insights in pathogenesis and treatment. **J Clin Invest** 111(12):1795-1803, 2003.

Ramirez C, Sierra S, Tercero I, Vazquez JA, Pineda A, Manrique T, Burgos JS. ApoB100/LDLR^{-/-} hypercholesterolaemic mice as a model for mild cognitive impairment and neuronal damage. **PLoS One** 6:e22712, 2011.

Rapp JH, Pan XM, Neumann M, Hong M, Hollenbeck K, Liu J. Microemboli composed of cholesterol crystals disrupt the blood-brain barrier and reduce cognition. **Stroke** 39:2354-2361, 2008.

Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal** 24(5):981-990, 2012.

Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. **Neurobiol Dis** 7:321-331, 2000.

Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis** 8(5):890-899, 2001.

Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008-2010 and 2010-2012 Committees. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). **Eur Heart J** 32(14):1769-1818, 2011.

Ridker PM. LDL cholesterol: controversies and future therapeutic directions. **Lancet** 384(9943):607-617, 2014.

Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: A review. **Brain Res Bull** 61:1-24, 2003.

Rocchi A, Orsucci D, Tognoni G, Ceravolo R, Siciliano G. The role of vascular factors in late-onset sporadic Alzheimer's disease. Genetic and molecular aspects. **Curr Alzheimer Res** 6:224-237, 2009.

Rodgers RJ, Johnson NJ, Cole JC, Dewar CV, Kidd GR, Kimpson PH. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trail 1 and

response to post-trial cholinergic receptor blockade. **Pharmacol Biochem Behav** 54:41-50, 1996.

Rodgers RJ, Howard K, Stewart S, Waring P, Wright FL. Anxioselective profile of glycineB receptor partial agonist, D-cycloserine, in plus-maze-naïve but not plus-maze-experienced mice. **Eur J Pharmacol** 646:31-37, 2010.

Russell DW, Yamamoto T, Schneider WJ, Slaughter CJ, Brown MS, Goldstein JL. cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: Feedback regulation of a receptor mRNA. **Proc Natl Acad Sci USA** 80(24):7501-7505, 1983.

Russell DW, Schneider WJ, Yamamoto T, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL. Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. **Cell** 37(2):577-85, 1984.

Saeed A, Floris F, Andersson U, Pikuleva I, Lövgren-Sandblom A, Bjerke M, Paucar M, Wallin A, Svenningsson P, Björkhem I. 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid in cerebrospinal fluid reflects the integrity of the blood-brain barrier. **J Lipid Res** 55(2):313-318, 2014.

Sambamurti K, Granholm AC, Kindy MS, Bhat NR, Greig NH, Lahiri DK, Mintzer JE. Cholesterol and Alzheimer's disease: clinical and experimental models suggest interactions of different genetic, dietary and environmental risk factors. **Curr Drug Targets** 5:517-528, 2004.

Sanchez-Muniz FJ, Bastida S. Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. **Eur J Lipid Sci Technol** 110:295-301, 2008.

Santos DB, Peres KC, Ribeiro RP, Colle D, dos Santos AA, Moreira EL, Souza DO, Figueiredo CP, Farina M. Probuocol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid beta peptide in mice. **Exp Neurol** 233:767-775, 2012.

Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, Casella Filho A, Araújo DB, Cesena FY, Alves RJ; Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arq Bras Cardiol** 99(2 Supl. 2):1-28, 2012.

Santos RD, Maranhao RC. What is new in familial hypercholesterolemia? **Curr Opin Lipidol** 25(3):183-188, 2014.

Sberna G, Saez-Valero J, Beyreuther K, Masters CL, Small DH. The amyloid beta-protein of Alzheimer's disease increases acetylcholinesterase expression by increasing intracellular calcium in embryonal carcinoma P19 cells. **J Neurochem** 69:1177-1184, 1997.

Scheibel AB, Duong TH, Jacobs R. Alzheimer's disease as a capillary dementia. **Ann Med** 21:103-107, 1989.

Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behav Brain Res** 221:555-563, 2011.

Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: Implications for clinical management. **Atherosclerosis** 142:105-12, 1999.

Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). **J Biol Chem** 288(26):18707-18715, 2013.

Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. **J Clin Invest** 106(12):1489-1499, 2000.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apopto-genic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature** 399:483-487, 1999.

Shimohama S. Apoptosis in Alzheimer's disease—An update. **Apoptosis** 5:9-16, 2000.

Silva LE, Tsushida T, Terao J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. **Arch Biochem Biophys** 349(2):313-320, 1998.

Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(11):6460-6464, 1998.

Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. **Science** 290(5497):1721-1726, 2000.

Sniderman AD, Tsimikas S, Fazio S. The severe hypercholesterolemia phenotype: Clinical diagnosis, management, and emerging therapies. **J Am Coll Cardiol** 63(19):1935-1947, 2014.

Sofroniew MV, Vinters HV Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol** 119:7-35, 2010.

Solomon A, Kivipelto M, Wolozin B, Zhou J, Whitmer RA. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. **Dement Geriatr Cogn Disord** 28(1):75-80, 2009.

Song Y, Kenworthy AK, Sanders CR. Cholesterol as a co-solvent and a ligand for membrane proteins. **Protein Sci** 23(1):1-22, 2014

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nat Rev Neurosci** 2:294-302, 2001.

Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apoprotein B mutation and familial defective apoB100. **Proc Natl Acad Sci USA** 86(2):587-591, 1989.

Soufi M, Sattler AM, Maisch B, Schaefer JR. Molecular mechanisms involved in atherosclerosis. **Herz** 27(7):637-648, 2002.

Sparks DL, Hunsaker III JC, Scheff SW, Kryscio RJ, Henson JL, Markesbery WR. Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 11:601-607, 1990.

Sparks DL, Liu H, Scheff SW, Coyne CM, Hunsaker III JC. Temporal sequence of plaque formation in the cerebral cortex of nondemented individuals. **J Neuropathol Exp Neurol** 52:135-142, 1993.

Sparks DL, Scheff SW, Liu H, Landers TM, Coyne CM, Hunsaker JC 3rd. Increased incidence of neurofibrillary tangles (NFT) in non-demented individuals with hypertension. **J Neurol Sci** 131(2):162-169, 1995.

Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker III JC, Liu H, Landers T, Gross DR. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. **Exp Neurol** 126: 88-94, 1994.

Sparks DL, Kuo YM, Roher A, Martin T, Lukas RJ. Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. **Ann N Y Acad Sci** 903:335-344, 2000.

Sparks DL, Sabbagh MN, Connor DJ, Lopez J, Launer LJ, Petanceska S, Browne P, Wassar D, Johnson-Traver S, Lochhead J, Ziolkowski C. Atorvastatin therapy lowers circulating cholesterol but not free radical activity in advance of identifiable clinical benefit in the treatment of mild-to-moderate AD. **Curr Alzheimer Res** 2:343-353, 2005.

Soneira CF, Scott TM. Severe cardiovascular disease and Alzheimer's disease: senile plaque formation in cortical areas. **Clin Anat** 9(2):118-127, 1996.

Spowart-Manning L, van der Staay FJ. The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse. **Behav Brain Res** 151:37-46, 2004.

Stein EA, Gipe D, Bergeron J, Gaudet D, Weiss R, Dufour R, Wu R, Pordy R. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial. **Lancet** 380(9836):29-36, 2012.

Stein EA, Honarpour N, Wasserman SM, Xu F, Scott R, Raal FJ. Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia. **Circulation** 128(19):2113-2120, 2013.

Strand BH, Langballe EM, Hjellvik V, Handal M, Næss O, Knudsen GP, Refsum H, Tambs K, Nafstad P, Schirmer H, Bergem AL, Selmer R, Engedal K, Magnus P, Bjertness E; GENIDEM-Group. Midlife vascular risk factors and their association with dementia deaths: results from a Norwegian prospective study followed up for 35 years. **J Neurol Sci** 324(1-2):124-130, 2013.

Takechi R, Galloway S, Pallegage-Gamarallage MM, Lam V, Mamo JC. Dietary fats, cerebrovasculature integrity and Alzheimer's disease risk. **Progress in lipid research** 49:159-170, 2010.

Streit WJ, Sparks DL. Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. **J Mol Med (Berl)** 75(2):130–138, 1997.

Takeda S, Sato N, Niisato K, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Kano M, Morishita R. Validation of abeta1-40 administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease. **Brain Res** 1280:137-147, 2009.

Takeda S, Sato N, Morishita R. Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. **Front Aging Neurosci** 6:171, 2014.

Thirumangalakudi L, Prakasam A, Zhang R, Bimonte-Nelson H, Sambamurti K, Kindy MS, Bhat NR. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **J Neurochem** 106:475-485, 2008.

Tomás-Camardiel M, Venero JL, Herrera AJ, De Pablos RM, Pintor-Toro JA, Machado A, Cano J. Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals. **J Neurosci Res** 80, 235-246, 2005.

Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2: Life-or-death switch. **FEBS Lett** 466:6-10, 2000.

Ujii M, Dickstein DL, Carlow DA, Jefferies WA. Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model. **Microcirculation** 10:463-470, 2003.

Ullrich C, Pirchl M, Humpel C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. **Mol Cell Neurosci** 45:408-417, 2010.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol** 7:65-74, 2009.

Van Beek AH, Claassen JA. The cerebrovascular role of the cholinergic neural system in Alzheimer's disease. **Behav Brain Res** 221:537-542, 2011.

Vance DE, Van den Bosch H. Cholesterol in the year 2000. **Biochim Biophys Acta** 1529(1-3):1-8, 2000.

Vance D, Vance JE. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. 5th ed. Amsterdam:Elsevier, 2008.

Vehmas AK, Kawas CH, Stewart WF, Troncoso JC. Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 24:321-331, 2003.

Versmissen J, Oosterveer DM, Yazdanpanah M, Defesche JC, Basart DC, Liem AH, Heeringa J, Wittteman JC, Lansberg PJ, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Efficacy of statins in familial hypercholesterolaemia: A long term cohort study. **BMJ** 337:a2423, 2008.

Vetrivel KS, Thinakaran G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. **Biochim Biophys Acta** 1801(8):860-867, 2010.

Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, Fonseca FA, dos Santos JE, Santos RD, Bertolami MC, Faludi AA, Martinez TLR, Diament J, Guimarães A, Forti NA, Moriguchi E, Chagas ACP, Coelho OR, Ramires JAF; Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*, 2013.

Xian YF, Mao QQ, Wu JC, Su ZR, Chen JN, Lai XP, Ip SP, Lin ZX. Isorhynchophylline treatment improves the amyloid- β -induced cognitive impairment in rats via inhibition of neuronal apoptosis and tau protein hyperphosphorylation. **J Alzheimers Dis** 39(2):331-346, 2014.

Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and A β production. **Neurobiol Dis** 29(3):422-437, 2008.

Waldemar G, Dubois B, Emre M, Georges J, McKeith IG, Rossor M, Scheltens P, Tariska P, Winblad B. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. **Eur J Neurol** 14:e1-26, 2007.

Wasan KM, Brocks DR, Lee SD, Sachs-Barrable K, Thornton SJ. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov** 7(1):84-99, 2008.

Watts GF, Lewis B, Sullivan DR. Familial hypercholesterolemia: A missed opportunity in preventive medicine. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med** 4(8):404-405, 2007.

Watts GF, Gidding S, Wierzbicki AS, Toth PP, Alonso R, Brown WV, Bruckert E, Defesche J, Lin KK, Livingston M, Mata P, Parhofer KG, Raal FJ, Santos RD, Sijbrands EJ, Simpson WG, Sullivan DR, Susekov AV, Tomlinson B, Wiegman A, Yamashita S, Kastelein JJ; International FH Foundation. Integrated guidance on the care of familial hypercholesterolaemia from the International FH Foundation: executive summary. **J Atheroscler Thromb** 21(4):368-374, 2014.

Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Role of lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. **J Biol Chem** 253(24):9053-9062, 1978.

Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochim Biophys Acta** 1788:842-857, 2009.

Weller RO, Massey A, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE. Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. **Am J Pathol** 153:725-733, 1998.

Wendel A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol** 77:325-333, 1981.

Williams PT. Lower risk of Alzheimer's disease mortality with exercise, statin, and fruit intake. **J Alzheimers Dis** 44(4):1121-1129, 2015.

Wisniewski T, Goñi F. Immunotherapy for Alzheimer's disease. **Biochem Pharmacol** 88(4):499-507, 2014.

Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2(1):a006346, 2012.

Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. **Cell** 39(1):27-38, 1984.

Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D, Kindy M. Receptor dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. **Nat Med**, 6: 643-651, 2000.

Yan Z, Feng J. Alzheimer's disease: Interactions between cholinergic functions and beta-amyloid. **Curr Alzheimer Res** 1(4):241-248, 2004.

Yeagle PL. Modulation of membrane function by cholesterol. **Biochimie** 73(10):1303-1310, 1991.

Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 27:1706-1721, 2007.

Zambon D, Quintana M, Mata P, Alonso R, Benavent J, Cruz-Sanchez F, Gich J, Pocovi M, Civeira F, Capurro S, Bachman D, Sambamurti K,

Nicholas J, Pappolla MA. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **Am J Med** 123:267-274, 2010.

Zlokovic BV, Ghiso J, Mackic JB, McComb JG, Weiss MH, Frangione B. Blood-brain barrier transport of circulating Alzheimer's amyloid beta. **Biochem Biophys Res Commun** 197(3):1034-1040, 1993.

Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. **J Neurochem** 89:807-811, 2004.