

Gabriela Cristina de Paula

**O CONSUMO MODERADO DE VINHO TINTO MELHORA O  
DÉFICIT COGNITIVO INDUZIDO PELA  
HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem

Coorientadora: Dra. Jade de Oliveira

Florianópolis

2016

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

de Paula, Gabriela Cristina  
O CONSUMO MODERADO DE VINHO TINTO MELHORA O DÉFICIT  
COGNITIVO INDUZIDO PELA HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS  
/ Gabriela Cristina de Paula ; orientador, Andreza Fabro  
de Bem ; coorientador, Jade de Oliveira. - Florianópolis,  
SC, 2016.  
88 p.

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

Inclui referências

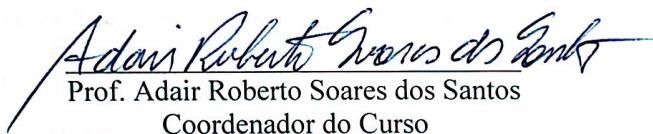
1. Neurociências. 2. Hipercolesterolemia. 3. Cognição.  
4. Flavonoides. 5. Neurociências. I. de Bem, Andreza  
Fabro. II. de Oliveira, Jade . III. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências. IV. Título.

**GABRIELA CRISTINA DE PAULA**

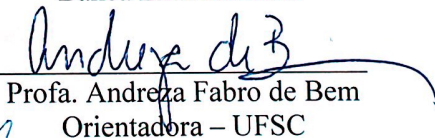
**“O CONSUMO MODERADO DE VINHO TINTO  
MELHORA O DÉFICIT COGNITIVO INDUZIDO PELA  
HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS”**

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

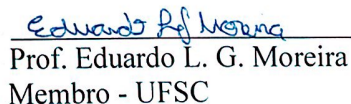
Florianópolis, 16 de fevereiro de 2016.

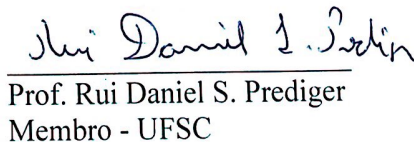
  
Prof. Adair Roberto Soares dos Santos  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

  
Profa. Andreza Fabro de Bem  
Orientadora – UFSC

  
Prof. Cláudio Teodoro da Souza  
Membro externo

  
Prof. Eduardo L. G. Moreira  
Membro - UFSC

  
Prof. Rui Daniel S. Prediger  
Membro - UFSC



## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Andreza Fabro de Bem, minha orientadora, meus sinceros agradecimentos pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho e pelos ensinamentos e dedicação a mim propostos. Agradeço também por ser um exemplo de professora e pesquisadora, um exemplo de determinação.

À minha coorientadora Dra. Jade de Oliveira, pela amizade, pelo aprendizado e por sua total dedicação em me auxiliar em todas as fases de realização deste trabalho. Agradeço-a pela paciência, confiança e incentivo.

Aos meus colegas de laboratório: Cristine, Daiane, Daniel, Gianni, Jadna, Luana, Marcos, Marcus e Ruth pelas discussões científicas e contribuição para o engrandecimento do trabalho.

À Vinicola Pericó, em especial ao Sr. Wandér Weege, pela credibilidade, disposição e entusiasmo em estabelecer parceria conosco para executar este projeto.

Aos Professores membros da banca de qualificação do mestrado: Dra. Patrícia de Souza Brocardo e Dr. Rui Daniel S. Prediger, pelas críticas, sugestões e reflexões adicionais, que contribuíram dando maior consistência e qualidade à este trabalho.

À Samantha, pelas discussões científicas e importante colaboração na realização deste trabalho.

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

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

Aos meus pais, Sérgio e Tânia, pelo amor sem medidas, por terem sido o meu exemplo a seguir, por toda dedicação e preocupação com a minha educação, por todo apoio e incentivo nessa jornada, por tudo o que sou hoje.

Aos meus irmãos, Fernando e Pedro, pelo carinho a mim dedicado sempre, pela amizade e companheirismo e por sempre estarem por perto, me apoiando e comemorando todas as conquistas.

À CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro.

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

*“O que nos coloca em problemas não é aquilo que  
não sabemos. É o que sabemos com certeza, e  
simplesmente está errado”*  
(Mark Twain)





## RESUMO

Evidências clínicas e epidemiológicas apontam a hipercolesterolemia, particularmente a hipercolesterolemia familiar, como um fator de risco para o desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve, um estágio de transição entre o envelhecimento saudável e os primeiros sintomas da doença de Alzheimer. A hipercolesterolemia familiar é uma doença genética do metabolismo das lipoproteínas, caracterizada por níveis muito elevados de colesterol plasmático que levam à aterosclerose prematura, em consequência do prejuízo da função do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa demonstrou que camundongos nocautes para o receptor de LDL ( $LDLr^{-/-}$ ), modelo de hipercolesterolemia familiar, exibem prejuízos de memória e aprendizado, associados à disfunção colinérgica e ao estresse oxidativo no córtex pré-frontal e hipocampo. Desde a atribuição do Paradoxo Francês, os polifenóis presentes no vinho tinto têm sido indicados como agentes protetores de doenças cardiovasculares. Além disso, estudos recentes demonstram o papel protetor dessas moléculas antioxidantes em doenças neurodegenerativas, com particular ênfase na doença de Alzheimer. Dessa forma, hipotetizamos que o consumo regular moderado de vinho tinto é capaz de mitigar o desenvolvimento de comprometimento cognitivo e alterações neuroquímicas nos camundongos  $LDLr^{-/-}$ . Assim, avaliamos por testes comportamentais o efeito do consumo moderado de vinho tinto na locomoção, atividade motora e nos parâmetros cognitivos de aprendizado e memória dos animais  $LDLr^{-/-}$  submetidos à dieta padrão ou dieta hipercolesterolêmica. Além disso, determinamos a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e parâmetros antioxidantes nos tecidos cerebrais desses camundongos. Primeiramente, nós certificamos que a concentração alcoólica de 6% é segura para o consumo dos camundongos C57BL/6. Em seguida, nós observamos que a dieta hipercolesterolêmica causa um aumento nos níveis de colesterol total plasmáticos e dano hepático nos camundongos  $LDLr^{-/-}$ , o que não foi atenuado pelo consumo de vinho tinto. Os prejuízos de memória de curto e longo prazo observados nos camundongos  $LDLr^{-/-}$  tratados com dieta padrão e rica em colesterol foram revertidos pelo consumo de vinho. No entanto, os efeitos benéficos da bebida foram mais efetivos quando estes camundongos são expostos a uma dieta padrão. A atividade da AChE não foi modificada pela dieta hipercolesterolêmica ou pelo consumo moderado de vinho tinto. Além disso, não foram observadas alterações no sistema antioxidante vinculado à glutatona e nos níveis de peroxidação lipídica nas estruturas cerebrais estudadas após os tratamentos. Nosso conjunto de dados demonstrou que o

consumo diário e moderado de vinho tinto é capaz de melhorar o prejuízo cognitivo induzido pela hipercolesterolemia em camundongos, todavia, os mecanismos de ação pelos quais essa bebida possa estar atuando ainda não estão bem elucidados.

**Palavras-chave:** vinho tinto, flavonoides, hipercolesterolemia familiar, camundongos nocautes para o receptor de LDL, memória, neuroproteção.

## ABSTRACT

Clinical and epidemiological evidence have been reported that hypercholesterolemia, particularly familial hypercholesterolemia, as a risk factor for the development of mild cognitive impairment, a transitional stage between healthy aging and the earlier Alzheimer's disease. Familial hypercholesterolemia is a lipoprotein metabolism genetic disorder, characterized by high plasma cholesterol levels leading to premature atherosclerosis as a result of the loss of the low density lipoprotein (LDL) receptor function. In this regard, our research group has demonstrated that LDL receptor knockout ( $LDLR^{-/-}$ ) mice, a useful animal model of familial hypercholesterolemia, exhibit learning and memory impairments, which is associated with cholinergic dysfunction and antioxidant imbalance in prefrontal cortex and hippocampus. Since French Paradox attribution, red wine polyphenols and flavonoids are indicated as cardiovascular diseases protectors. In addition, it has been shown the protective effect of these antioxidant molecules in neurodegenerative diseases, with particular emphasis in Alzheimer's disease. In this way, we hypothesized that the regular red wine moderate consumption is be able to mitigate the development of cognitive impairments and neurochemical alterations in  $LDLR^{-/-}$  mice. Thus, we evaluated using behavioral tests the effect of red wine moderate consumption in locomotion, motor activity and learning and memory cognitive parameters of  $LDLR^{-/-}$  animals submitted to standard or hypercholesterolemic diet. Additionally, we determined the activity of the acetylcholinesterase (AChE) enzyme, as well as antioxidant and oxidative stress parameters in the brain tissue of these mice. Firstly, we noticed that the 6% alcohol concentration is safe for C57BL/6 mice consumption. After that, we found that hypercholesterolemic diet causes an increase in the total plasma cholesterol levels and liver damage in  $LDLR^{-/-}$  mice, which were not prevented by the consumption of red wine. The short and long term memory loss observed in  $LDLR^{-/-}$  mice treated with standard and high cholesterol diet were ameliorated by wine consumption. Notable, beneficial effects of the beverage were most effective when these mice were exposed to a standard diet. The AChE activity was not modified by hypercholesterolemic diet or red wine moderate consumption. In addition, no changes were observed in the glutathione system and levels of lipid peroxidation in both brain structures studied after treatments. Our data set shows that red wine daily and moderate consumption can improve the hypercholesterolemia cognitive impairment induced in mice, however, the mechanisms by which this drink may be acting are still unclear.

**Keywords:** red wine, flavonols, familial hypercholesterolemia, LDL receptor knockout mice, memory, neuroprotection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da evolução da placa aterosclerótica desde etapas iniciais de disfunção endotelial às etapas avançadas com a presença de placas de ateroma complicadas.	23
Figura 2	Estrutura do receptor de LDL.	24
Figura 3	Diagrama representando a via endocítica mediada pelo receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL).	25
Figura 4	Descrição representativa das funções do colesterol nos neurônios.	29
Figura 5	Esquema do desenho experimental 1: A concentração alcoólica de 6% é segura para o tratamento de camundongos C57BL/6.	40
Figura 6	Esquema do desenho experimental 2: As alterações cognitivas induzidas pela hipercolesterolemia podem ser moduladas pelo consumo moderado de vinho.	41
Figura 7	Efeito do consumo moderado de vinho tinto 6% e etanol 6% em relação aos níveis plasmáticos das transaminases aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama glutamil transferase em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem.	49
Figura 8	Efeito do consumo moderado de vinho tinto 6% e etanol 6% sobre a locomoção e atividade motora de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem.	50
Figura 9	Avaliação dos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos em camundongos LDLr <sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta padrão e dieta hipercolesterolêmica.	51
Figura 10	Avaliação dos níveis plasmáticos das transaminases em camundongos LDLr <sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta padrão e dieta hipercolesterolêmica (HC).	52
Figura 11	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto sobre a locomoção espontânea e atividade motora de camundongos LDLr <sup>-/-</sup> .	53
Figura 12	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto sobre a cognição de camundongos LDLr <sup>-/-</sup> .	54
Figura 13	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto sobre a memória de longa duração de camundongos LDLr <sup>-/-</sup> .	55
Figura 14	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto na atividade da AChE de camundongos LDLr <sup>-/-</sup> no córtex pré-frontal e hipocampo.	56
Figura 15	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto sobre o sistema antioxidante vinculado à GSH de camundongos LDLr <sup>-/-</sup> no córtex pré-frontal e hipocampo.	57
Figura 16	Avaliação da dieta hipercolesterolêmica e do consumo	58

moderado de vinho tinto sobre os dos níveis de peroxidação lipídica (ensaio de TBARS) no (A) córtex pré-frontal e (B) hipocampo de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

A $\beta$  – Peptídeo  $\beta$ - amiloide  
AChE – acetilcolinesterase  
ALT – alanina aminotransferase  
ANOVA – Análise de variância  
apoB – apolipoproteína B  
apoE – apolipoproteína E  
APP – Proteína precursora amiloide  
AQP-4 – Aquaporina 4  
AST – aspartato aminotransferase  
BACE-1 –  $\beta$ -secretase  
BHE – Barreira hematoencefálica  
COX-2 – ciclooxigenase 2  
CCL – Comprometimento cognitivo leve  
DTNB – cido 5',5 – ditiobis-2- nitrobenzico  
EPM – erro padrão da média  
GPx – Glutaciona peroxidase  
GR – Glutaciona redutase  
GSH – Glutaciona  
GFAP – Proteína cida fibrilar glial  
GGT – glutamil traspeptidase  
GSSH – glutaciona oxidada  
HDL – Lipoprotena de alta densidade  
HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA  
i.c.v. – intracerebroventricular  
iNOS – xido nítrico sintase induzvel  
IDL – Lipoprotena de densidade intermediria  
LDL – Lipoprotena de baixa densidade  
LDLr – Receptor da lipoproteína de baixa densidade  
LDLRAP1 – proteína adaptadora de receptores de LDL  
LRP-1 – Proteína 1 relacionada ao receptor de LDL  
NADPH – Nucleotídeos piridinas no estado reduzido  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
Nrf2 – fator de transcrição relacionado ao fator E2  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
OPT – ortoftalaldedo  
PCSK9 – Pr-proteína convertase subutilisina / Kexina tipo 9  
RAGE – Receptor de produtos de glicação avançada  
SIRT-1 – sirtuína-1  
QM – Quilomícrons

SNC – Sistema nervoso central

TBA – ácido tiobarbitúrico

TNB – ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico

VLDL – Lipoproteínas de muita baixa densidade



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1. Metabolismo do colesterol	21
1.2. Hipercolesterolemia Familiar	26
1.3. Colesterol e as alterações no Sistema Nervoso Central	28
1.4. O consumo de vinho e seus efeitos na saúde	32
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
3.1. Objetivo Geral	37
3.2. Objetivos Específicos	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
4.1. Reagentes	38
4.2. Animais	38
4.3. Tratamento	38
4.4. Desenhos experimentais	39
<b>4.4.1. Experimento 1: A concentração alcoólica de 6% é segura para o tratamento de camundongos C57BL/6</b>	<b>39</b>
<b>4.4.2. Experimento 2: As alterações cognitivas induzidas pela hipercolesterolemia podem ser moduladas pelo consumo moderado de vinho</b>	<b>40</b>
4.5. Testes comportamentais	42
<b>4.5.1. Teste do campo aberto</b>	<b>42</b>
<b>4.5.2. Teste da realocação do objeto</b>	<b>42</b>
<b>4.5.3. Teste do reconhecimento do objeto</b>	<b>43</b>
<b>4.5.4. Teste do Rotarod</b>	<b>43</b>
<b>4.5.5. Teste do labirinto aquático de Morris</b>	<b>43</b>
4.6. Análise dos níveis de lipídeos plasmáticos	44
4.7. Análise dos níveis das transaminases	44
4.8. Preparação de homogenatos teciduais	44
4.9. Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	45
4.10. Sistema antioxidante vinculado à glutathiona (GSH)	45
4.11. Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	46
4.12. Níveis de proteínas	47
4.13. Análises estatísticas	47
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>48</b>
5.1. Experimento 1: A concentração alcoólica de 6% é segura para o tratamento de camundongos C57BL/6	48
5.2. Experimento 2: As alterações cognitivas induzidas pela	50

hipercolesterolemia podem ser moduladas pelo consumo moderado de vinho

<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1964, aos três anos de idade, John Despota foi encaminhado pela primeira vez ao médico por possuir xantomas de gordura pelo corpo, os quais eram resultado dos níveis de colesterol total no sangue cerca de seis vezes acima do limite normal. Aos 12 anos de idade, John já apresentava sinais de angina. O garoto foi diagnosticado com hipercolesterolemia familiar, e amostras de células cutâneas do paciente e de seus pais foram enviadas a dois jovens pesquisadores que nesta mesma época estudavam a biologia do metabolismo do colesterol celular. A partir de experimentos com as células deste paciente, os pesquisadores Michael Brown e Joseph Goldstein descobriram receptores de superfície celular capazes de internalizar a lipoproteína de baixa densidade (LDL) circulante, os quais foram denominados receptores de LDL. Além disso, Brown e Goldstein atribuíram as mutações no gene que codifica este receptor a causa da hipercolesterolemia familiar (Nair, 2013). Essas descobertas foram determinantes para a elucidação das bases moleculares, bioquímicas e genéticas da doença, ampliando o conhecimento existente sobre o metabolismo do colesterol e das lipoproteínas plasmáticas (Goldstein e Brown, 1973, 1974, 2009; Brown e Goldstein, 1974, 1986); e renderam aos pesquisadores o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1985 (Brown e Goldstein, 1986; Nair, 2013).

### 1.1. Metabolismo do colesterol

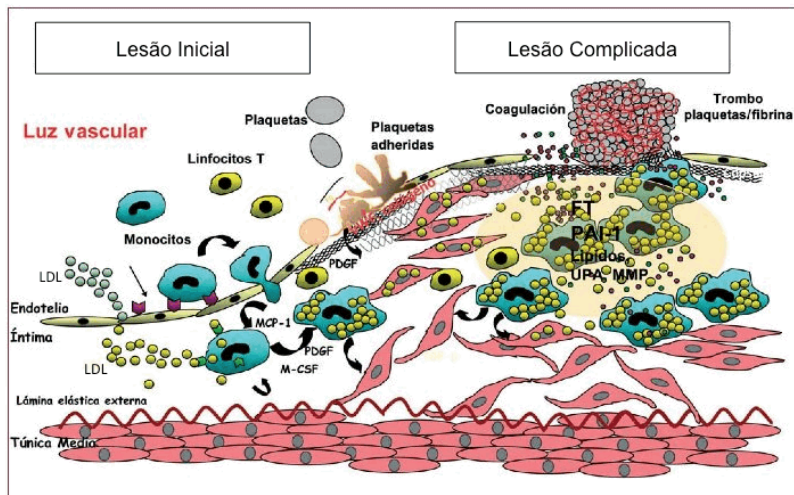
O colesterol é um lipídeo essencial para o funcionamento das células animais, compondo estruturalmente as membranas celulares, sendo o precursor biossintético de hormônios esteroides, ácidos biliares e vitamina D, além de desempenhar um papel crítico nos processos de sinalização e proliferação celular (Yeagle, 1991; Simons e Ikonen, 2000; Goedeke e Fernández-Hernando, 2012). Apesar de sua extrema importância, níveis alterados dessa molécula acabam por se tornar altamente prejudiciais às células do organismo, levando à uma diversidade de doenças, e.g., doenças cardiovasculares associadas à aterosclerose (Maxfield e Tabas, 2005; Ikonen, 2006).

O colesterol é obtido por meio da síntese celular, como fonte endógena, ou ainda de forma exógena, proveniente da dieta (Nelson e Cox, 2011). A via de síntese endógena do colesterol ocorre principalmente no fígado. No sangue, devido sua hidrofobicidade, o colesterol necessita ser transportado pelas lipoproteínas plasmáticas. Estas por sua vez, unem-se aos lipídeos formando diferentes classes de partículas lipoproteicas,

esferas cujo centro é composto pelos lipídeos hidrofóbicos e a superfície pelas proteínas (apolipoproteínas), das quais as cadeias laterais são hidrofílicas (Hegele, 2009; Nelson e Cox, 2011).

Após sua absorção no lúmen intestinal, o colesterol e outros lipídeos oriundos da dieta são transportados nos quilomícrons (QM), as maiores e menos densas lipoproteínas, compostas por alta proporção de triglicerídeos. Grande parte desses triglicerídeos é liberada nos tecidos, em que serão consumidos ou armazenados como combustíveis, e os QM remanescentes movem-se pelos capilares sanguíneos até o fígado, onde são captados. No fígado, o colesterol pode ser esterificado, convertido em ácidos biliares, secretado na bile ou empacotado em macromoléculas hidrossolúveis, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), para ser transportado aos tecidos extra-hepáticos, muscular e adiposo principalmente. Nesses tecidos, a VLDL é convertida gradualmente em LDL, responsável pelo transporte do colesterol para os tecidos periféricos ou de volta para o fígado. A endocitose de LDL é regulada pelo receptor de LDL e pela apolipoproteína B100 (apoB100) (Vance e Vance, 2008; Nelson e Cox, 2011). A lipoproteína de alta densidade (HDL) é o último dos principais tipos de lipoproteínas, rica em proteína com relativamente pouco colesterol, e que possui como principal função o transporte reverso de colesterol (Lewis e Rader, 2005).

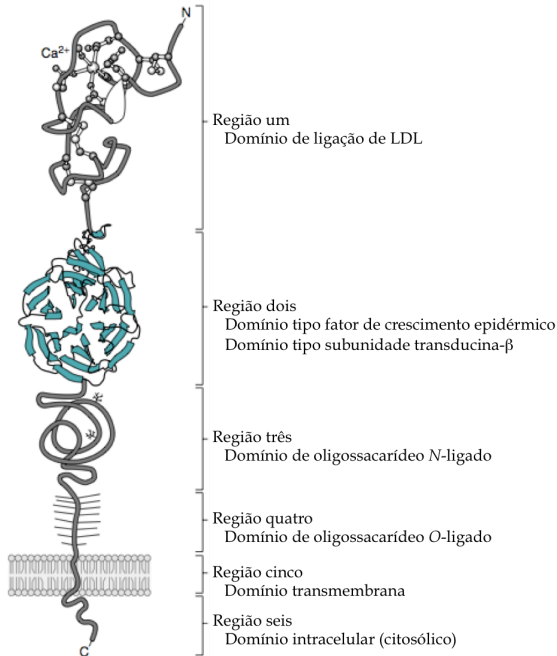
Quando há um excesso de partículas de LDL no sangue, essa captação específica mediada por receptor pelos tecidos se torna saturada, havendo disponibilidade, nessas circunstâncias, para a captação não específica de LDL por macrófagos presentes próximos às células endoteliais das artérias. Sabe-se que a exposição das células endoteliais vasculares a altos níveis de LDL causa disfunção do endotélio, consequentemente aumentando a permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas (Badimón et al., 2009). Na camada íntima, as partículas de LDL sofrem oxidação, induzindo uma resposta inflamatória e a disfunção endotelial caracterizada pelo surgimento de moléculas de adesão leucocitária (monócitos e linfócitos) na superfície endotelial e comprometimento na biodisponibilidade do óxido nítrico (Llorente-Cortes e Badimón, 2005; Gleissner et al., 2007). Os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL oxidadas. Os macrófagos repletos de gorduras são chamados células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões iniciais que levam à formação de placas de ateroma ricas em colesterol nas paredes dos vasos, um processo que, como demonstrado na Figura 1, sugere-se que inicie a complexa cascata da aterosclerose.



**Figura 1:** Representação esquemática da evolução da placa aterosclerótica desde etapas iniciais de disfunção endotelial às etapas avançadas com a presença de placas de ateroma complicadas.

FT: fator tissular; M-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos; MMP: metaloproteinasas; PAI-1: inibidor de plasminogênio tipo-1 ativado; PDGF: fator de crescimento plaquetário; UPA: ativador de plasminogênio tipo uroquinasa (adaptado de Badimón et al., 2009).

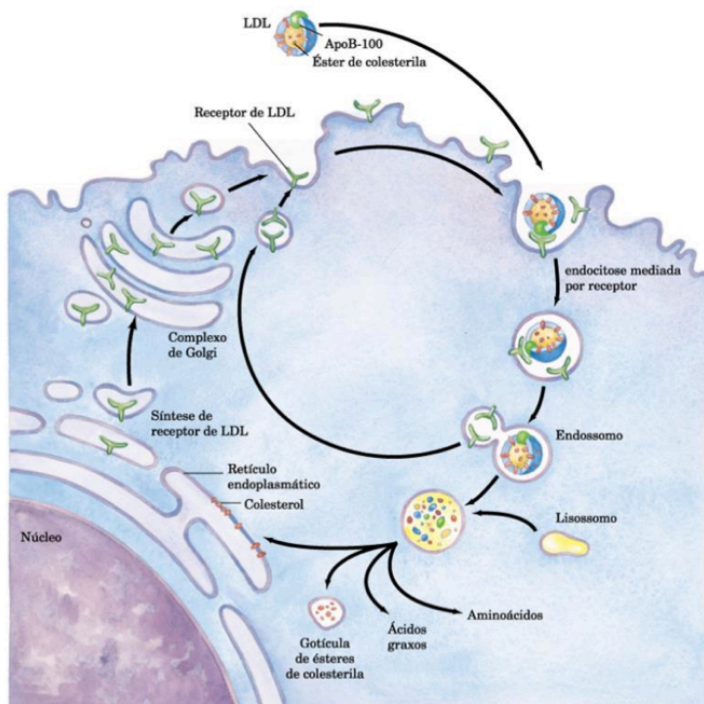
O receptor de LDL é o protótipo de uma família de receptores de superfície celular, que reconhece especificamente a apoB100 e a apolipoproteína E (apoE). Essa família de receptores também tem como membros a proteína 1 relacionada ao receptor de LDL (LRP-1), o receptor da VLDL, o receptor 2 de apoE, a megalina dentre outros, todos sendo funcional e estruturalmente relacionados ao receptor de LDL (Li et al., 2001). No entanto, a diversidade funcional e estrutural desta família de receptores se dá devido às diferenças na posição e no número de cada um dos domínios estruturais (Go e Mani, 2012). Estes receptores são compostos por seis domínios diferentes, conforme representado na Figura 2. É no primeiro domínio, na extremidade amino, que encontra-se a região de ligação dos ligantes, uma sequência de 40 resíduos rica em cisteína (Smith et al., 2007), responsável pela captação de moléculas extracelulares para a degradação celular, usualmente provendo nutrientes essenciais para o desempenho das funções celulares (Hussain et al., 1999).



**Figura 2:** Estrutura do receptor de LDL. A proteína tem seis regiões principais, as quais são: domínio de ligação de LDL (1), domínio tipo fator de crescimento epidérmico / domínio tipo subunidade transducina-β (2), domínio de oligossacarídeo N-ligado (3), domínio de oligossacarídeo O-ligado (4), domínio transmembrana (5) e domínio intracelular (6) (adaptado de Smith et al., 2007).

A principal função do receptor de LDL é ligar-se a partículas de lipoproteínas circulantes contendo colesterol (principalmente a LDL) mediando sua remoção e catabolismo (Figura 3) (Brown e Goldstein, 1986; Hobbs et al., 1992). No metabolismo celular da LDL, a apoB100 presente na superfície da lipoproteína liga-se ao receptor de LDL. Em seguida, ocorre a endocitose do complexo receptor-LDL, levando à formação de vesículas endocíticas, ou endossomos, onde a LDL se dissocia do receptor devido ao pH ácido. O receptor de LDL, 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 ocorre a fusão das membranas do endossomo e lisossomo. 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 citoplasma, 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 modula mecanismos que irão regular o conteúdo de colesterol celular: (i) inibe a síntese de colesterol; (ii) facilita sua esterificação e armazenamento; e (iii) inibe a síntese de receptores de LDL, evitando assim, que outras partículas de lipoproteínas sejam internalizadas, 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 representando a via endocítica mediada pelo receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL). A LDL circulante se liga ao receptor de LDL presente na superfície celular por meio de sua molécula de apolipoproteína B100 (apoB100), sendo endocitada e metabolizada, o que faz deste receptor a molécula fundamental para a homeostase do colesterol plasmático (adaptado de Nelson e Cox, 2011).

O número de receptores de LDL, a ligação da LDL a esses receptores e o processo de endocitose podem estar diminuídos por uma

variedade de razões, acarretando em elevadas concentrações de LDL no sangue e aterosclerose prematura. Essas anormalidades podem resultar de mutações em um ou ambos alelos para o receptor de LDL, caracterizando a hipercolesterolemia familiar (Smith et al., 2007).

## **1.2. Hipercolesterolemia Familiar**

A hipercolesterolemia familiar é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um problema de saúde mundial, e estima-se que existam atualmente cerca de 20 milhões de pessoas no mundo acometidas por esta doença (Santos et al., 2012; Watts et al., 2014). No Brasil, os números chegam a aproximadamente 300 mil indivíduos acometidos (Santos et al., 2012). A hipercolesterolemia familiar é uma doença autossômica codominante do metabolismo das lipoproteínas, sendo considerada um dos mais comuns distúrbios metabólicos derivados de alterações genéticas. Essas anormalidades derivam, principalmente, de mutações no gene que codifica o receptor da LDL, as quais representam 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 (Nordestgaard et al., 2013), podendo ocorrer em um (heterozigose) ou ambos (homozigose) alelos (Khachadurian, 1964).

A hipercolesterolemia familiar heterozigótica é consideravelmente comum, com uma prevalência de cerca de 1 em 200 indivíduos (Ridker, 2014). Os indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar heterozigotos produzem aproximadamente metade dos receptores de LDL funcionais, o que causa um aumento de duas a três vezes na concentração de LDL no plasma (níveis de colesterol total entre 300 e 400 mg/dL). Em contraste, a forma mais rara de HF, homozigótica, apresenta uma prevalência de 1 em 300.000 pessoas, na qual ambos os alelos do gene do receptor de LDL estão mutados e a função do receptor de LDL é reduzida severamente ou está completamente ausente. Esse grupo de indivíduos possui níveis de LDL plasmáticos elevados de seis a dez vezes desde o nascimento (níveis de colesterol total acima de 500 mg/dL) (Khachadurian, 1964; Brown e Goldstein, 1986; Rader et al., 2003; Ridker, 2014).

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 à hipercolesterolemia familiar (Myant, 1993; Civeira et al., 2004).

As principais manifestações clínicas da hipercolesterolemia familiar, as quais são consequências diretas do excesso de LDL na circulação sanguínea, são a presença de xantomas tendinosos, mais comumente observados no tendão de Aquiles e nos tendões extensores dos dedos; xantelasma de pálpebras; e placas ateroscleróticas nos vasos arteriais de médio e grande calibre (Khachadurian, 1964; Goldstein e Brown, 1977; Soufi et al., 2002; Santos et al., 2012).

De fato, o desenvolvimento acelerado e prematuro de aterosclerose é o principal sintoma clínico da hipercolesterolemia familiar, associado ao risco particularmente aumentado de doença arterial coronariana prematura. Dados clínicos demonstram que os indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar heterozigotos são susceptíveis a sofrer infarto do miocárdio a partir dos 30 anos de idade (Brown e Goldstein, 1986; Ridker, 2014). De forma ainda mais relevante, os níveis altos de LDL plasmáticos desde o nascimento em indivíduos homozigotos potencialmente levam ao infarto agudo do miocárdio já no início da infância, antes dos 15 anos de idade (Brown e Goldstein, 1986; Ridker, 2014).

A relação estabelecida acerca da hipercolesterolemia e da aterosclerose culminou em uma série de ensaios clínicos de larga escala, que mostraram conclusivamente que a correção da primeira ocasiona uma redução significativa na morbidade e mortalidade por doença arterial coronariana (Steinberg, 2002). Não surpreendentemente, a elucidação do papel do colesterol na patogênese da aterosclerose é frequentemente referida como uma das grandes descobertas do século XX (Mehta e Khan, 2002). Nesse sentido, o principal objetivo no tratamento dos pacientes com hipercolesterolemia familiar vem sendo reduzir a incidência de infartos do miocárdio, bem como a mortalidade cardiovascular prematura (Reiner et al., 2011).

Até o final da década de 1980, as opções clínicas para o tratamento da hipercolesterolemia em geral, se limitavam a mudanças na dieta e fármacos sequestradores de ácidos biliares, os quais resultavam em pouca eficácia, uma vez que os níveis plasmáticos de colesterol eram reduzidos em cerca de 10% apenas (Simons e Williams, 1976). Após o desenvolvimento das estatinas, fármacos inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima limitante da síntese

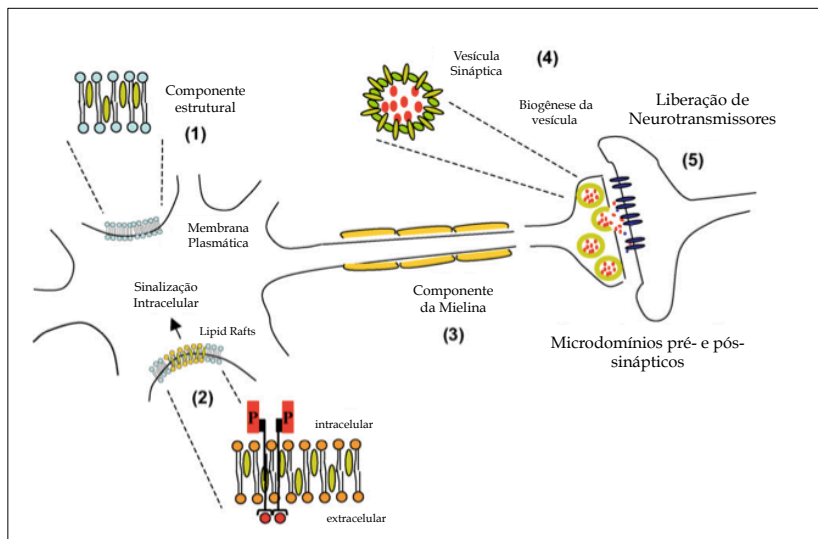
do colesterol (Endo, 2008) a hipercolesterolemia, particularmente a hipercolesterolemia familiar, passou a ter um tratamento mais eficaz.

As estatinas, ao inibirem a biossíntese do colesterol, acabam por diminuir o conteúdo intra-hepático de colesterol livre e com isso regulam 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). Inúmeros estudos clínicos vêm demonstrando que as estatinas reduzem o risco de eventos cardiovasculares em indivíduos com hipercolesterolemia familiar (The Long-Term Intervention With Pravastatin in Ischaemic Disease Study Group, 1994; Nakamura et al., 2006) e, com isso, a expectativa de vida desses indivíduos tem aumentado significativamente (Scientific Steering Committee on Behalf of the Simon Broome Register Group. Mortality in Treated Heterozygous Familial Hypercholesterolemia: Implications for Clinical Management, 1999). O tratamento mais recentemente desenvolvido para indivíduos hipercolesterolêmicos é uso de anticorpos monoclonais contra a PCSK9, protease responsável pela degradação dos receptores de LDL, reduzindo em até 70% os níveis de colesterol LDL com hipercolesterolemia familiar heterozigótica (Stein et al., 2012; Raal et al., 2012).

É importante mencionar, que este aumento da expectativa de vida da população devido ao avanço no tratamento de doenças associadas a uma alta mortalidade, como é o caso das doenças cardiovasculares particularmente a hipercolesterolemia familiar, vem levando ao aumento na prevalência de patologias associadas ao envelhecimento, como as doenças neurodegenerativas (Casserly e Topol, 2004; Beach et al., 2007).

### **1.3. Colesterol e as Alterações no Sistema Nervoso Central**

Embora represente apenas 2% da massa corporal total, o sistema nervoso central (SNC) é o órgão mais rico em colesterol, constituindo aproximadamente 23% do colesterol do corpo (Wilson et al., 1968). Além de componente estrutural da mielina e de membranas, o colesterol também desempenha papel essencial na propagação e manutenção da transdução de sinal (Paratcha and Ibanez, 2002), bem como em eventos como sinaptogênese e liberação de neurotransmissores (Figura 4) (Thiele et al., 2000; Mauch et al., 2001).



**Figura 4:** Descrição representativa das funções do colesterol (verde) nos neurônios. O colesterol é o principal componente estrutural das membranas (1) e também encontra-se concentrado em microdomínios (ou balças lipídicas) na membrana plasmática, a fim de organizar os eventos de transdução de sinais desencadeados por diferentes fatores neurotróficos e seus receptores (2). Até 70% do colesterol do cérebro está associado à mielina (amarelo) (3). Finalmente, o colesterol desempenha um papel crucial durante sinaptogênese (4) e liberação de neurotransmissores nos microdomínios pré e pós-sinápticos (5) (adaptado de Valenza e Cattaneo, 2006).

Por outro lado, evidências acumuladas ao longo das duas últimas décadas sugerem que elevados níveis de colesterol total no plasma sanguíneo seriam um fator de risco para o desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve (CCL) e doença de Alzheimer (Sparks et al., 1990, 1994; Notkola et al., 1998; Solomon et al., 2009; Kivipelto et al., 2001, 2002, 2005; Zambón, 2010). Os estudos tiveram início 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 doença arterial coronariana também apresentavam placas amiloides em seus cérebros. Dados estes, confirmados posteriormente pelos mesmos pesquisadores (1994) utilizando coelhos submetidos a um tratamento crônico com dieta rica em colesterol. Os coelhos que foram alimentados durante 8 semanas com uma dieta rica em

colesterol apresentaram acúmulo de placas amiloides e outros sinais patológicos relacionados a doença de Alzheimer (Sparks et al., 1994).

Da mesma forma, os estudos epidemiológicos vêm demonstrando que indivíduos hipercolesterolêmicos possuem maior susceptibilidade ao desenvolvimento de comprometimento cognitivo (Kivipelto et al., 2001, 2002, 2005). Kivipelto e seus colaboradores (2001) por meio de um estudo de coorte demonstraram que indivíduos com níveis de colesterol elevados na meia-idade preenchem os critérios para CCL em idades mais avançadas.

Mais recentemente, em um estudo clínico realizado por Zambón e colaboradores (2010), foi demonstrado que indivíduos de meia-idade com hipercolesterolemia familiar apresentam um aumento particular na incidência de desenvolvimento de CCL, em relação àqueles normais, e que a exposição precoce a altos níveis de colesterol e/ou a disfunção de receptores de lipoproteínas, i.e., receptor de LDL, são os principais fatores envolvidos. Nosso grupo de pesquisa utilizando camundongos nocautes para o receptor de LDL ( $LDLr^{-/-}$ ), experimentalmente corroborou esses dados clínicos (Moreira et al., 2012). Nós observamos que camundongos  $LDLr^{-/-}$  de “meia-idade” (quatorze meses) apresentam prejuízos de memória e aprendizado em diversos testes comportamentais realizados, o que foi associado a um aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e desbalanço oxidativo no córtex pré-frontal (região cerebral relacionada com processos de aprendizado e memória) (Ramirez et al., 2011; Moreira et al., 2012).

Os camundongos  $LDLr^{-/-}$  são um modelo animal de hipercolesterolemia familiar humana amplamente utilizado como modelo de doenças cardiovasculares, os quais foram desenvolvidos e descritos por Ishibashi e colaboradores nos anos 90 (Ishibashi et al., 1993; Zedelaar et al., 2001). Esses animais apresentam níveis moderados de colesterol LDL, quando submetidos a uma dieta padrão, podendo desenvolver lesões ateroscleróticas a longo prazo. No entanto, ao serem submetidos a uma dieta rica em colesterol, tornam-se severamente hipercolesterolêmicos, com a presença de xantomas subcutâneos, além de aterosclerose aórtica intensamente desenvolvida (Ishibashi et al., 1993).

De acordo com os dados experimentais pioneiros obtidos por Mulder e colaboradores (2004), esses animais hipercolesterolêmicos, aos 6 meses de idade, já apresentam comprometimento de memória espacial e de trabalho. Os autores, nesse trabalho e em um trabalho subsequente (Mulder et al., 2007), correlacionaram os prejuízos de memória e aprendizado com uma diminuição na proliferação celular e densidade sináptica hipocâmpais. Ademais, nosso grupo de pesquisa demonstrou que camundongos  $LDLr^{-/-}$

de três meses de idade apresentam prejuízo de memória espacial de referência e que quando estes animais são tratados com uma dieta hipercolesterolêmica, os déficits cognitivos são associados a uma situação de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial no córtex cerebral (de Oliveira et al., 2011). Recentemente, demonstramos que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> são mais susceptíveis à neurotoxicidade induzida pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo beta-amiloide 1-40 (A $\beta$ <sub>1-40</sub>). Em comparação com os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentam maior ativação glial, dano de membrana celular, permeabilidade da BHE, e desbalanço oxidativo no hipocampo após a administração do A  $\beta$  1-40 (de Oliveira et al., 2014).

O termo comprometimento cognitivo leve descreve uma síndrome na qual se observa um declínio cognitivo maior do que o esperado para a idade e nível de educação de um indivíduo. De maneira mais precisa, é definido como o período de transição entre o envelhecimento normal e os primeiros sintomas de demência, particularmente a doença de Alzheimer (Petersen et al., 1999, 2001, 2014; Gauthier et al., 2006). Segundo estudos epidemiológicos, a prevalência de CCL varia de 7% a 19% em adultos com mais de 65 anos (Ganguli et al., 2010; Petersen et al., 2010; Ward et al., 2012). Nos indivíduos com CCL a taxa de conversão para a doença de Alzheimer é em torno de 10 a 15% ao ano, contrastando com a de indivíduos normais, que possuem uma taxa de 1 a 2% ao ano (Bruscoli e Lovestone, 2004).

Por sua vez, a doença de Alzheimer é a principal forma de demência e acomete cerca de 36 milhões de indivíduos em todo o mundo, sendo esperado que estes números estejam triplicados em 2050 (Wisniewski e Goñi, 2014). Esta neuropatologia é clinicamente caracterizada pela irreversível e progressiva perda de memória e aprendizado, incapacidade de desempenhar as atividades diárias, (Sereniki, 2008) bem como por distúrbios comportamentais (Raskind, 1995). Histopatologicamente, ocorre uma maciça perda de neurônios colinérgicos, sendo a formação hipocampal a primeira estrutura cerebral a ser afetada, acompanhada pelo córtex cerebral e amígdala (Selkoe, 2001; Mimura, 2008). Estudos apontam a deposição do A $\beta$  no parênquima cerebral como o início da cascata patológica da doença, juntamente com a formação dos emaranhados neurofibrilares intracelulares, resultantes da hiperfosforilação da proteína tau (Hardy e Higgins, 1992; Querfurth e Laferla, 2010). Segundo a hipótese da cascata amiloide, o acúmulo e a agregação do peptídeo A $\beta$  iniciariam uma sequência de eventos que culminaria na ativação de células gliais, alterações sinápticas, e perda

neuronal progressiva associada ao prejuízo cognitivo (Hardy e Higgins, 1992).

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para a doença de Alzheimer torna-se complicado, uma vez que os mecanismos patofisiológicos da doença ainda não foram bem elucidados. Atualmente, os principais fármacos utilizados no tratamento da doença são direcionados ao prejuízo da transmissão colinérgica no SNC, o qual está fortemente associado aos sintomas cognitivos (Bartus, 2000); juntamente com antagonistas não competitivos de moderada afinidade dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Mount e Downton, 2006). Ao aumentar a disponibilidade de acetilcolina no cérebro, os inibidores da AChE (donepezil, rivastigmina e galantamina) fornecem uma melhora dos sintomas clínicos da doença de Alzheimer, retardando por algum tempo o declínio da função cognitiva e capacidade funcional dos indivíduos (Jacobsen, 2002; Nygaard, 2013). De modo notório, em um recente trabalho de nosso grupo de pesquisa demonstramos que o donepezil é capaz de reverter os danos cognitivos observados nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup> (Lopes et al., 2015).

Outra abordagem interessante para diminuir a prevalência de CCL e demência é o uso de intervenções nutricionais, uma vez que mudanças no estilo de vida, como modificações dietéticas parecem ser estratégias importantes para retardar o aparecimento da doença (Shai et al., 2010; Gu et al., 2014).

#### **1.4. O consumo de vinho e seus efeitos na saúde**

Em 1992 foi designado o termo Paradoxo Francês, para descrever a incidência relativamente baixa de doenças cardiovasculares em determinadas populações francesas, apesar da alta ingestão de gorduras saturadas e de não haver relação ao aumento dos níveis plasmáticos de HDL-colesterol (Renauld e Lorgeril, 1992). Uma possível explicação para este fenômeno tem sido associada ao alto consumo de vinho (20-30 g / dia) dessas populações. Embora a ingestão moderada de álcool é, de um modo geral, "benéfica", alguns efeitos mais específicos parecem estar relacionadas com vinho tinto. O consumo de vinho tinto parece promover maiores efeitos protetores do que o consumo de outras bebidas contendo álcool (Baur e Sinclair, 2006). Além de etanol, o vinho tinto contém uma ampla gama de derivados de polifenóis da casca da uva, com atividades biológicas importantes (Soleas et al., 1997), responsáveis pela diminuição da agregação plaquetária, por exemplo. De fato, o principal efeito benéfico dessa bebida contra o desenvolvimento da aterosclerose seria devido à

atividade antioxidante de seus polifenóis, especificamente os flavonoides (Siemann e Creasy, 1992). Neste sentido, um estudo realizado em colaboração ao nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento com frações não alcoólicas de vinho tinto reduziu a progressão da aterosclerose em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, ao preservar a vasodilatação induzida pela acetilcolina na aorta torácica isolada destes animais (Hort et al., 2012).

Ademais, estudos pré-clínicos recentes apontam papel protetor dos polifenóis na função cognitiva e redução do risco de neurodegeneração (Wang et al., 2006; Ho et al., 2009; Lourida et al., 2013; Parletta et al., 2013). Wang e colaboradores (2006) demonstraram que os flavonoides presentes no vinho tinto são capazes de atenuar o prejuízo de memória espacial em camundongos Tg2576 (modelo de camundongos transgênicos para a doença de Alzheimer). A melhora na cognição induzida pelo tratamento com vinho foi atribuída ao aumento do processamento da proteína precursora amiloide (APP) pela via não amiloidogênica, prevenindo a geração de A $\beta$  no cérebro e atenuando a neuropatologia mediada por esse peptídeo. Este mesmo efeito foi observado em culturas primárias de neurônios derivadas de embriões de camundongos Tg2576 tratados com os polifenóis oriundos do vinho tinto (Wang et al., 2006).

Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* também indicaram que o resveratrol (um dos principais flavonoides presentes no vinho tinto) reduz a toxicidade amiloide pela diminuição da produção de A $\beta$  através da ativação dependente de sirtuína de uma proteína contendo o domínio de metaloproteínase 10 (Donmez et al., 2010). O composto também aumenta a depuração e metabolismo do peptídeo por meio da proteína cinase ativada por AMP e pode induzir a degradação autofágica e lisossomal do A $\beta$  (Marambaud et al., 2005; Vingtdoux et al., 2010). A quercetina, outro flavonoide comumente encontrado no vinho, possui potencial uso nutracêutico e farmacêutico (Priprem et al., 2008), devido às suas propriedades antioxidantes e capacidade de inibir a peroxidação lipídica *in vitro* (Fiorani et al., 2010). Além disso, a quercetina exerce efeitos neuroprotetores aumentando a resistência dos neurônios ao estresse oxidativo e excitotoxicidade, através da modulação dos mecanismos de morte celular, (Choi et al., 2014) e produzindo efeitos antiinflamatórios através da inibição da proteína óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e regulação da expressão da proteína ciclooxygenase 2 (COX-2) (Garcia-Mediavilla et al., 2007). De forma interessante, um estudo recente mostra que o tratamento com quercetina é capaz de melhorar a reatividade astrogliar e microglial na região CA1 do hipocampo de animais 3xTg-AD (modelos da doença de Alzheimer), além de melhorar o desempenho

comportamental cognitivo e emocional nesses animais de 21 a 24 meses de idade (Sabogal-Guáqueta et al., 2015).

Os efeitos do vinho tinto sobre a deposição e fosforilação da proteína tau têm sido menos investigados. No entanto, a ativação da sirtuína-1 (SIRT1) mediada pelo resveratrol pode conduzir a desacetilação direta da proteína tau acetilada, promovendo assim a sua degradação proteossômica (Min et al., 2010). Da mesma forma, Pasinetti (2012) demonstrou que os polifenóis derivados da uva, e comumente encontrados no vinho tinto, poderiam modular as respostas neuropatológicas mediadas pela proteína tau, incluindo a redução de sua agregação. Recentemente, um estudo utilizando o modelo de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans* CL2006, demonstrou que o resveratrol reduziu a agregação e toxicidade induzida pelo A $\beta$  (Regitz et al., 2015).

Tendo em mente o acima exposto, podemos apontar o consumo moderado de vinho tinto como uma possível estratégia para prevenir e retardar o desenvolvimento de prejuízos de memória e aprendizado na hipercolesterolemia familiar.



## 2. JUSTIFICATIVA

A hipercolesterolemia familiar é uma condição genética grave, que resulta em elevados níveis de LDL circulantes e está relacionada a 10% dos casos de eventos cardiovasculares em pessoas abaixo de 50 anos e altos índices de morbidade e mortalidade. De fato, as doenças cardiovasculares são, atualmente, a principal causa de morte no mundo e o risco de um portador de hipercolesterolemia familiar na forma heterozigótica não tratado de desenvolver doença coronária chega a 50% nos homens e 12% das mulheres aos 50 anos de idade. Estudos epidemiológicos com portadores de hipercolesterolemia familiar mostram que a principal causa de morte entre esses indivíduos é a doença arterial coronariana. Segundo a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (2012), estima-se que, no mundo todo, existam cerca de 20 milhões de indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar. No entanto, a maioria dos casos são subdiagnosticados. Ainda segundo a Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar, menos de 10% dos portadores possuem diagnóstico conhecido da doença, e menos de 25% recebem tratamento adequado, apontando um impacto na saúde pública ainda mais relevante.

Em paralelo, outro fenômeno de caráter mundial é o expressivo aumento da expectativa de vida e, conseqüentemente, da população idosa. Embora os dados reflitam um claro avanço na qualidade de vida da população, há também o alerta para a possibilidade do aumento significativo do número de pessoas que sejam acometidas por doenças relacionadas à idade, dentre elas a doença de Alzheimer. Diversas linhas de evidência indicam a hipercolesterolemia como um fator de risco para a doença de Alzheimer, e que particularmente a hipercolesterolemia familiar estaria fortemente relacionada com o desenvolvimento de prejuízos cognitivos. As conseqüências da mutação no gene que codifica para o receptor de LDL estão potencialmente relacionadas à patofisiologia da doença de Alzheimer.

Tendo em mente que a doença de Alzheimer é multifatorial, e que na maioria dos casos resulta da interação de fatores genéticos e ambientais durante toda a vida, a busca por terapias que possam prevenir e intervir no seu desenvolvimento principalmente atenuando os efeitos causados pelos principais fatores de risco, dentre eles a hipercolesterolemia, torna-se imperativa. Nesse sentido, desde a atribuição do Paradoxo Francês, em 1992, inúmeros estudos apontam os flavonoides presentes no vinho tinto como protetores de doenças cardiovasculares. Além disso, trabalhos recentes na literatura demonstram o papel neuroprotetor dessas moléculas

em modelos de doenças neurodegenerativas, com particular ênfase na doença de Alzheimer.

Nesse sentido, a hipótese desse trabalho é que os prejuízos cognitivos associados à hipercolesterolemia familiar podem ser prevenidos ou atenuados pelo consumo moderado de vinho tinto. Para testar experimentalmente esta hipótese, os camundongos nocautes para o receptor de LDL (LDLr<sup>-/-</sup>), modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana e que apresentam comprometimento cognitivo, foram submetidos ao consumo moderado de vinho.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar se o consumo moderado de vinho tinto é capaz de atenuar as alterações cognitivas e neuroquímicas induzidas pela hipercolesterolemia em camundongos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar o efeito do consumo moderado de vinho tinto (*Cabernet Sauvignon* – Equação, Vinícola Pericó) e etanol 6% em camundongos C57BL/6 sobre:

- ❖ parâmetros bioquímicos de toxicidade hepática;
- ❖ parâmetros comportamentais de atividade motora.

3.2.2. 2. Avaliar o efeito do consumo moderado de vinho tinto (*Cabernet Sauvignon* – Equação, Vinícola Pericó) em camundongos hipercolesterolêmicos deficientes para o receptor de LDL (LDLr<sup>-/-</sup>), alimentados com dieta padrão ou dieta com alto teor de colesterol sobre:

- ❖ parâmetros comportamentais relacionados aos prejuízos cognitivos de memória e aprendizado;
- ❖ parâmetros comportamentais de atividade locomotora e exploratória;
- ❖ parâmetros bioquímicos de toxicidade hepática;
- ❖ perfil lipídico;
- ❖ atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE);
- ❖ atividade antioxidante e dano oxidativo cerebral, pela avaliação do sistema antioxidante vinculado à glutatona (GSH), através da determinação do conteúdo de GSH e atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx); e níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes

Glutaciona oxidada, Glutaciona redutase, Glutaciona reduzida, Peróxido de terc-butila, Iodeto de Acetiltiocolina, 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato, Hidrato de cloral e foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Os reagentes para determinação dos níveis de colesterol e triglicerídeos foram adquiridos da empresa Gold Analisa e os reagentes para determinação dos níveis das transaminases foram adquiridos da empresa Labtest. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 4.2. Animais

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e nocautes para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr<sup>-/-</sup>), desenvolvidos previamente por Ishibashi e colaboradores em 1993 (Ishibashi et al., 1993), foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil. Os progenitores foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA). Neste trabalho foram usados animais de três a cinco meses de idade, machos e fêmeas, com peso aproximado de 25g, os quais foram alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm – 4 animais por gaiola), com condição controlada de temperatura (23 ± 1°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 7:00 às 19:00 h), e com livre acesso à bebida e comida. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC), Protocolo PP00948.

### 4.3. Tratamento

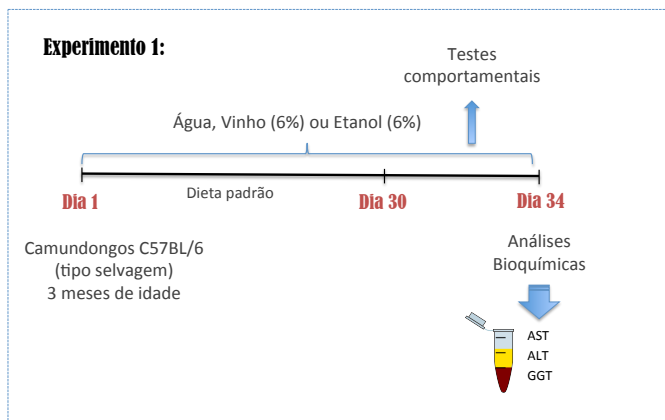
As amostras de vinho tinto Cabernet Sauvignon foram gentilmente cedidas pela Vinicola Pericó (São Joaquim – SC, Brasil), cujas características analíticas são: álcool 12,8 %; Acidez Total 5,38 g/L (ácido Tartárico); Acidez Volátil 0,66 g/L (ácido Acético); Densidade 0,9949; Extrato seco 28,10 g/L; Açúcares Totais 1,32 g/L; Polifenóis totais 1608 mg/L – importante polifenol encontrado em vinho tinto; pH 3,78. Os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com etanol tiveram livre acesso à solução diluída na água de beber com concentração final de 6%. Além disso, os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e

LDLr<sup>-/-</sup> nas diferentes etapas do trabalho tiveram livre acesso à solução de vinho tinto diluída na água de beber para uma concentração alcoólica final de 6%. As soluções foram trocadas a cada dois dias e o consumo dos animais foi verificado diariamente.

#### **4.4. Desenhos Experimentais**

**4.4.1. Experimento 1:** A concentração alcoólica de 6% é segura para o tratamento de camundongos C57BL/6

O objetivo do primeiro desenho experimental foi avaliar se a utilização de vinho tinto na concentração alcoólica de 6% é segura para o tratamento dos camundongos C57BL/6, utilizando parâmetros de hepatotoxicidade e motores. Dessa forma, aos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de 3 meses de idade machos e fêmeas receberam exclusivamente i) a solução de álcool 6% ou ii) a solução de vinho tinto diluído na concentração de 6% de álcool. O grupo controle recebeu iii) apenas água, totalizando 3 grupos experimentais. O modelo experimental do consumo voluntário de vinho tinto diluído na água de beber apresenta validade preditiva (Wang et al., 2006). Após trinta dias de tratamento, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais do campo aberto e rotarod (grupos independentes de animais foram usados em cada teste, 5-6 animais por grupo experimental) para verificação da atividade exploratória e motora, respectivamente. Após a realização dos testes comportamentais (34<sup>o</sup> 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 das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e Gama glutamil transpeptidase (GGT). O desenho do protocolo experimental 1 está representado na figura 5.

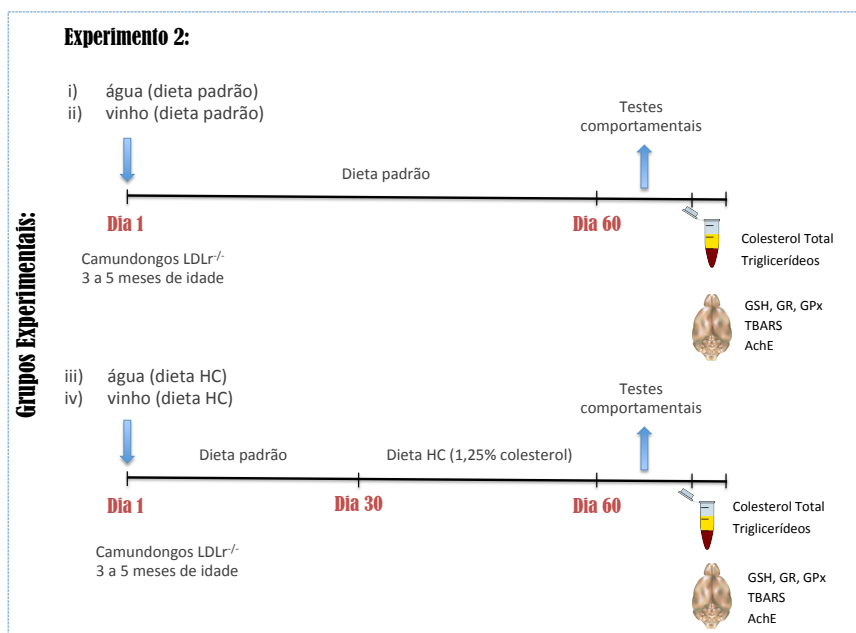


**Figura 5:** Esquema do desenho experimental 1: A concentração alcoólica de 6% é segura para o tratamento de camundongos C57BL/6

#### 4.4.2. Experimento 2: As alterações cognitivas induzidas pela hipercolesterolemia podem ser moduladas pelo consumo moderado de vinho

O objetivo do segundo desenho experimental foi avaliar se o consumo moderado de vinho tinto é capaz de reverter as alterações cognitivas, o estresse oxidativo e o aumento na atividade da enzima AChE previamente observados em animais hipercolesterolêmicos. Para isto, os camundongos LDL<sup>r/-</sup> foram divididos em dois grupos, os quais receberam solução de vinho tinto diluído em água (teor alcoólico de 6%) ou apenas água. Os dois grupos experimentais receberam dieta padrão para roedores nos primeiros 30 dias do protocolo experimental. Após 30 dias de tratamento, esses grupos foram subdivididos nos seguintes grupos experimentais: i) água (dieta padrão), ii) vinho (dieta padrão), iii) água (dieta hipercolesterolêmica) e iv) vinho (dieta hipercolesterolêmica) por mais 30 dias, totalizando 4 grupos experimentais e 60 dias de tratamento. A dieta hipercolesterolêmica utilizada é constituída por 20% de gordura saturada e 1,25% de colesterol, produzida na Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. Após o tratamento, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto, realocação do objeto, reconhecimento do objeto, rotarod e labirinto aquático de Morris (grupos independentes de animais foram usados em cada teste, 8 animais por grupo experimental). É importante lembrar que

durante os testes comportamentais os animais continuaram tendo acesso as soluções de vinho tinto, impedindo que houvesse interferência de efeitos de abstinência do álcool nesses camundongos. Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados (xilasina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, intraperitoneal – i.p.) e o sangue coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis de colesterol total, de triglicérides e das enzimas hepáticas e, posteriormente, o córtex pré-frontal e o hipocampo dissecados para a determinação do conteúdo de glutathione (GSH), da atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), e para determinação da peroxidação lipídica. Além disso, foi realizada a análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). O esquema do segundo desenho experimental está representado na figura 6.



**Figura 6:** Esquema do desenho experimental 2: As alterações cognitivas pela hipercolesterolemia podem ser moduladas pelo consumo moderado de vinho

## **4.5. Testes Comportamentais**

### **4.5.1. Teste do campo aberto:**

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora dos animais (Prut e Belzung, 2003). O aparato constitui-se de uma caixa de acrílico transparente (30 x 40 x 40 cm), sem cobertura e com assoalho cinza dividida por linhas pretas em 12 quadrados (10 x 10 cm). Cada camundongo foi colocado no centro da arena, permitindo sua movimentação livremente no aparato durante o período de 5 minutos. Foi registrado o número total de cruzamentos, sendo considerados no momento em que o animal atravessou o quadrado com as quatro patas. Após cada experimento, a superfície foi limpa com álcool 10%.

### **4.5.2. Teste da realocação do objeto:**

O teste de realocação do objeto tem sido utilizado para avaliação de memória dependente do hipocampo, mais precisamente a memória espacial de referência (Ferguson e Sapolsky, 2007; Assini et al., 2009). A memória espacial foi avaliada baseando-se na tendência de roedores a explorar, por um período maior de tempo, o objeto realocado para uma nova localização espacial da que se encontrava previamente. Para realização do teste, primeiramente os animais são submetidos a uma sessão de habituação no campo aberto pelo período de 5 minutos, na qual o animal é colocado na arena e explora-a livremente. Após 24 horas, o procedimento se inicia com a sessão treino onde dois objetos idênticos são apresentados aos animais e o tempo de exploração de cada objeto durante o total de 5 minutos é registrado. Cada animal retorna à sua gaiola após o treino e aguarda 180 minutos até o momento do teste. Na sessão teste, um dos objetos é colocado em uma nova posição no aparato, sendo registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos também pelo período de 5 minutos.

Os objetos utilizados foram dois retângulos plásticos idênticos (3 cm largura x 4,5 cm comprimento x 4,5 cm altura) os quais foram colados ao chão do campo aberto de maneira equidistante 7 cm dos dois lados da caixa. 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' é o tempo gasto pelos animais explorando o objeto deslocado e A1 é o tempo gasto pelos animais



explorando o objeto não deslocado. Após cada ensaio, a superfície foi limpa com álcool 10%.

#### **4.5.3. Teste do reconhecimento do objeto:**

O teste de reconhecimento do objeto foi utilizado como um paradigma cognitivo que avalia a memória de reconhecimento. Para realização do procedimento, no dia anterior ao teste os animais são individualmente habituados ao campo aberto durante 5 minutos. Cada sessão consiste em dois ensaios de 5 minutos. No primeiro ensaio (treinamento - aquisição), os animais são expostos a dois objetos idênticos no campo aberto e sua atividade exploratória é registrada. Após 60 minutos, o segundo ensaio (teste - retenção) é realizado, onde os animais são expostos a dois objetos dissimilares, um objeto familiar do primeiro ensaio e um novo objeto. Os objetos utilizados apresentam nível exploratório, complexidade física e tamanho similares e os seguintes comportamentos foram considerados como exploração dos objetos: 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 conhecido. Após cada sessão, a superfície foi limpa com álcool 10%.

#### **4.5.4. Teste do rotarod:**

O teste do rotarod foi utilizado para verificar a coordenação motora e de equilíbrio dos animais, sendo junto ao campo aberto, a principal abordagem na caracterização fenotípica motora em modelos animais (Brooks e Dunnet, 2009). O equipamento permite o teste de até quatro animais simultaneamente com sistema de rotação pré-programado. Os parâmetros avaliados no teste incluíram: tempo de latência (resistência para queda) e o número de quedas do animal num período de 4 minutos. O tempo de latência reflete o produto de cinco grandes fatores: (i) equilíbrio dinâmico; (ii) coordenação motora; (iii) planejamento motor; (iv) aprendizagem motora; e (v) condições físicas em geral. Basicamente, o animal é colocado em cima de um cilindro giratório (3 cm de diâmetro com frisos de aderência) numa velocidade de rotação de 18 rpm.

#### **4.5.5. Teste do labirinto aquático de Morris:**

Neste estudo, utilizamos a versão da memória espacial do labirinto aquático de Morris, o qual diferentemente dos testes de reconhecimento do objeto, realocação do objeto e alternância espontânea, nos dá resultados quantitativos em relação aos aspectos cognitivos dos

animais (Vorhees and Williams, 2006). O aparato experimental utilizado consiste de um labirinto circular, preenchido com cerca de 60 cm<sup>3</sup> de água em temperatura ambiente, onde os animais foram condicionados a encontrar uma plataforma de escape (10 x 10 cm) submersa 0,5 cm da superfície. A navegação foi orientada por quatro pistas visuais equidistantes (50 x 50 cm) fixadas nas paredes da sala experimental (NO, NE, SO, SE), 30 cm acima da borda do tanque. O protocolo experimental foi realizado em dois dias. No primeiro dia, os animais foram submetidos a dez sessões de condicionamento, com intervalo máximo de 60 minutos entre cada sessão. Os quatro pontos de partida (N, S, L ou O) foram distribuídos randomicamente e a posição da plataforma permaneceu fixa. As sessões de treinamento foram de no máximo 60 s, com 10 s de permanência na plataforma. Nas falhas em encontrar a plataforma, os animais foram gentilmente guiados até a mesma. A latência de escape das dez sessões no labirinto aquático foi avaliada. Após 24 horas do término do treinamento, os animais foram submetidos à sessão teste. Nesta etapa, a plataforma foi retirada do labirinto e todos os animais foram liberados do mesmo ponto de partida, sendo avaliados pelo período de 60 s. Os principais parâmetros de avaliação foram: (i) tempo no quadrante em que, na sessão de acondicionamento, a plataforma se encontrava; (ii) tempo na zona da plataforma; e (iii) latência para primeira entrada na zona da plataforma.

#### **4.6. Análise dos níveis de lipídeos plasmáticos**

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

#### **4.7. Análise dos níveis das transaminases**

A quantificação das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamil transpeptidase (GGT) no plasma dos camundongos foi realizada através de reagentes comerciais (Labtest), seguindo as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em U/L.

#### **4.8. Preparação de homogenatos teciduais**

Os animais foram eutanasiados e os tecidos cerebrais dissecados (córtex 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, os níveis de GSH e determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

#### **4.9. 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-mercapto-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.

#### **4.10. Sistema antioxidante vinculado à glutatona (GSH)**

O conteúdo de GSH foi determinado 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 centrifugada 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM, pelo período de 15 minutos à temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi lida a um comprimento de onda de emissão a 420 nm e de excitação a 350 nm. O conteúdo de GSH foi calculado utilizando uma curva padrão e expresso como  $\mu\text{mol}$  de GSH/mg proteína.

A GR catalisa a redução da glutatona oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG, a enzima leva ao consumo de NADPH, que é medido em 340 nm. A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade desta enzima (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  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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 ter-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.

#### **4.11. Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS**

A peroxidação lipídica foi determinada pela medida dos produtos de oxidação que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Ohkawa et al. (1979). Os produtos da peroxidação de lipídios (peróxidos lipídicos, dialdeído malônico e outros aldeídos de baixo peso molecular) reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), produzindo bases de Schiff. Esses compostos são coloridos e sua concentração pode ser determinada por espectrofotometria a 535 nm. Os sobrenadantes teciduais foram incubados a 90 °C, por 1 hora, em um meio contendo 1,3 M de tampão acetato (pH 3,4), ácido tiobarbitúrico (0,27 M), e dodecil sulfato de sódio (8,1%). Após 1 hora de reação, o material foi resfriado durante 15 minutos, centrifugado a 3.000 g por 5 min, e o sobrenadante coletado para a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBARS nas amostras foi obtida pela comparação das absorbâncias com a absorbância de uma curva padrão. Os dados foram expressos como nmol de TBARS/mg de proteína.

#### 4.12. Níveis de proteínas:

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

#### 4.13. Análises Estatísticas

Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar se o índice de localização e índice de discriminação nos testes de realocação de objeto e reconhecimento do objeto respectivamente, foram diferentes de um valor teórico de 50% (i.e., nível de chance).

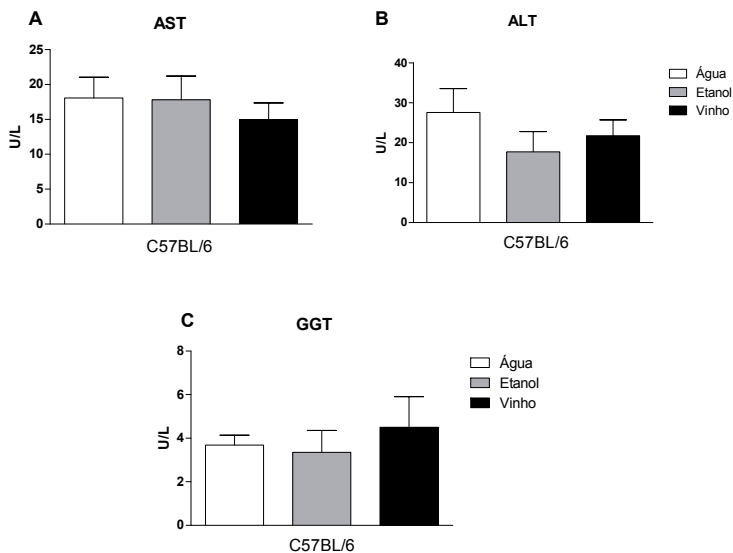
As demais comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de *Student*, ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias. Quando significativa as ANOVAs, múltiplas comparações *post hoc* foram feitas utilizando o teste de Duncan. O nível de significância adotado em todos os experimentos foi  $p \leq 0,05$ . Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica<sup>®</sup>. As estatísticas estão também descritas nas legendas das respectivas figuras.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Experimento 1: A concentração alcoólica de 6% é segura para o tratamento de camundongos C57BL/6

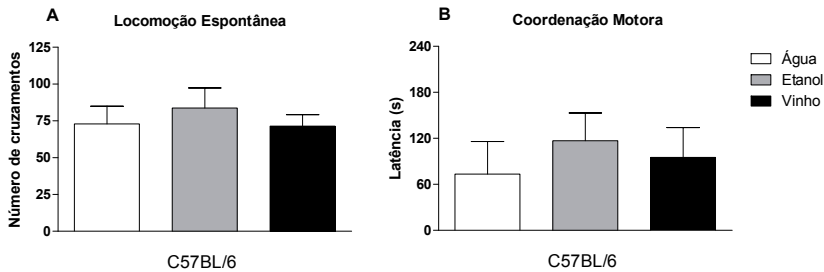
Na última década diversas evidências vêm demonstrando que o consumo moderado de bebidas alcoólicas como o vinho e cerveja possivelmente possuam um papel protetor contra as doenças neurodegenerativas relacionadas à idade (Wang et al., 2006; González-Munhoz et al., 2008; Pasinetti, 2012; Lourida et al., 2013; Parletta et al., 2013). No entanto, o consumo abusivo de álcool produz dano neuronal e alterações bioquímicas no cérebro de mamíferos, seguido por distúrbios cognitivos (Zahr et al., 2009; Friedman, Robinson, e Yelland, 2011; García-Moreno e Cimadevilla, 2012). Dessa forma, a primeira pergunta deste trabalho foi se a concentração alcoólica de 6% do vinho tinto em um consumo diário é segura, ou seja, não induz hepatotoxicidade, ou alterações comportamentais em camundongos C57BL/6. Para responder essa pergunta, os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de 3 meses de idade foram tratados com i) vinho tinto ou ii) etanol diluído na água de beber para uma concentração final de álcool equivalente a 6%, ou com apenas iii) água como controle. Os parâmetros de toxicidade hepática, tais como quantificação das enzimas AST, ALT e GGT, foram avaliados no plasma, bem como foram realizados os testes de locomoção e atividade motora.

Cada animal consumiu aproximadamente 4 mL da solução de vinho por dia (8g de etanol/Kg/dia), i.e., aproximadamente 7% do consumo energético total diário dos camundongos C57BL/6 tratados com *Cabernet Sauvignon* foi obtido a partir do vinho. Estes dados são equivalentes ao consumo moderado humano, em que 150 mL de vinho tinto equivale a 6,2% do consumo total de energia para uma mulher (em um total de 2.000 kcal / dia) e 300 mL é equivalente a 10% para um homem (em um total de 2.500 kcal / dia) (Dietary Guidelines for Americans, 2005). De maneira geral, o consumo da solução de álcool 6%, presente tanto na solução de etanol como na solução de vinho tinto, foi bem tolerado pelos camundongos C57BL/6. Nós não encontramos sinais de alterações hepáticas nos grupos experimentais tratados com vinho e etanol, uma vez que os níveis séricos das transaminases (AST e ALT) e da GGT, foram iguais aos do grupo controle (Figura 7).



**Figura 7:** Efeito do consumo moderado de vinho tinto 6% e etanol 6% em relação aos níveis plasmáticos das transaminases (A) aspartato aminotransferase (B) alanina aminotransferase e (C) gama glutamil transferase em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (5 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de uma via.

Os testes do campo aberto e rotarod foram utilizados no intuito de verificar a atividade exploratória e motora dos animais, respectivamente. O consumo abusivo de álcool pode causar danos de locomoção e motores conforme observado em trabalhos anteriores utilizando animais de experimentação (García-Moreno et al., 2002; García-Moreno e Cimadevilla, 2012). Sendo assim, nos testes do campo aberto e rotarod realizados neste trabalho, não foram observadas diferenças no número de cruzamentos totais e na latência para a primeira queda, respectivamente (figura 8).



**Figura 8:** Efeito do consumo moderado de vinho tinto 6% e etanol 6% sobre a (A) locomoção e (B) atividade motora de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (5 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de uma via.

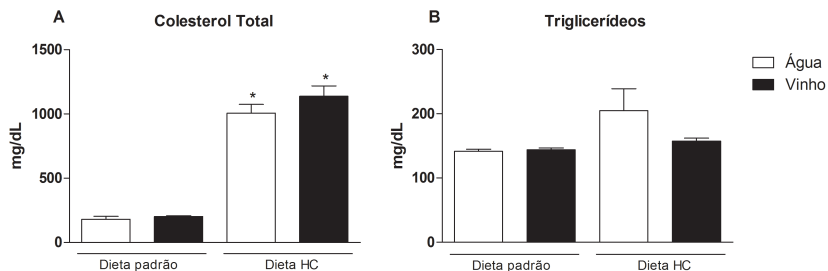
## 5.2. Experimento 2: As alterações cognitivas induzidas pela hipercolesterolemia podem ser moduladas pelo consumo moderado de vinho

Nos primeiros trinta dias deste protocolo experimental, camundongos  $LDLr^{-/-}$  de 3 a 5 meses de idade foram submetidos a uma dieta padrão e receberam tratamento com água ou vinho (teor alcoólico 6%). Nos trinta dias subsequentes, estes dois grupos experimentais foram subdivididos, sendo metade desses animais tratados com dieta padrão e a outra metade com dieta hipercolesterolêmica (totalizando quatro grupos experimentais). O objetivo específico neste desenho experimental foi exacerbar os níveis de colesterol plasmático dos camundongos e avaliar se o prejuízo cognitivo e o estresse oxidativo induzidos pelos altos níveis de colesterol plasmático seriam atenuados pelo consumo moderado de vinho tinto.

Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstramos que os animais  $LDLr^{-/-}$  possuem níveis de colesterol total aumentados em 3 a 4 vezes comparados aos animais C57BL/6 do tipo selvagem (de Oliveira et al., 2011; Moreira et al., 2012). Neste trabalho, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo da dieta [ $F(1,16)=270,36, p<0,05$ ]. Os camundongos  $LDLr^{-/-}$  quando submetidos a uma dieta rica em colesterol apresentaram um aumento de aproximadamente seis vezes nos níveis de colesterol total plasmático, o que também está de acordo com nossos dados prévios (de Oliveira et al., 2011). Por outro lado, os níveis de triglicerídeos no plasma não foram

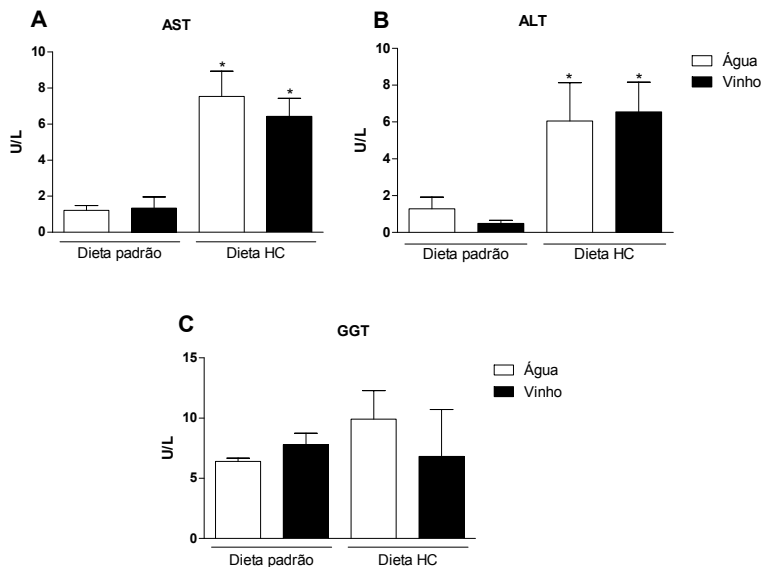


modificados pelo tratamento com a dieta hipercolesterolêmica. Por fim, o consumo moderado de vinho tinto não modificou o perfil lipídico dos animais LDLr<sup>-/-</sup>.



**Figura 9:** Avaliação dos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta padrão e dieta hipercolesterolêmica (HC) e ao consumo de vinho tinto. 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 dieta para os níveis de colesterol total [F(1,16)=270,36,  $p<0,05$ ]. \* $p<0,05$  comparado com camundongos LDLr<sup>-/-</sup> submetidos à dieta HC.

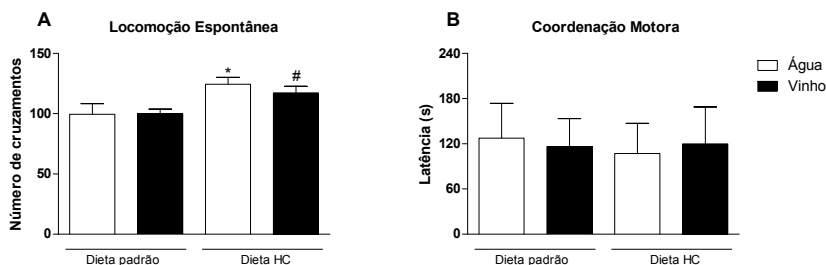
Os níveis das enzimas AST e ALT no plasma dos camundongos também foi mensurado. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo da dieta no conteúdo das enzimas AST [F(1,16)=31,952,  $p<0,05$ ] e ALT [F(1,16)=13,546,  $p<0,05$ ]. Como demonstrado na Figura 10, o tratamento com a dieta hipercolesterolêmica causou um aumento no conteúdo destas enzimas hepáticas no plasma dos animais (figura 10A e B), indicando que o alto consumo de colesterol desencadeou danos hepáticos nos animais LDLr<sup>-/-</sup>. Por outro lado, o consumo moderado de vinho não foi capaz de impedir a toxicidade hepática induzida pela dieta hipercolesterolêmica nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. Os níveis plasmáticos da enzima GGT não sofreram alterações significativas com a introdução da dieta hipercolesterolêmica ou com o consumo de vinho (Figura 10C).



**Figura 10:** Avaliação dos níveis plasmáticos das transaminases em camundongos  $LDLr^{-/-}$  submetidos a uma dieta padrão e dieta hipercolesterolêmica (HC) e ao consumo de vinho tinto. 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. \* $p < 0,05$  comparado com camundongos  $LDLr^{-/-}$  submetidos à dieta HC.

A locomoção espontânea e atividade motora dos animais foi avaliada pelos testes do campo aberto e rotarod, respectivamente. Em estudos anteriores, os camundongos  $LDLr^{-/-}$  tratados com dieta padrão apresentaram número de cruzamentos totais no campo aberto significativamente maior quando comparados com camundongos C57BL/6 selvagens, caracterizando um padrão de hiperlocomção no fenótipo hipercolesterolêmico (Moreira et al., 2012). De grande importância neste estudo, a ANOVA de duas vias apontou um efeito significativo da dieta [ $F(1,28)=11,403$ ,  $p < 0,05$ ] na locomoção. Verificamos que a exposição a uma dieta hipercolesterolêmica aumenta ainda mais o número de cruzamentos totais dos camundongos  $LDLr^{-/-}$  (Figura 11A). No entanto, o consumo de vinho tinto não alterou os parâmetros de hiperlocomção característicos destes animais hipercolesterolêmicos (Figura 11A). Por outro, no teste de rotarod não

foram observadas diferença significativas entre os grupos experimentais (Figura 11B).



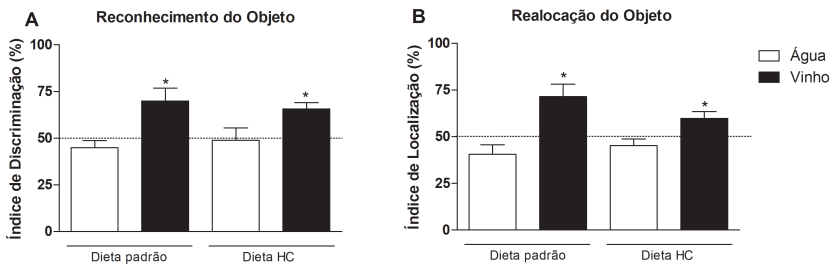
**Figura 11:** Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto sobre a locomoção espontânea e atividade motora de camundongos  $LDLr^{-/-}$ . (A) campo aberto e (B) rotarod. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (8 animais/grupo). Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da dieta [ $F(1,28)=11,403$ ,  $p<0,05$ ] na locomoção entre os grupos água. O teste de Duncan mostrou tendência de efeito na dieta ( $p=0,065$ ) entre os grupos vinho. \* $p<0,05$  versus camundongos  $LDLr^{-/-}$  grupo água tratados com dieta padrão. # $p=0,065$  versus camundongos  $LDLr^{-/-}$  grupo vinho tratados com dieta padrão.

Em seguida, os camundongos  $LDLr^{-/-}$  foram submetidos à avaliação de memória e aprendizado de curta duração. A memória de curta duração refere-se a uma fase que independe de síntese de proteínas e dura em torno de 1 a 3 horas (Bekinschtein et al., 2007). De acordo com nossos estudos prévios, demonstramos neste trabalho que os animais hipercolesterolêmicos  $LDLr^{-/-}$  possuem disfunção nos parâmetros de memória e aprendizado (Figura 12 A e B).

Primeiramente, avaliamos a memória de reconhecimento dos animais, utilizando o teste do reconhecimento do objeto. Os camundongos  $LDLr^{-/-}$  tratados com água (independentemente da dieta adotada) não mostraram nenhuma preferência pelo objeto novo, apresentando um índice de discriminação semelhante a um valor teórico de 50% (nível de chance). Notavelmente, o tratamento com vinho tinto reverteu o prejuízo cognitivo nos animais hipercolesterolêmicos, independentemente da dieta adotada (Figura 12A). Os animais  $LDLr^{-/-}$  tratados com dieta padrão ou dieta hipercolesterolêmica submetidos ao tratamento moderado com o vinho apresentaram um índice de discriminação significativamente maior que o nível de chance (Figura 12A).

A memória espacial de curta duração também foi investigada utilizando o teste de realocação do objeto. Os camundongos  $LDLr^{-/-}$

tratados com água submetidos à dieta padrão ou dieta hipercolesterolêmica não foram capazes de identificar a alteração espacial na arena de campo aberto. Em contraste, os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> tratados com vinho tinto, independentemente da dieta, apresentaram um índice de localização significativamente maior que o nível de chance (50%) (Figura 12B).



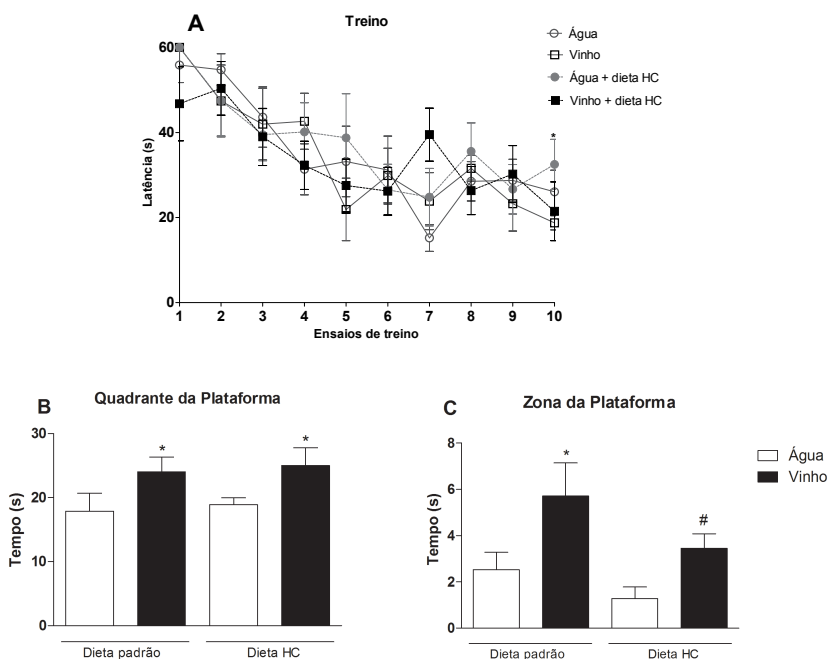
**Figura 12:** Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto sobre a memória de curto prazo de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. (A) teste de reconhecimento do objeto e (B) teste de realocação do objeto. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (8 animais/grupo). Os resultados de ambos os testes foram analisados pelo teste “t” para determinar se o índice de reconhecimento e de localização diferiam significativamente de um valor teórico de 50%. \*p<0,05 versus camundongos LDLr<sup>-/-</sup> grupo água.

O labirinto aquático de Morris foi utilizado como um outro paradigma de aprendizado e memória espacial, porém de longo prazo. A memória de longa duração se refere a uma fase dependente de síntese proteica podendo durar por dias, semanas ou até mais (Bekinschtein et al., 2007). É importante destacar que não foram visualizadas diferenças na velocidade e distância percorrida entre os grupos experimentais (dados não mostrados), parâmetros que refletem a ausência de dano motor nos animais. A exposição à dieta hipercolesterolêmica não comprometeu a curva de aprendizado dos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, uma vez que todos os grupos foram capazes de aprender a tarefa, diminuindo as latências de escape para encontrar a plataforma nas sessões de treinamento. Todavia, foram visualizadas diferenças nas latências de escape na décima sessão treino entre os grupos água e vinho submetidos à dieta hipercolesterolêmica (Figura 13A), destacando uma melhor performance de aprendizado do grupo tratado com vinho.

Com relação a sessão teste, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do tratamento [F(1,26)=14,469, p<0,05] para o tempo no quadrante da plataforma. Os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> tratados com o

vinho tinto apresentaram um maior tempo no quadrante onde a plataforma se encontrava, independentemente da dieta utilizada, demonstrando que o consumo moderado de vinho tinto pelo período de sessenta dias foi capaz de melhorar a memória espacial dos animais LDLr<sup>-/-</sup> (Figura 13B).

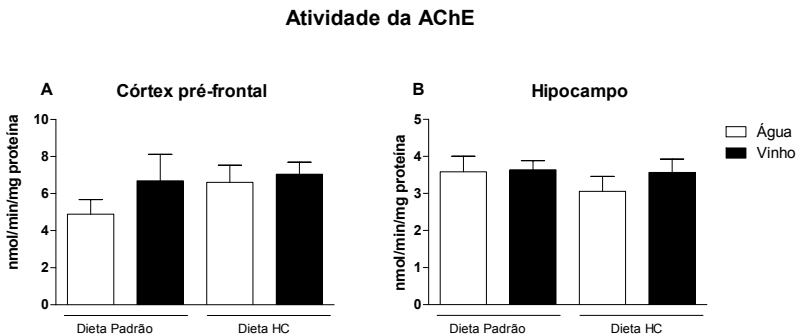
A ANOVA de duas vias também apontou um efeito significativo do fator dieta [ $F(1,25)=4,6041$ ,  $p<0,05$ ] e do fator tratamento [ $F(1,25)=8,0080$ ,  $p<0,05$ ] para o tempo na zona da plataforma. O tratamento com o vinho tinto foi capaz de aumentar o tempo gasto na zona da plataforma somente nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta padrão. É importante mencionar, que o tempo gasto na zona da plataforma dos camundongos LDLr<sup>-/-</sup> expostos à dieta hipercolesterolêmica tratados com o vinho foi significativamente menor que o tempo despendido pelos camundongos LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão também tratados com o vinho, indicando que a dieta hipercolesterolêmica exacerbou os danos de memória espacial de longa duração nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.



**Figura 13:** Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto sobre a memória de longa duração de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. Os testes foram realizados no labirinto aquático de Morris, (A) fase treino, (B) fase teste indicando tempo no quadrante da plataforma e (C) fase teste indicando tempo na

zona da plataforma. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (8 animais/grupo).  $\&p < 0,05$  comparado com tratamento na última sessão de treino. \* $p < 0,05$  versus camundongos LDLr<sup>-/-</sup> grupo água. #efeito da dieta comparado ao grupo água.

Considerando a relação entre a disfunção da atividade colinérgica e os déficits de memória espacial (Davies e Maloney, 1976; Deiana et al., 2011), e que a hipercolesterolemia parece afetar este sistema, (Moreira et al., 2012; Lopes et al., 2015) no presente estudo avaliamos a atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal e hipocampo dos grupos experimentais, uma vez que esta enzima é responsável por modular os níveis de acetilcolina na fenda sináptica. Nós não observamos modificações na atividade da AChE nas regiões cerebrais estudadas dos camundongos LDLr<sup>-/-</sup> após o tratamento com a dieta rica em colesterol ou devido o consumo moderado de vinho (Figura 14).



**Figura 14:** Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto na atividade da AChE de camundongos LDLr<sup>-/-</sup> no (A) córtex pré-frontal e (B) hipocampo. 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, não mostrando diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

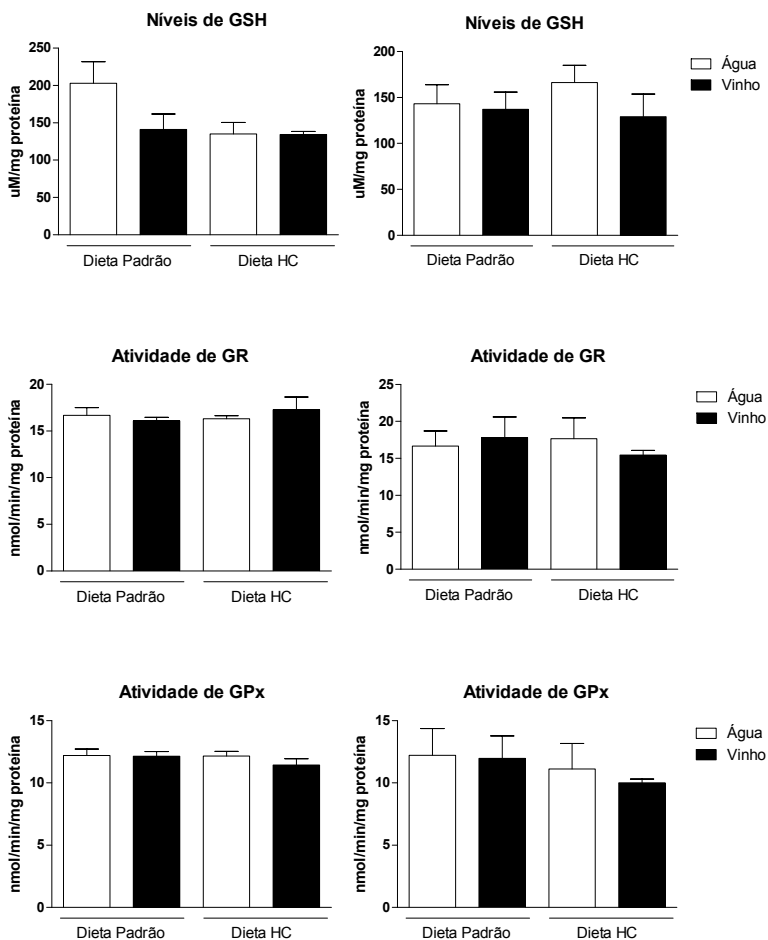
A GSH possui papel fundamental na proteção celular contra o estresse oxidativo, principalmente no SNC (Dringen e Hirrlinger, 2003), e trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstram que a disfunção do receptor de LDL em camundongos resulta em um comprometimento no sistema antioxidante vinculado à GSH no córtex cerebral e hipocampo (de Oliveira et al., 2011, Moreira et al., 2012; de Oliveira et al., 2014). No presente trabalho foi investigado se os efeitos

benéficos do vinho tinto sobre a cognição dos animais estariam ocorrendo por meio da modulação do sistema antioxidante vinculado à GSH. De maneira geral, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, independente da dieta e do tratamento adotados (Figura 15).

### Sistema antioxidante vinculado à glutatona

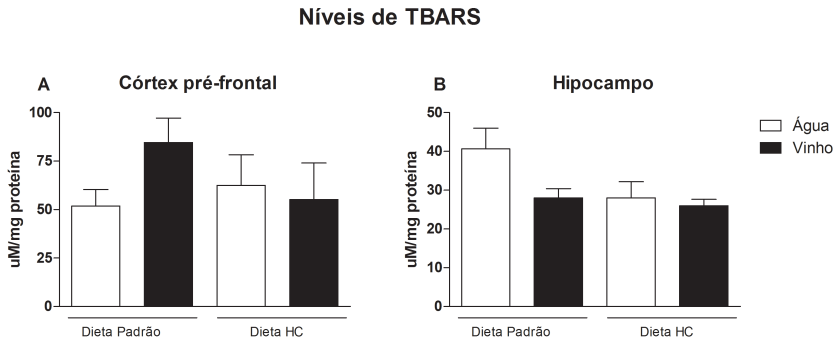
#### Córtex pré-frontal

#### Hipocampo



**Figura 15:** Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto sobre o sistema antioxidante vinculado à GSH de camundongos LDLr<sup>-/-</sup> no córtex pré-frontal e hipocampo. (A e D) Níveis de GSH, (B e E) Atividade da GR e (C e F) Atividade da GPx. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (5 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan.

Os níveis de peroxidação lipídica também foram aferidos no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais. Não foram observados efeitos da dieta hipercolesterolêmica na lipoperoxidação, assim como modificações devido o consumo moderado de vinho tinto (Figura 16).



**Figura 16:** Avaliação da dieta hipercolesterolêmica e do consumo moderado de vinho tinto sobre os dos níveis de peroxidação lipídica (ensaio de TBARS) no (A) córtex pré-frontal e (B) hipocampo de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (5 animais/grupo).



## 6. DISCUSSÃO

A elucidação do papel do colesterol na patogênese da aterosclerose é frequentemente referida como uma das grandes descobertas do século XX (Mehta e Khan, 2002). De fato, o desenvolvimento acelerado e prematuro de placas de ateroma é a principal manifestação clínica da hipercolesterolemia familiar, associada ao risco particularmente aumentado de doença arterial coronariana prematura (Brown e Goldstein, 1986; Ridker, 2014). Em paralelo, ao longo das duas últimas décadas, o envolvimento da hipercolesterolemia no aparecimento dos sinais de declínio cognitivo vem despertando a atenção da comunidade científica (Sparks et al., 1993, 1994; 2005; Kivipelto et al., 2001; 2002). Nesse sentido, o estudo de Zambón e colaboradores (2010) destacou-se ao demonstrar que indivíduos de meia-idade portadores de hipercolesterolemia familiar apresentam um aumento particular na incidência de comprometimento cognitivo leve.

Interessantemente, intervenções nutracêuticas nos últimos anos passaram a compor o quadro terapêutico tanto da aterosclerose, quando da doença de Alzheimer, particularmente após a descoberta do paradoxo francês, em que moléculas polifenólicas presentes no vinho tinto mostraram efeitos benéficos contra o desenvolvimento da aterosclerose (Renauld e Lorgeril, 1992; Soleas et al., 1997) e, posteriormente na função cognitiva de indivíduos e de modelos experimentais de doença de Alzheimer (Wang et al., 2006; Ho et al., 2009; Lourida et al., 2013; Parletta et al., 2013). Desta forma hipotetizamos que os compostos presentes no vinho, os quais atuam como agentes protetores em diversas etapas da progressão das doenças cardiovasculares, possam também prevenir os transtornos cognitivos decorrentes da hipercolesterolemia. De fato, quando tratados com frações de vinho tinto, os camundongos hipercolesterolêmicos apresentam uma significativa redução da progressão de aterosclerose (Hort et al., 2012). Nesse sentido, no presente trabalho utilizamos os camundongos C57BL/6 nocautes para o receptor de LDL (LDLr<sup>-/-</sup>) para avaliar os efeitos do consumo moderado de vinho tinto nos prejuízos cognitivos associados à hipercolesterolemia familiar. Nesse contexto, nossa primeira pergunta foi: A concentração alcoólica de 6% é segura para o tratamento de camundongos C57BL/6?

Primeiramente, nossos resultados demonstraram que o consumo moderado de vinho tinto e etanol na concentração alcoólica de 6% é bem tolerado pelos camundongos C57BL/6. Nenhuma manifestação de toxicidade hepática, avaliada pela medida do conteúdo das enzimas marcadores ou dano motor, por testes comportamentais, foi evidenciada

após o tratamento. O livre consumo do vinho para os camundongos foi escolhido para este trabalho, a partir de estudos anteriores (Wang et al., 2006), que usaram desta mesma estratégia para comparar o consumo nos animais a um consumo moderado em humanos. É importante mencionar, que utilizando outras formas de administração, como por exemplo a gavagem, não conseguiríamos atingir a ingesta adequada nos animais. Cada animal consumiu diariamente, em média, 4 mL da solução, portanto, calculamos que aproximadamente 7% do consumo de energia total diária dos camundongos tratados com *Cabernet Sauvignon* foi obtido a partir do vinho. Estes dados são equivalentes ao consumo moderado humano, em que 150 mL de vinho tinto equivale a 6,2% do consumo total de energia para uma mulher (em um total de 2.000 kcal / dia) e 300 mL é equivalente a 10% para um homem (em um total de 2.500 kcal / dia) (*Dietary Guidelines for Americans*, 2005).

Após estas avaliações preliminares, relativas à possível toxicidade da ingesta de solução etílica de 6%, nossa segunda e principal pergunta foi: As alterações cognitivas e neuroquímicas induzidas pela hipercolesterolemia podem ser moduladas pelo consumo moderado de vinho tinto?

Nós observamos que a ingesta de uma ração rica em colesterol pelos camundongos LDLr<sup>-/-</sup> - os quais já apresentam colesterol plasmático cerca de duas a três vezes maior que seus respectivos controles – induziu um aumento de seis vezes nos níveis plasmáticos de colesterol total. Esses resultados corroboram com estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (de Oliveira et al., 2011). Os níveis plasmáticos de triglicérides, entretanto, permaneceram inalterados. Como a LDL é produzida pela digestão de triacilgliceróis presentes nas lipoproteínas VLDL e IDL, os animais modelos de hipercolesterolemia familiar apresentam níveis de colesterol muito altos, mas seus níveis de triacilgliceróis podem estar dentro da faixa normal ou próximos dessa (Smith et al., 2007). Os níveis altos de colesterol plasmáticos encontrados em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hipercolesterolêmica, foram associados a um dano hepático, caracterizado pelo aumento no conteúdo das enzimas AST e ALT no plasma dos animais. O consumo moderado de vinho tinto não alterou os níveis de colesterol nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, independentemente da dieta adotada, bem como o dano hepático decorrente da dieta.

Em 2008, Elder e colaboradores observaram que os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> possuem aumentada atividade locomotora quando comparados aos camundongos C57BL/6 selvagens. De maneira interessante, neste trabalho observamos que, quando submetidos à dieta hipercolesterolêmica, os

camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentam um aumento ainda maior no número total de cruzamentos no teste de campo aberto, comparados aos animais que receberam dieta padrão. Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, observamos que quando esses animais hipercolesterolêmicos são submetidos a um protocolo experimental de exercício físico, ocorre uma diminuição do número de cruzamentos totais no campo aberto (Moreira et al., 2013). Além disso, recentemente demonstramos que a hiperlocomoção nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup> é amenizada após o tratamento subcrônico com donepezil (inibidor da AChE) (Lopes et al., 2015). A modulação da hiperlocomoção induzida pelos tratamentos mencionados pode ser devido mecanismos similares, que incluem o aumento na neurogênese e na sobrevivência neuronal no hipocampo (Van Praag et al., 2005). Entretanto, no presente trabalho não observamos nenhuma alteração na atividade locomotora após o tratamento com vinho tinto.

Os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram também prejuízos de memória de curto e longo prazo, verificado pelos testes de reconhecimento do objeto, realocação do objeto e labirinto aquático de Morris. Estes dados estão de acordo com os dados anteriores do nosso grupo de pesquisa (de Oliveira et al., 2011, 2014; Moreira et al., 2013; Lopes et al., 2015) e de outros grupos (Mulder et al., 2004; Thirumangalakudi et al., 2008). Nós primeiramente avaliamos a memória de reconhecimento e a memória espacial por meio dos testes de reconhecimento do objeto e realocação do objeto, respectivamente. Os camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, submetidos a ambas dietas, normal e hipercolesterolêmica, não foram capazes de identificar a presença de um objeto novo, bem como alterações espaciais na arena de campo aberto, caracterizando prejuízos de memória. Todavia, devido à natureza qualitativa dos testes de reconhecimento e realocação do objeto, não conseguimos identificar um efeito adicional da ingestão da dieta hipercolesterolêmica nos animais em relação ao declínio cognitivo. Por outro lado, comprovando a nossa hipótese experimental, o consumo moderado de vinho tinto por 60 dias foi capaz de melhorar o déficit cognitivo nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, avaliado por testes de memória de reconhecimento e espacial, independentemente da dieta adotada. O estudo pioneiro de Mulder e colaboradores (2004) sugeriu que os déficits de memória nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup> estão associados à diminuição na proliferação celular e densidade sináptica no hipocampo devido à diminuição da captação do colesterol decorrente da falta do receptor de LDL. O potencial efeito benéfico do consumo de vinho é relacionado, de maneira geral, aos compostos polifenólicos presentes em abundância na bebida, principalmente no vinho tinto. Estudos pré-clínicos prévios também demonstraram que o consumo moderado dessa bebida

atenua os prejuízos de memória em modelos experimentais para a doença de Alzheimer (Wang et al., 2006, Ho et al., 2009; Pasinetti, 2012). Desta forma podemos inferir que os compostos presentes no vinho podem estar modulando processos neuromoleculares envolvidos no estabelecimento dos danos cognitivos decorrentes da hipercolesterolemia. Efeitos já bem estabelecidos dos flavonoides, em relação às doenças cardiovasculares, como a diminuição do estresse oxidativo vascular e a melhora da função endotelial, podem ser mediadores deste efeito benéfico sobre a cognição dos animais.

O labirinto aquático de Morris tem sido extensivamente empregado em estudos relacionados à memória, particularmente por ser um teste de natureza quantitativa (King e Arendash, 2002; Westerman et al., 2002; Wang et al., 2006; Ho et al., 2009; Edwards et al., 2014). A realização desta tarefa está relacionada com o potencial de longa duração e função do receptor de NMDA, o que a caracteriza como uma técnica de investigação do circuito hipocampal (Morris et al., 1986; Jeffery e Morris, 1993). No presente estudo demonstramos que o tratamento com a dieta hipercolesterolêmica não comprometeu a curva de aprendizado dos animais nos ensaios de treinamento, porém os animais que consumiram vinho moderadamente pelo período de sessenta dias, obtiveram um melhor desempenho de aprendizado quando comparados aos que consumiram apenas água. Além disso, em relação a retenção de memória, analisada 24 horas após as sessões de treinamento, nós observamos que a dieta hipercolesterolêmica leva a uma intensificação do prejuízo cognitivo nos animais. O consumo moderado de vinho foi capaz de reverter o prejuízo de memória de longo prazo dos animais  $LDLr^{-/-}$ . De maneira interessante, a melhora da cognição induzida pelo vinho foi mais efetiva quando estes camundongos foram expostos a uma dieta padrão. Estudos experimentais utilizando modelos transgênicos para doença de Alzheimer (camundongos Tg2576), também demonstraram que o consumo moderado de vinho tinto é capaz de atenuar os déficits de memória e aprendizado associados a neuropatologia induzida pelo peptídeo A $\beta$  observados no labirinto aquático de Morris (Wang et al., 2006; Ho et al., 2009). Vale ressaltar que em nosso trabalho, o dano cognitivo nos animais é em decorrência da situação da hipercolesterolemia e/ou ausência do receptor de LDL, enquanto que nos estudos de Wang e colaboradores (2006) e no estudo de Ho e colaboradores (2009), os danos de memória são relacionados a neuropatologia induzida pelo peptídeo A $\beta$ . Em ambos os modelos, o consumo de vinho tinto apresentou efeitos benéficos sobre o déficit cognitivo, sugerindo que os compostos do vinho possam atuar em estágios

cruciais envolvidos no desencadeamento dos danos celulares e funcionais no SNC, que engatilham o comprometimento cognitivo.

Os déficits de memória podem também estar relacionados à disfunção colinérgica (Davies e Maloney, 1976; Deiana et al., 2011), uma vez que a modulação do aprendizado e memória envolve a participação de diversos neurotransmissores, incluindo a acetilcolina (Liu et al., 2007). A redução na captação de colina, liberação de acetilcolina e perda de neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal indicam um déficit colinérgico pré-sináptico seletivo no hipocampo e neocórtex de indivíduos com doença de Alzheimer (Kar et al., 2004). Por outro lado, Moran e colaboradores (1993) observaram que a atividade da AChE, enzima que degrada a acetilcolina na fenda sináptica, encontra-se aumentada em placas amiloides, podendo ser um fenômeno inicial no processo de deposição amiloide. Nesse contexto, nós anteriormente demonstramos que a atividade da AChE encontra-se aumentada no córtex pré-frontal dos camundongos LDLr<sup>-/-</sup> quando comparados aos camundongos do tipo selvagem (Moreira et al., 2012). Além disso, quando estes animais hipercolesterolêmicos foram tratados com um inibidor da AChE (donepezil), foi observado uma melhora na função cognitiva (Lopes et al., 2015). No presente estudo a atividade da AChE, tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo, não foi alterada pela exposição desses animais à dieta hipercolesterolêmica. Além disso, o tratamento com vinho tinto não foi capaz de diminuir a atividade da AChE no hipocampo e córtex pré-frontal dos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.

Historicamente, a bioatividade dos flavonoides contra a neurodegeneração está ligada a seus efeitos antioxidantes diretos (Rice-Evans et al., 1996). Nesse sentido, a capacidade das células de resistir ao estresse oxidativo é dependente dos mecanismos de defesa antioxidantes que detoxificam as espécies reativas antes que causem danos celulares (Le et al., 2011). Observamos em estudos prévios que os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentam um desequilíbrio do sistema antioxidante dependente de GSH no córtex pré-frontal e hipocampo, representado pela diminuição nos níveis de GSH e na atividade das enzimas GPx e GR (de Oliveira et al., 2014). Dessa forma, nós investigamos se, ao consumir diariamente e de forma moderada, o vinho tinto seria capaz de equilibrar o sistema da GSH nesses animais. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos que consumiram o vinho ou a água em relação à modulação do sistema antioxidante cerebral dos animais, através das técnicas utilizadas neste trabalho. O consumo de dieta hipercolesterolêmica também não modificou a atividade das enzimas antioxidantes nos animais LDLr<sup>-/-</sup>. Conforme demonstrado anteriormente,

no presente trabalho os níveis de peroxidação lipídica não foram aumentados pela exposição à dieta hipercolesterolêmica nas estruturas cerebrais estudadas (de Oliveira et al., 2011), tampouco observou-se qualquer alteração com o tratamento com vinho tinto.

De fato, estudos mais recentes apontam que as ações biológicas dos flavonoides no SNC podem não ser devido as ações antioxidantes diretas, mas sim por meio de outros mecanismos neuroprotetores (Spencer 2009; 2010a; 2010b). De acordo com Williams e Spencer (2012), essas moléculas agem em vias de sinalização tais como as da ERK e PI3-cinase/Akt, por meio da ativação de receptores ou cinases, o que resulta no aumento da expressão de proteínas neuroprotetoras e neuromoduladoras, além de aumentar o número, a força, e as conexões entre neurônios. Paralelamente, os efeitos dos flavonoides sobre o sistema vascular também podem levar a melhorias no desempenho cognitivo por meio do aumento do fluxo sanguíneo cerebral (Spencer, 2009; 2010b). No estudo realizado por Lin e colaboradores (2010), o efeito protetor do resveratrol (flavonoide importante encontrado no vinho) é mostrado na disfunção na barreira hematoencefálica (BHE) induzida pela LDL oxidada em células endoteliais cerebrovasculares. Mais especificadamente, o resveratrol impede o rompimento das junções oclusivas (occludina e ZO-1) e dos filamentos de actina F do citoesqueleto, além de normalizar a diminuição do potencial de membrana mitocondrial e os níveis intracelulares de ATP, induzidos pela exposição à LDL oxidada (Lin et al., 2010). Além disso, os flavonoides podem atenuar a neuroinflamação, particularmente através da sua capacidade de inibir a ativação da microglia ou reduzir a neurotoxicidade associada a moléculas pró-inflamatória neurotóxicas liberadas por essas células gliais (Spencer et al., 2012). Nessa linha de evidências, nós demonstramos que a hipercolesterolemia está associada a uma disfunção da BHE e neuroinflamação. Especificamente, os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram, no hipocampo, um aumento na imunoreatividade para a aquaporina 4 (AQP4) e proteína ácida fibrilar glial (GFAP), marcadores de permeabilidade aumentada da BHE e ativação astrocitária respectivamente (de Oliveira et al., 2014).

Nosso conjunto de dados demonstraram que o consumo diário e moderado de vinho tinto é capaz de melhorar o prejuízo cognitivo induzido pela hipercolesterolemia em camundongos, todavia, os mecanismos de ação pelos quais essa bebida possa estar atuando ainda não estão bem elucidados. Nós observamos que uma atuação antioxidante direta, bem como uma modulação no sistema colinérgico parecem não estar associados aos efeitos na memória aqui indicados. Como detalhado anteriormente, nós sugerimos que a ação dos flavonoides em processos

desencadeados pela hipercolesterolemia, como a restauração da integridade vascular e da função endotelial, mais precisamente da barreira hematoencefálica, bem como na modulação da neuroinflamação, possam estar por trás dos efeitos benéficos do consumo moderado de vinho tinto na melhora da cognição dos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho podemos inferir que:

- ❖ A ingesta de solução alcoólica 6% não foi hepatotóxica e foi bem tolerada em camundongos C57BL/6.
- ❖ A dieta hipercolesterolêmica causou um aumento nos níveis de colesterol total plasmáticos e dano hepático nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. O consumo moderado de vinho tinto não reverteu o aumento nos níveis de colesterol e o dano hepáticos nesses camundongos hipercolesterolêmicos.
- ❖ Os camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, independentemente da dieta adotada, apresentaram prejuízos de memória de curto prazo observados nos testes comportamentais de reconhecimento e realocação do objeto. O consumo de vinho tinto é capaz de melhorar a memória de reconhecimento e memória espacial de curto prazo em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> tratados com dieta padrão e dieta hipercolesterolêmica. Os efeitos positivos da bebida na cognição ocorrem independentemente da dieta.
- ❖ A dieta hipercolesterolêmica prejudicou a memória de longo prazo nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup> avaliada no teste do Labirinto aquático de Morris. O consumo de vinho tinto é capaz de melhorar a memória e o aprendizado espacial de longo prazo nos animais. No entanto, os efeitos benéficos da bebida são mais efetivos quando estes camundongos são expostos a uma dieta padrão.
- ❖ O efeito benéfico do vinho tinto na cognição dos animais LDLr<sup>-/-</sup> não está relacionado diretamente a uma melhora na disfunção colinérgica ou a efeitos antioxidantes, uma vez que não foram observados alterações na atividade da enzima AChE ou no sistema antioxidante vinculado à glutatona e nos níveis de peroxidação lipídica nas estruturas cerebrais estudadas após o tratamento.



## 8. PERSPECTIVAS

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

- ❖ Avaliar o efeito do consumo moderado de vinho tinto com ou sem a exposição à dieta hipercolesterolêmica em parâmetros neuroinflamatórios e de permeabilidade da BHE de camundongos  $LDLr^{-/-}$  por meios de ensaios de imunofluorescência.
- ❖ Investigar o efeito do consumo moderado de vinho tinto em camundongos  $LDLr^{-/-}$  submetidos à dieta padrão ou hipercolesterolêmica na expressão das proteínas integrantes das junções oclusivas nos cérebros destes animais.

**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.

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.

Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. **Rev Esp Cardiol** 62(10):1161-78, 2009.

Bar-On P, Crews L, Koob AO, Mizuno H, Adame A, Spencer B, Masliah E. Statins reduce neuronal alpha-synuclein aggregation in in vitro models of Parkinson's disease. **J. Neurochem** 105:1656–1667, 2008.

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.

Battaile KP, Steiner RD. Smith–Lemli–Opitz syndrome: the first malformation syndrome associated with defective cholesterol synthesis. **Mol. Genet. Metab** 71: 154–162, 2000.

Baur JA e Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nat. Rev. Drug Discov** 5:493–506, 2006.

Beach TG. et al. Circle of Willis atherosclerosis: association with Alzheimer's disease, neuritic plaques and neurofibrillary tangles. **Acta Neuropathol** 113(1):13-21, 2007.

Bekinschtein, P. et al. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, 53(2):261-77, 2007.

Bosco DA, Fowler DM, Zhang Q, Nieva J, Powers ET, Wentworth Jr P, Lerner RA, Kelly JW. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. **Nat. Chem. Biol** 2:249–253, 2006.

Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nat Rev Neuroscience** 10(7):519-29, 2009.

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.

Bruscoli, M.; Lovestone, S. Is MCI really just early dementia? A systematic review of conversion studies. **Int Psychogeriatr** 16(2):129-40, 2004.

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

Casslerly I, Topol E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. **Lancet** 363(9415):1139-46, 2004.

Choi SM, Kim BC, Cho YH, Choi KH, Chang J, Park MS, Kim MK, Cho KH, Kim JK. Effects of flavonoid compounds on beta-amyloid-peptide-induced neuronal death in cultured mouse cortical neurons. **Chonnam Med. J** 50:45-51, 2014.

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

Crocker AC. The cerebral defect in Tay–Sachs disease and Niemann–Pick disease. **J. Neurochem** 7:69–80, 1961.

Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. **Lancet** 2(8000):1403, 1976.

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

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

Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. **Hypertension** 38:159-65, 2001.

Donmez G, Wang D, Cohen DE, Guarente L. SIRT1 Suppresses b-Amyloid Production by Activating the a-Secretase Gene ADAM10. **Cell** 142:320–332, 2010.

Dringen R, Hirrlinger J. Glutathione pathways in the brain. **Biol Chem** 384(4):505-16, 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. et al. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **Eur J Biochem** 77(1):31-6, 1977.

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

Fiorani M, Guidarelli A, Blasa M, Azzolini C, Candiracci M, Piatti E, Cantoni O. Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid. **J. Nutr. Biochem** 21:397-404, 2010.

Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S, Anthony MD, Edwards RH. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. **J. Neuroscience** 24:6715–6723, 2004.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet** 341:454-457, 1993.

Friedman TW, Robinson SR, Yelland GW. Impaired perceptual judgment at low blood alcohol concentrations. **Alcohol** 45:711-718, 2011.

Ganguli M, Chang CH, Snitz BE, Saxton JA, Vanderbilt J, Lee CW. Prevalence of Mild Cognitive Impairment by Multiple Classifications: the MYHAT Project. **Am J Geriatr Psychiatry** 18:674– 83, 2010.

García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sanchez-Campos S, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang liver cells. **Eur. J. Pharmacol** 557:221-229, 2007.

García-Moreno LM, Névida MC, Capilla A, García-Sánchez O, Senderek K, Arias JL. Chronic ethanol intake and object recognition in young and adult rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 26:831–837, 2002.

García-Moreno LM, Cimadevilla JM. Acute and chronic ethanol intake: Effects on spatial and non-spatial memory in rats. **Alcohol** 46:757-762, 2012.

Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, Petersen RC, Ritchie K, Broich K, Belleville S, Brodaty H, Bennett D, Chertkow H, Cummings JL, de Leon M, Feldman H, Ganguli M, Hampel H, Scheltens P, Tierney MC, Whitehouse P, Winblad B. Mild cognitive impairment. **Lancet** 367(9518):1262-70, 2006.

Gleissner CA, Leitinger N, Ley K. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. **Hypertension** 50:276-83, 2007.

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

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

Goldin E, Roff CF, Miller SP, Rodriguez-Lafrasse C, Vanier MT, Brady, RO, Pentchev PG. Type C Niemann–Pick disease: a murine model of the lysosomal cholesterol lipidosis accumulates sphingosine and sphinganine in liver. **Biochim. Biophys. Acta** 1127:303–311, 1992.

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

González-Munhoz MJ, Peña A, Meseguer I. Role of beer as a possible protective factor in preventing Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology** 46(1):49-53, 2008.

Gu, Y.; Scarmeas, N.; Tang, M.; Mayeux, R.; Luchsinger, J.A. Dietary total antioxidant capacity and risk of dementia and mild cognitive impairments. **Alzheimer's & Dementia** 10(4):748, 2014.

Guilford JM, Pezzuto JM. Wine and health: a review. **Am J Enol Viticult.** 62:471–486, 2011.

Halliday GM, Ophof A, Broe M, Jensen PH, Kettle E, Fedorow H, Cartwright MI, Griffiths FM, Shepherd CE, Double KL. Alpha-synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease. **Brain** 128:2654–2664, 2005.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science** 256(5054):184-185, 1992.

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

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

Ho L, Chena LH, Wanga J, Zhaoa W, Talcotte ST, Passinetti GM, et al. Heterogeneity in Red Wine Polyphenolic Contents Differentially Influences Alzheimer's Disease-type Neuropathology and Cognitive Deterioration. **Journal of Alzheimer's Disease** 16:59–72, 2009.

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

Hort MA, Schuldt EZ, Bet AC, DalBó S, Siqueira JM, Ianssen C et al. Anti-Atherogenic Effects of a Phenol-Rich Fraction from Brazilian Red Wine (*Vitis labrusca* L.) in Hypercholesterolemic Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. **Journal of Medicinal Food** 15(10):936–944, 2012.

Hu G, Antikainen R, Jousilahti P, Kivipelto M, Tuomilehto J. Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. **Neurology** 70:1972–1979, 2008.

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

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.

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

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

Jeffery KJ, Morris RGM. Cumulative long-term potentiation in the rat dentate gyrus correlates with, but does not modify, performance in the water maze. **Hippocampus** 3:133-140, 1993.

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

Kar S. et al. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. **J Psychiatry Neurosci** 29(6):427-441, 2004.

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

King DL, Arendash GW. Behavioural characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. **Physiol. Behav** 75: 627-42, 2002.

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, Mannermaa 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.

Kolsch H, Lutjohann D, Ludwig M, Schulte A, Ptok U, Jessen F, et al. Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. **Mol Psychiatry** 7(8): 899- 902, 2002.

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

Li H, Förstermann U. Red Wine and Cardiovascular Health. **Circulation Research** 111:959-961, 2012.

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

Lin YL, Chang HC, Chen TL, Chang JH, Chiu WT, Lin JW, Chen RM. Resveratrol Protects against Oxidized LDL-Induced Breakage of the Blood-Brain Barrier by Lessening Disruption of Tight Junctions and Apoptotic Insults to Mouse Cerebrovascular Endothelial Cells. **The Journal of Nutrition** 140(12):2187-92, 2010.

Lippi G, Franchini M, Favaloro EJ, Targher G. Moderate Red Wine Consumption and Cardiovascular Disease Risk: Beyond the “French Paradox”. **Seminars In Thrombosis And Hemostasis** 36(1), 2010.

Liu YQ, Xin TR, Lu XY, Ji Y, Yang HD. Memory performance of hypercholesterolemic mice in response to treatment with soy isoflavones. **Neurosci Res** 57(4):544-9, 2007.

Llorente-Cortes V, Badimón L. LDL receptor-related protein and the vascular wall: Implications for atherothrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 25:497-504, 2005.

Lopes JD, de Oliveira J, Engel DF, de Paula GC, Moreira ELG, De Bem AF. Efficacy of Donepezil for Cognitive Impairments in Familial

Hypercholesterolemia: Preclinical Proof of Concept. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 2015.

Lourida I, Soni M, Thompson-Coon J, Purandare N, Lang IA, Ukoumunne OC, Llewellyn DJ. Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review. **Epidemiology** 24(4):479-489, 2013.

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

Luchsinger JA, Tang MX, Siddiqui M, Shea S, Mayeux R. Alcohol intake and risk of dementia. **J Am Geriatr Soc** 52:540–546, 2004a

Luchsinger JA, Mayeux R. Dietary factors and Alzheimer's disease. **Lancet Neurol** 3:579–587, 2004b.

Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **J. Biol. Chem** 280:37377–37382, 2005.

Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieger FW. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. **Science** 294:1354–1357, 2001.

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

Mehta NJ, Khan IA. Cardiology's 10 greatest discoveries of the 20th century. **Tex Heart Inst J** 29(3):164-71, 2002.

Mimura M. Memory impairment and awareness of memory deficits in early-stage Alzheimer's disease. **Tohoku J. Exp. Med** 215:133-140, 2008.

Min SW, Cho SH, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, et al. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. **Neuron** 67:953–966, 2010.

Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: From physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol** 31:61-74, 1999.

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<sup>-/-</sup>): 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, et al. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? **Journal of neural transmission** 121:415-426, 2014.

Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate antagonist, AP5. **Nature** 329:774-776, 1986.

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

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.

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

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

Nakamura H, Arakawa K, Itakura H, Kitabatake A, Goto Y, Toyota T, Nakaya N, Nishimoto S, Muranaka M, Yamamoto A, Mizuno K, Ohashi Y. Primary prevention of cardiovascular disease with pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomised controlled trial. **The Lancet** 368(9542):1155-1163, 2006.

Napoli C, Balestrieri ML, Sica V, Lerman LO, Crimi E, De Rosa G. et al. Beneficial effects of low doses of red wine consumption on perturbed shear stress-induced atherogenesis. **Heart Vessels** 23:124–133, 2008.

Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, Jadot M, Lobel P. Identification of HE1 as the second gene of Niemann–Pick C disease. **Science** 290:2298–2301, 2000.

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

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, Aversa M, Borén J, Bruckert E, Catapano AL, Kuivenhoven JA, Pajukanta P, Ray K, Stalenhoef AF, Stroes E, Taskinen MR, Tybjaerg-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.

Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, et al. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. **Neuroepidemiology** 17(1):14- 20,1998.

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

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem** 95(2):351-8,1979.

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.

Paratcha G, Ibanez CF. Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. **Curr. Opin. Neurobiol** 12:542–549, 2002.

Parletta N, Milte CM, Meyer BJ. Nutritional modulation of cognitive function and mental health. **J. nutr. Biochem** 24(5):725-743, 2013.

Pasinetti GM. Novel Role of Red Wine-Derived Polyphenols in the Prevention of Alzheimer's Disease Dementia and Brain Pathology: Experimental Approaches and Clinical Implications. **Planta Med** 78:1614-1619, 2012.

Pentchev PG, Brady RO, Blanchette-Mackie EJ, Vanier MT, Carstea ED, Parker CC, Goldin E, Roff CF. The Niemann–Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. **Biochim. Biophys. Acta** 1225:235–243, 1994.

Petersen RC et al. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. **Arch Neurol** 56(3):303-308, 1999.

Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B. Current concepts in mild cognitive impairment. **Arch Neurol** 58(12):1985-92, 2001.

Petersen RC, Roberts RO, Knopman DS et al. Prevalence of mild cognitive impairment is higher in men. The Mayo Clinic Study of Aging. **Neurology** 75: 889–97, 2010.

Petersen RC, Caracciolo B, Brayne C, Gauthier S, Jelic V, Fratiglioni L. Mild cognitive impairment: a concept in evolution. **Journal of Internal Medicine** 275(3):214-28, 2014.

Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P and Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. **Lancet** 342(8873):697-699, 1993.

Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. **Science** 274:255-259, 1996.

Pripem A, Watanatorn J, Sutthiparinyanont S, Phachonpai W, Muchimapura S. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. **Nanomedicine** 4:70-78, 2008.

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(4):329-44, 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<sup>-/-</sup> hypercholesterolaemic mice as a model for mild cognitive impairment and neuronal damage. **PLoS One** 6:e22712, 2011.

Raskind MA. Alzheimer's disease: treatment of noncognitive behavioural abnormalities. **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**: 1427-1435, 1995.

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.

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.

Regitz C, Fitzenberger E, Mahn FL, Dußling LM, Wenzel U. Resveratrol reduces amyloid-beta (A $\beta$ 1-42)-induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. **Eur J Nutr**, 2015.

Renaud S, Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet** 339 (8808):1523–1526, 1992.

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

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med** 20:933– 956, 1996.

Sabogal-Guáqueta AM, Muñoz-Manco JI, Ramírez-Pineda JR, Lamprea-Rodriguez M, Osorio E, Cardona-Gómez GP. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. **Neuropharmacology** 93:134-145, 2015.

Saleem TSM, Basha, SB. Red wine: A drink to your heart. **Journal of Cardiovascular Disease Research** 1(4):171-176, 2010.

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.

Selkoe D. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. **Physiol Rev** 81(2):741-766, 2001.

Sereniki A, Vital MABF. A doença de Alzheimer: aspectos fisiológicos e farmacológicos. **Rev Psiquiat RS** 30:17p, 2008.

Shai I, Spence JD, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Parraga G, Rudich A, Fenster A, Mallett C, Liel-Cohen N, et al. Dietary Intervention to Reverse Carotid Atherosclerosis. **Epidemiology and Prevention** 121(10):1200-8, 2010.

Siemann EH e Creasy LL. Concentration of the Phytoalexin resveratrol in wine. **Am. J. Enol. Vitic** 43:49-52, 1992.

Simons LA, Williams PF. Changes in plasma lipoproteins in subjects treated with the bile acid-sequestering resin polidexide (Secholex). **Aust N Z J Med** 6(2):127-30, 1976.

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

Smith C, Marks AD, Lieberman M. Bioquímica Médica Básica de Marks. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 992p.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. **J. Clin. Lab. Anal** 11: 287-313, 1997.

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.

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, 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, 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.

Spencer JP. The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations. **Chem. Soc. Rev** 38:1152–1161, 2009.

Spencer JP. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. **Proc. Nutr. Soc** 69:244–260, 2010a.

Spencer JP. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. **Br. J. Nutr.** V 104 (Suppl. 3):S40–S47, 2010b.

Spencer JPE, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. **Molecular Aspects of Medicine** 33:83–97, 2012.

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.

Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. **Nat Med**, 8(11):1211-7, 2002.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to  $\beta$  amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci USA** 90(5):1977-1981, 1993.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Pasini AF, Garbin U. Effect of calcium antagonist or beta blockade treatment on nitric oxide - dependent vasodilation and oxidative stress in essential hypertensive patients. **J Hypertens** 19:1379-86, 2001.

Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. **Nat. Cell Biol** 2:42-49, 2000.

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.

Valenza N, Cattaneo E. Cholesterol dysfunction in neurodegenerative diseases: Is Huntington's disease in the list? **Progress in Neurobiology** 80:165-176, 2006.

Van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J Neuroscience** 25(38):8680-5, 2005.

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

Vingdeux V, Giliberto L, Zhao H, Chandakkar P, Wu Q, Simon JE., et al. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. **J. Biol. Chem** 285:9100-9113, 2010.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nat Protoc** 1(2):848–858, 2006.

Wang J, Ho L, Zhao Z, Seror I, Humala N. et al. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates A $\beta$  neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. **The FASEB Journal** 20:2013–20, 2006.

Ward A, Arrighi HM, Michels S, Cedarbaum JM. Mild cognitive impairment: disparity of incidence and prevalence estimates. **Alzheimers Dement** 8: 14–21, 2012.

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.

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

Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A et al. The relationship between Ab and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. **J. Neurosci** 22: 1858–67, 2002.

Wilson JD, Lindsey CA, Dietschy JM. Influence of dietary cholesterol on cholesterol metabolism. **Ann. N. Y. Acad Sci** 149:808–821, 1968.

Williams RJ, Spencer JPE. Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine** 52(1):35–45, 2012.

Williamson G. et al. Functional foods for health promotion: state-of-the-science on dietary flavonoids extended abstracts from the 12 Annual Conference on Functional Foods for Health Promotion. **Nutr Rev** 67:736–743, 2009.

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

Wollmer MA, Streffer JR, Lutjohann D, Tsolaki M, Iakovidou V, Hegi T, et al. ABCA1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 24(3): 421-6, 2003.

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.

Zahr NM, Mayer D, Vinco S, Orduna J, Luong R, Sullivan EV, et al. In vivo evidence for alcohol-induced neurochemical changes in rat brain without protracted withdrawal, pronounced thiamine deficiency, or severe liver damage. **Neuropsychopharmacology** 34:1427-1442, 2009.

Zambón 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.



