

Gianni Mancini

**COLESTEROL DIETÉTICO E DOENÇA DE ALZHEIMER EM
MODELOS EXPERIMENTAIS: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA
SINÁPTICA, MITOCONDRIAL E COMPORTAMENTAL**

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

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

Co-orientadores: Dr.^a Ana Ledo e Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira

Florianópolis
2017

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

Mancini, Gianni

Colesterol dietético e doença de Alzheimer em modelos experimentais: avaliação da resposta sináptica, mitocondrial e comportamental / Gianni Mancini ; orientadora, Andreza Fabro de Bem, coorientadora, Ana Margarida Ledo, coorientador, Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, 2017.

118 p.

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

Inclui referências.

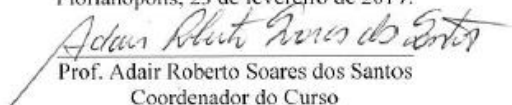
1. Neurociências. 2. Colesterol. 3. Doença de Alzheimer. 4. Hipocampo. I. Bem, Andreza Fabro de. II. Ledo, Ana Margarida. III. Moreira, Eduardo Luiz Gasnhar IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. V. Título.

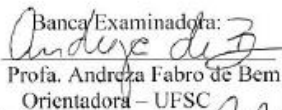
GIANNI MANCINI

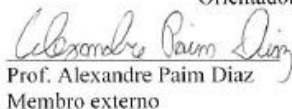
**"COLESTEROL DIETÉTICO E DOENÇA DE ALZHEIMER EM
MODELOS EXPERIMENTAIS: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA
SINÁPTICA, MITOCONDRIAL E COMPORTAMENTAL"**

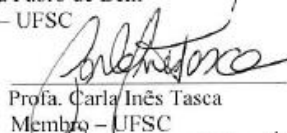
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina

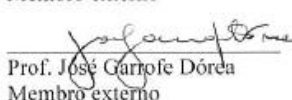
Florianópolis, 23 de fevereiro de 2017.


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

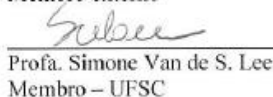
Banca/Examinadora:

Profa. Andreza Fabro de Bem
Orientadora – UFSC

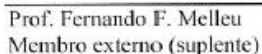

Prof. Alexandre Paim Diaz
Membro externo

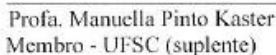

Profa. Carla Inês Tasca
Membro – UFSC


Prof. José Garrofe Dórea
Membro externo


Prof. Leandro José Bertoglio
Membro – UFSC


Profa. Simone Van de S. Lee
Membro – UFSC


Prof. Fernando F. Melleu
Membro externo (suplente)


Profa. Manuella Pinto Kaster
Membro - UFSC (suplente)

Dedico esta Tese a minha companheira Maria
de Lurdes, pelo apoio incondicional em todos
os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família. Principalmente ao meu pai Ivo Mancini (in memoriam) e à minha mãe Elizabeth Lemos Mancini por terem me ensinado a viver, e pelo incentivo, o tempo todo, para seguir meus ideais.

À minha avó Ceci Rocha de Lemos e ao meu avô João Benedito Lemos (in memoriam), por terem também me incentivado para seguir minha carreira e todo apoio possível.

Ao meu Tio Elder Rocha Lemos, que me serve de inspiração pela sua dedicação ao trabalho e aos estudos, além de, ser meu principal incentivador.

À minha esposa, mulher e companheira Maria de Lourdes Gomes da Silva, pela paciência, compreensão e amor durante todo os estudos. Agora ainda mais pela felicidade de termos uma filha linda Bárbara Gomes Mancini

À minha irmã Anna Mancini e seu marido Roberto, por fazerem parte de minha família e me acompanharem nessa trajetória.

Um agradecimento especial à minha orientadora prof. ^a Dra. Andreza Fabro de Bem, pelo seu exemplo de profissionalismo e amor ao trabalho. Por todo momento junto, incentivando, apoiando, compreendendo e principalmente ensinando.

Um agradecimento especial à minha co-orientadora ^a Dra. Ana Ledo. Agradeço-a pela paciência, confiança e dedicação em mim depositada. Agradeço também pelo exemplo de determinação e profissionalismo.

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

Ao meu co-orientador Dr. Eduardo Luiz G. Moreira, pela amizade, incentivo e auxílio durante a realização deste trabalho.

À prof. ^a Dra. Alexandra Latini, pelo apoio e conhecimentos repassados durante todo o doutorado, mestrado, e toda a iniciação científica.

Ao prof. Dr. Marcelo Farina, por ter me apresentado à pesquisa científica, pela amizade, aprendizado e conhecimento.

Aos colegas que participaram ativamente neste trabalho, Bárbara, Daniel e Francisco, pela amizade, aprendizado e auxílio durante a realização deste trabalho. Em especial à Cândida Dias.

Aos grandes amigos Wagner, Richard, Christian, Marcos que conheci e compartilham grandes momentos e ficaram para sempre. Em especial ao Adriano, pelas muitas ideias, discussões e aprendizados.

Aos colegas do Laboratório Ruth, Marcus, Daniel, Letícia, Daiane e demais colegas do Laboratório Neuroquímica 4, Neurobiologia da Depressão e Labox, pela amizade e companheirismo.

Aos técnicos do LAMEB, Vanessa e Denis, pela amizade, disponibilidade e auxílio na utilização de equipamentos.

Aos professores do departamento de Bioquímica, pelos conhecimentos e exemplos passados durante o tempo que estive no laboratório.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Neurociências, pela qualidade do Curso e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores membros da banca de qualificação do doutorado: Dr. Geison Souza Izidio, Dra. Carla Inês Tasca e Dr. Aderbal Aguiar, pelas críticas, sugestões e reflexões adicionais, que contribuíram dando maior consistência e qualidade à tese.

Aos professores membros da banca examinadora do doutorado: Dr. José Garrofe Dórea, Dr. Alexandre Paim Diaz, Dra. Carla Inês Tasca, Dra. Simone Van de Sande Lee, Dra. Manuella Kaster, Dr. Leandro José Bertoglio e Dr. Fernando Melleu pela atenção dispensada na leitura da tese e sugestões para o aprimoramento da versão final

Ao Nivaldo pela paciência e dedicação quanto às questões burocráticas;

À CAPES, CNPq e FAPESC pelos apoios financeiros.

A todos os amigos, que direta ou indiretamente participaram nesta fase da minha vida, minha sincera gratidão!

RESUMO

O colesterol é uma molécula vital do corpo humano. Sua estrutura apresenta características peculiares que lhe conferem diversas funções fisiológicas, desde componente fundamental das membranas plasmáticas, como precursor de hormônios esteroides, sais biliares e da vitamina D, além de, possuir papel chave em mecanismos de aprendizagem e memória, tais como a plasticidade sináptica. A hipercolesterolemia (HC) é um estado encontrado em humanos que apresentam níveis altos de colesterol plasmático. Esta condição é caracterizada por uma desregulação na homeostase do colesterol, portanto sendo considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose e doenças cardiovasculares (DCV). Estudos mostram que a HC induz comprometimento vascular e essa disfunção vascular pode causar doenças cerebrovasculares, como a demência vascular. A doença de Alzheimer (DA) é uma doença multifatorial que afeta tanto o sistema nervoso central (SNC) quanto o sistema periférico. Os indivíduos com DA exibem um severo prejuízo de memória e outros comprometimentos cognitivos. No entanto, as causas do desenvolvimento da DA ainda são desconhecidas. A hipótese vascular para a DA postula que a diminuição do fluxo sanguíneo encefálico (FSE), devido a um comprometimento neurovascular, seria o evento inicial dos processos de neurodegeneração. Reforçando essa hipótese, fatores de riscos associados às doenças vasculares, como a hipercolesterolemia, estão envolvidos no desenvolvimento e progressão da DA. Nesse sentido, a hipótese de trabalho é que prejuízos cognitivos, sinápticos e neurovasculares observados na DA, seriam exacerbados pela hipercolesterolemia induzida por uma dieta enriquecida com colesterol (DC). Para esse fim, alimentamos por 8 semanas triplo transgênicos para estudar a DA (3xTg-DA) e camundongos não transgênicos (NTg), de ambos os sexos, com DC. Os resultados desta tese demonstram que a ingestão de DC induziu hipercolesterolemia em ambos os genótipos sem ganho no peso corporal. Além disso, a DC causou prejuízos de memória espacial e de reconhecimento nos animais NTg que foram similares aos 3xTg-DA. Os NTg que receberam a DC apresentaram alterações no comportamento exploratório e aversivo, e exibiram um aumento na locomoção. Já os camundongos 3xTg-DA não apresentaram uma intensificação nos prejuízos cognitivos, já observados nesse modelo,

induzido pela ingestão de DC. Em seguida buscamos elucidar os mecanismos pelos quais a ingestão de DC induz prejuízos cognitivos em animais NTg. A ingestão de DC induziu uma diminuição na biodisponibilidade de NO e uma diminuição na taxa de consumo de O₂ mitocondrial em fatias hipocâmpais de ambos os genótipos. Finalmente, observamos que a dieta causou um comprometimento na BHE alterando componentes com a aquaporina-4 (AQP-4) nos NTg e a lectina de tomate nos 3xTg-DA. Em conjunto, esses dados encorajam estudos sobre fatores de risco modificáveis, ou seja, uma melhora nos hábitos de vida, principalmente na ingestão alimentar, para indivíduos sem predisposição genética pode trazer benefícios que resultaram em uma melhor qualidade de vida durante o avanço da idade.

Palavras chaves: Colesterol. Hipercolesterolemia. Doença de Alzheimer. 3xTg-DA. Hipocampo. Acoplamento neurovascular. BHE. Óxido nítrico. Consumo de O₂ mitocondrial.

ABSTRACT

Cholesterol is a vital component of the human body. This compound has peculiar characteristics that give it several physiological functions, such as a component of the plasma membranes, as a precursor of steroid hormones, bile salts and vitamin D, moreover, as a key role in mechanisms of learning and memory, such as synaptic plasticity. Hypercholesterolemia (HC) is a human's condition which the subjects display a high plasma cholesterol levels. This status is characterized by deregulation of cholesterol homeostasis, therefore, has been considered the main risk factor for the development and progression of atherosclerosis, and it's the leading cause of death from cardiovascular diseases (CVD). Studies shown that HC induces vascular impairment, and this vascular dysfunction may to cause cerebrovascular diseases, such as vascular dementia. Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial disease that affects both the central nervous system (CNS) and peripheral system. Individuals with AD exhibit severe memory impairment and other cognitive impairments. However, the causes of AD development are still unknown. The vascular hypothesis for AD postulates that the reduction of the cerebral blood flow (CBF), due to a neurovascular uncoupling, for example, would be the initial event of the neurodegeneration processes. Reinforcing this hypothesis, risk factors associated with vascular diseases, as hypercholesterolemia, are involved in the development and progression of AD. In this sense, the hypothesis of this work is that cognitive, synaptic and neurovascular damages observed in AD, would be exacerbated by hypercholesterolemia induced by a high cholesterol diet. To this end, we fed for 8 weeks a triple transgenic mouse (3xTg-AD) and non-transgenic mice (NTg), of both sexes, with a diet enriched in fat/cholesterol (HFCD). Herein, our results show that the ingestion of HFCD induced hypercholesterolemia in both genotypes without body weight gain. In addition, HFCD induced spatial and recognition memory impairment in NTg mice similar to 3xTg-DA mice. NTg HFCD-fed displayed changes in exploratory and aversive behavior, and exhibited increase in locomotion. 3xTg-AD mice did not display an intensification on HFCD-induced cognitive impairments, already observed in this model. Next, we seek to elucidate the mechanisms by which HFCD induces cognitive impairments in NTg mice. The ingestion of HFCD induced a decrease in the ¹⁵N bioavailability and a decrease in the rate of mitochondrial O₂

consumption in hippocampal slices of both genotypes. Finally, we observed that the HFCD induces an impairment in BBB altering components as aquaporin-4 (AQP-4) in NTg mice and tomato lectin in 3xTg-DA mice. Together, the results of the present study reinforce the vascular hypothesis for the development of AD. Thus, these data encourage studies on modifiable risk factors, in other words, an improvement in life habits, especially in food intake, for individuals without genetic predisposition may bring benefits that resulted in a better quality of life during the advancement of the age.

Keywords: Cholesterol. Hypercholesterolemia. Alzheimer's disease. 3xTg-AD. Hippocampus. Neurovascular coupling. BBB. Nitric oxide. Mitochondrial O₂ consumption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do colesterol e principais reações de sua biossíntese. Em destaque na molécula.....	21
Figura 2.	Principais fontes e vias de excreção do colesterol hepático, e a composição das principais lipoproteínas.....	22
Figura 3.	Principais fatores de risco relacionados às doenças cardiovasculares e ao desenvolvimento da DA.....	26
Figura 4.	Microdomínio de membrana plasmática – ‘Lipid Rafts’ (adaptado de WAHEED; FREED, 2010).....	28
Figura 5.	Metabolismo do colesterol no SNC. Transporte do colesterol dos astrócitos para os neurônios no cérebro adult.....	29
Figura 6.	Linha de tempo fenotípica dos camundongos 3xTg-DA (Fonte: http://www.alzforum.org).....	33
Figura 7.	Resumo das hipóteses amiloide e vascular para a DA (adaptado de LA TORRE, DE, 2004).....	36
Figura 8.	Esquema de uma fatia hipocampal e sua circuito arquitetura (adaptado de DENG et al., 2010).....	40
Figura 9.	Unidade Neurovascular (adaptado de KELLEHER; SOIZA, 2013).....	41
Figura 10.	Acoplamento neurovascular mediada pelo •NO (adaptado de LOURENÇO et al., 2014).....	44
Figura 11.	Esquema da determinação biodisponibilidade do óxido nítrico em fatias hipocampais	46
Figura 12.	Resumo esquemático do protocolo experimental.....	54
Figura 13.	Resumo esquemático da sequência dos testes comportamentais	56
Figura 14.	Resumo esquemático do teste de reconhecimento de objeto novo.....	58
Figura 15.	Resumo esquemático do teste Y-M.....	59
Figura 16.	Esquema de um protocolo padrão utilizado neste estudo demonstrando os principais	63
Figura 17.	Níveis plasmáticos de colesterol total (A) e a variação de ganho de peso (B) durante as 8 semanas	67
Figura 18.	Distância total percorrida (A) em cm na arena do campo aberto e desenho representativo do	68
Figura 19.	Distância percorrida a intervalos de 2 minutos (A) na arena do campo aberto e levantamento	69
Figura 20.	Teste de reconhecimento de objeto novo. (NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo	70
Figura 21.	Labirinto em forma de Y- modificado. (A) tempo gasto e (B) número de entradas em cada.....	71
Figura 22.	Tempo de latência em segundos (NTg= animal não	

	transgênico, 3xTg-DA= animal	72
Figura 23.	Tempo gasto (A) e número de entradas (B) no braço aberto no EPM e (C) tempo de imobilidade	73
Figura 24.	Figura representativa da modificação do slope, apresentada como % em relação à linha de base.....	75
Figura 25.	(A) % de amplitude do sinal dos últimos 60 min após a estimulação tetânica. (B) Razão P2/P1	76
Figura 26.	Concentração máximo de •NO (A) e taxa de decaimento do sinal de •NO (B).....	77
Figura 27.	Esquema representativa do protocolo de respirometria em fatias hipocâmpais.....	78
Figura 28.	Taxa de consumo de oxigênio (OCR) associado à respiração basal das fatias, ao estado de LEAK.....	79
Figura 29.	Os painéis (A) e (B) mostram imagens representativas de imunorreatividade para AQP-4	81
Figura 30.	Os painéis (A) e (B) mostram imagens representativas de imunorreatividade para lectina de tomate.....	83
Figura 31.	Esquema representativo dos principais efeitos da DC em camundongos NTg (A) e em 3xTg-DA	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas.....	55
Tabela 2. Resumo dos resultados dos testes cognitivos.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\dot{\text{NO}}$, do inglês nitric oxide – óxido nítrico
24-OH – 24-hidroxicolesterol
27-OH – 27-hidroxicolesterol
3-Br-7-NI – 3-bromo-7-nitroindazol
3xTg-DA – camundongos triplos transgênicos para a doença de Alzheimer
AA – antimicina-A
acetil-CoA – acetilcoenzima A
aCSF, do inglês artificial cerebrospinal fluid – líquido cefalorraquidiano artificial
AMPA, do inglês α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate
ANOVA – análise de variância
apoB-100 – apolipoproteína B-100
apoE^{-/-} – apolipoproteína E
AQP-4 – aquaporina
ATP prod –OCR dependente da produção de ATP
BHE – barreira hemato-encefálica
CaCl₂ – cloreto de cálcio
CaMKII – complexo cálcio-calmodulina-II
Cat – Carboxiatractilósido
CO₂ – dióxido de carbono
DA – doença de Alzheimer
DC dieta enriquecida de colesterol
DCV – doenças cardiovasculares
DN – dieta normal
DNA, do inglês deoxyribonucleic acid – ácido desoxirribonucleico
DVa – demência vascular
E, do inglês east – Leste
eNOS – $\dot{\text{NO}}$ sintase endotelial
EROs – espécies reativas de oxigênio
ETS, do inglês electron transport system
FCCP, do inglês carbonilcyanide p-triflouromethoxyphenyl hydrazone – carbonilcianida p-triflourometoxifenil-hidrazona
FCV, do inglês fast cyclic voltammetry – voltametria cíclica rápida
FSE – fluxo de sangue encefálico
HC – Hipercolesterolemia
HDL-c, do inglês High Density lipoprotein – lipoproteína de alta densidade
HF – Hipercolesterolemia Familiar
HS, do inglês horse serum – soro de cavalo
IDL-c, do inglês Intermediate density Lipoprotein – lipoproteína de densidade intermediária
iNOS – $\dot{\text{NO}}$ sintase induzível

KCl – cloreto de potássio
KH₂PO₄ – fosfato monopotássico
LDL-c, do inglês Low density Lipoprotein – lipoproteínas de baixa densidade
LDLr – via receptores de LDL
LDLr^{-/-} – receptor de LDL-c
LEAK – estado mitocondrial de vazamento
LEC – Labirinto elevado em forma de cruz
LTP, do inglês long term potentiation – uma potenciação de longa duração
MgSO₄ – Sulfato de magnésio
N, do inglês north – norte
NaCl – cloreto de sódio
NaHPO₄ – sulfato de sódio
NMDA do inglês N-methyl-D-aspartate
nNOS – NO sintase neuronal
NOS – NO sintases
NTg – não transgênico
O₂ – oxigênio
OCR, do inglês oxygen consumption rate – taxa de consumo de O₂
OMS – Organização mundial da Saúde
Omy – Oligomicina
PBS – do inglês Phosphate-buffered saline
PEPSs – potenciais excitatórios pós-sinápticos
PPA – proteína percussora amiloide,
PPA/PS1 – camundongos duplos transgênicos
PS-1 – presenilina-1 e
PS-2 – presenilina-2
ROT – rotenona
S, do inglês south – sul
SNC – sistema nervoso central
TBS, do inglês triton buffer saline – solução salina tris-tamponada
TCA – teste do campo aberto
TF – tempo gasto explorando objeto familiar
TN - tempo gasto explorando o novo objeto
TRO – teste de reconhecimento de objeto novo
TSC– teste de suspensão pela cauda
VLDL-c, do inglês Very Low Density lipoprotein – lipoproteína de densidade muito baixa
W do inglês west – Oeste
W-M, do inglês Water-maze – labirinto aquático
Y-M, do inglês Y-maze – labirinto em forma de Y-modificado
β-A – peptídeo beta-amilóide

SUMÁRIO

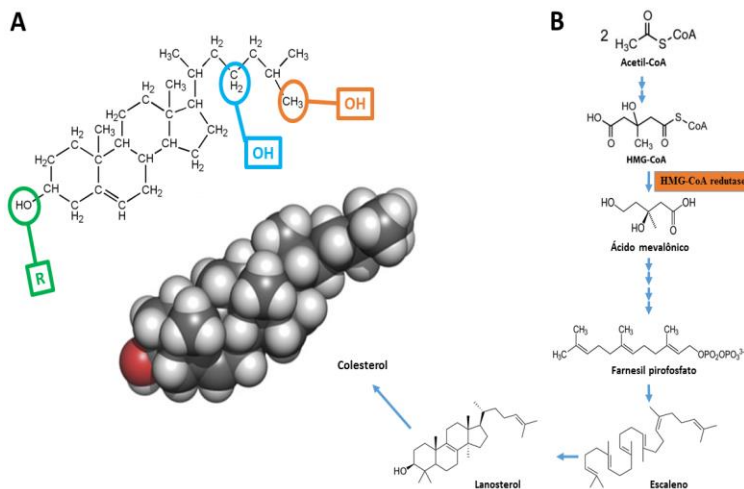
1.	INTRODUÇÃO	21
1.1.	HIPERCOLESTEROLEMIA	23
1.2.	A HIPERCOLESTEROLEMIA E A DISFUNÇÃO VASCULAR	24
1.3.	COLESTEROL E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	27
1.4.	DOENÇA CEREBROVASCULAR	30
1.5.	DOENÇA DE ALZHEIMER	31
1.5.1.	Modelos animais para o estudo da doença de Alzheimer	32
1.5.2.	Camundongos triplos transgênicos para a Doença de Alzheimer (3xTg-DA)	33
1.5.3.	Fatores de risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer esporádica	34
1.5.4.	Hipótese vascular para a Doença de Alzheimer	35
1.6.	HIPERCOLESTEROLEMIA E A DOENÇA DE ALZHEIMER	36
1.7.	FORMAÇÃO HIPOCAMPAL E O ACOPLAMENTO NEUROVASCULAR	39
1.7.1.	Hipocampo e a Potenciação de Longa Duração	39
1.7.2.	Modelo de estudo em fatias hipocampais	40
1.7.3.	Acoplamento neurovascular	41
1.8.	BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO E A LTP NO HIPOCAMPO	44
1.9.	DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E A DOENÇA DE ALZHEIMER	46
2.	JUSTIFICATIVAS	49
3.	OBJETIVOS	51
3.1.	OBJETIVO GERAL	51
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1.	REAGENTES	53
4.2.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	53
4.3.	ANIMAIS	53
4.4.	DESENHO EXPERIMENTAL	54
4.4.1	A hipercolesterolemia induzida por modificação dietética causa prejuízos cognitivos, disfunção sináptica e neurovascular similar a doença de Alzheimer?	54

4.5.	NÍVEIS DE COLESTEROL PLASMÁTICO	55
4.6.	TESTES COMPORTAMENTAIS	56
4.6.1.	Labirinto elevado em forma de cruz	56
4.6.2.	Teste do campo aberto	57
4.6.3.	Teste de reconhecimento de objeto novo	57
4.6.4.	Labirinto em forma de Y-modificado	58
4.6.5	Labirinto aquático	59
4.6.6.	Teste de suspensão pela cauda	60
4.7.	PREPARAÇÃO DE FATIAS HIPOCAMPAIS	60
4.8.	ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICAS	61
4.9.	DINÂMICA DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	61
4.10.	CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL	62
4.11.	IMUNOFLUORESCÊNCIA	64
4.12.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	65
5.	RESULTADOS	67
5.1.	A INGESTÃO DA DC POR 8 SEMANAS É CAPAZ DE INDUZIR HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS NTG E 3XTG-DA?	67
5.2.	A INGESTÃO DA DC POR 8 SEMANAS É CAPAZ DE INDUZIR PREJUÍZOS COGNITIVOS EM CAMUNDONGOS NTG SIMILAR AOS CAMUNDONGOS 3XTG-DA E INTENSIFICAR OS PREJUÍZOS NOS 3XTG-DA?	68
5.3.	A INGESTÃO DA DC INDUZIU ALTERAÇÕES SOBRE A PLASTICIDADE SINÁPTICA DE CAMUNDONGOS NTG E 3XTG-DA?	75
5.4.	A INGESTÃO DA DC POSSUI EFEITOS SOBRE A BIODISPONIBILIDADE DE NO DE CAMUNDONGOS NTG E 3XTG-DA?	77
5.5.	A INGESTÃO DA DC INDUZIU ALTERAÇÕES SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL DE CAMUNDONGOS NTG E 3XTG-DA?	78
5.6.	A INGESTÃO DA DC É CAPAZ DE ALTERAR A INTEGRIDADE DA BHE DE CAMUNDONGOS NTG E 3XTG-DA?	80
6.	DISCUSSÃO	85
7.	CONCLUSÕES PONTUAIS	95
	REFERÊNCIAS	97

1. INTRODUÇÃO

O colesterol é um componente vital do corpo humano. É uma molécula orgânica anfipática, que possui uma região hidrofílica com um grupo hidroxila no carbono 3 (cabeça polar), e uma região hidrofóbica no carbono 17 (cadeia lateral acila - apolar) do núcleo esteroide planar de 4 anéis (GROULEFF et al., 2015) (Fig.1A). Dessa forma, o colesterol possui diversas funções fisiológicas, desde componente fundamental das membranas plasmáticas em todas as células animais (YEAGLE, 1985), como precursor de hormônios esteroides, sais biliares e da vitamina D (GOLDSTEIN; BROWN, 1990), além de, possuir papel chave na transmissão e plasticidade sináptica (PFRIEGER, F., 2003). Devido sua importância, todas as células são capazes de sintetizá-lo a partir de acetilcoenzima A (acetil-CoA) (Fig.1B), portanto, não é necessário que esteja presente na dieta de mamíferos (LECERF; LORGERIL, DE, 2011).

Figura 1. Estrutura do colesterol e principais reações de sua biossíntese. Em destaque na molécula de colesterol algumas de suas modificações fisiológicas; em verde a reação de esterificação; em azul a reação de formação do 24-hidroxicolesterol, e em laranja reação de formação do 27-hidroxicolesterol.

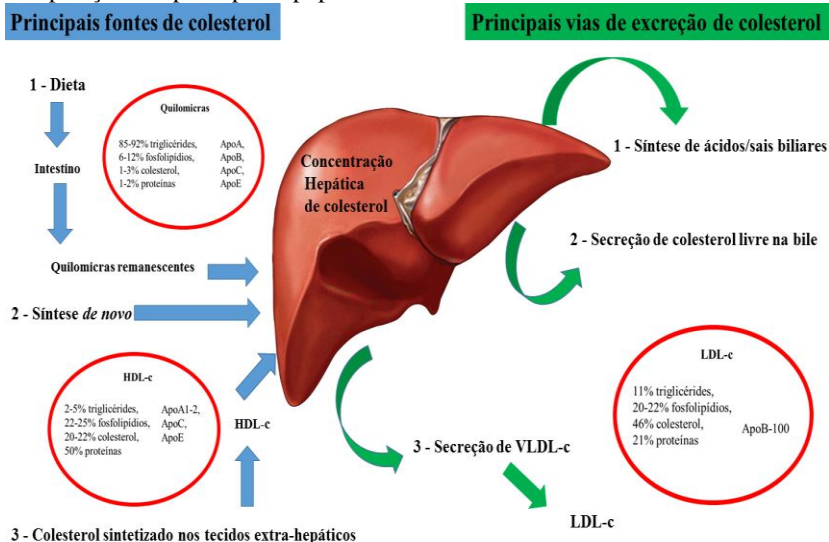


(Adaptado de NELSON; COX, 2011).

Nos animais adultos, durante o estado fisiológico basal, o fígado excreta diariamente uma quantidade de colesterol que corresponde à mesma quantidade que é sintetizada nos tecidos somados com aquele

colesterol proveniente da ingestão alimentar (DIETSCHY et al., 1993). A biossíntese de colesterol é complexa, e a sua regulação nos mamíferos é mediada pela concentração intracelular de colesterol. O colesterol é captado no lúmen intestinal e transportado para o fígado por meio dos quilomicrons – as maiores e menos densas lipoproteínas, contendo uma alta concentração de triacilgliceróis comparada com a de colesterol (KANE et al., 1980). Portanto, o fígado desempenha um papel central nos processos de excreção e biossíntese de esteróis (Fig.2).

Figura 2. Principais fontes e vias de excreção do colesterol hepático, e a composição das principais lipoproteínas.



(Adaptado de CHAMPE et al., 2006).

Além disso, é considerado o principal órgão responsável pela manutenção da homeostase de colesterol corporal, bem como, pela produção e degradação das lipoproteínas de baixa densidade carregadoras de colesterol (LDL-c, do inglês Low Density Lipoprotein). Uma pequena parte de colesterol recém-sintetizado é incorporada na membrana do hepatócito, e a maioria é exportada para os outros tecidos e órgãos.

Esse transporte para os tecidos ocorre pelo sangue através de lipoproteínas plasmáticas carregadoras de colesterol, tais com a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-c, do inglês Very Low Density Lipoprotein), lipoproteína de densidade intermediária (IDL-c,

do inglês Intermediate Density Lipoprotein) e lipoproteína de alta densidade (HDL-c, do inglês High Density Lipoprotein). Todavia, em humanos a principal lipoproteína transportadora de colesterol é a LDL-c. A captura de LDL-c pelas células hepáticas é efetuada via receptores de LDL (LDLr) que reconhecem a apolipoproteína B-100 (apoB-100), num processo conhecido com endocitose mediada por receptor (BROWN; GOLDSTEIN, 1983). As descobertas sobre a regulação do metabolismo do colesterol renderam a Michael S. Brown e Joseph L. Goldstein o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1985 (GOLDSTEIN; BROWN, 2009).

Quando a soma do colesterol sintetizado e do obtido da dieta excede a quantidade necessária, ou seja, quando existe uma desregulação no metabolismo de colesterol, pode ocorrer um aumento na concentração plasmática de colesterol, caracterizando um estado de hipercolesterolemia (HC). A HC está envolvida em sérias condições patológicas em humanos, como aterosclerose (ROSS, 1999), doença hepática não alcoólica (WOUTERS et al., 2008) e demência vascular (DVa) (KALMIJN et al., 1997; KIVIPELTO et al., 2005).

1.1. HIPERCOLESTEROLEMIA

A hipercolesterolemia é o principal fator de risco para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose e está estreitamente relacionada com as doenças cardiovasculares (DCV) (GOTTO, 1997; ROSS, 1999). O excesso de colesterol se acumula nas paredes de grandes vasos (artérias) formando placas volumosas que reduzem o fluxo de sangue até a eventual formação e desprendimento do coágulo, o que pode obstruir vasos de pequeno calibre e causar infarto agudo do miocárdio e/ou acidente vascular encefálico (HANSSON; HERMANSSON, 2011).

Nas últimas décadas, vem ocorrendo uma transição nutricional global, da subnutrição para um consumo excessivo de alimentos. De fato, a substituição de dietas tradicionais por alimentos processados e facilmente disponíveis, que são ricos em carboidratos refinados, gorduras animais e óleos comestíveis resultou em uma pandemia global de obesidade (TRAILL et al., 2014). Este alto teor de gordura e colesterol na dieta, favorece o desequilíbrio na homeostase de lipídeos, que contribui para o desenvolvimento de hipercolesterolemia e assim, aumenta significativamente os riscos de desenvolver uma série de condições patológicas, como as DCV (WEBER; NOELS, 2011), DVa

(KALMIJN et al., 1997) e a doença de Alzheimer (DA) (KIVIPELTO et al., 2005). Estima-se que 17,3 milhões de pessoas em todo o mundo morreram em consequência das doenças cardiovasculares no ano de 2008, representando 30% de todas as causas de mortes (MENDIS et al., 2011).

Dentre as patologias associadas ao desequilíbrio da homeostase do colesterol, existe uma em especial, no qual os indivíduos possuem concentrações extremamente elevadas de colesterol no plasma. Este aumento é devido a um defeito no receptor de LDL (LDLr) o qual não consegue metabolizar a LDL-c, caracterizando a doença genética conhecida como Hipercolesterolemia Familiar (HF). O fenótipo clínico de HF é geralmente decorrente de defeitos no gene *LDLR*, que codifica o LDLr, e é herdada como uma característica monogênica dominante (SIBLEY; STONE, 2006). Segundo a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (SIMÃO et al., 2013), os níveis sanguíneos de colesterol plasmático dos pacientes homocigotos para a doença, são cinco vezes maiores (1g por dL de plasma) do que em pessoas saudáveis (0,2g por dL de plasma). A aterosclerose grave e o infarto do miocárdio podem ocorrer já na adolescência, com prevalência de 1 em 1 milhão no caso de indivíduos homocigotos. Indivíduos que herdaram apenas um gene mutante (heterocigotos) desenvolvem sintomas mais tardiamente na vida (de 35 a 55 anos de idade) e com maior prevalência, de 1 em 200-500 pessoas. Seus níveis de colesterol são cerca de 2-3 vezes maiores do que em pessoas normais (0,6g por dL de plasma).

1.2. A HIPERCOLESTEROLEMIA E A DISFUNÇÃO VASCULAR

Ao longo das duas últimas décadas tornou-se evidente que o endotélio não é um revestimento inerte de célula única que cobre a superfície interna dos vasos sanguíneos, mas na verdade desempenha um papel crucial na regulação do tônus e da estrutura vascular (LANDMESSER et al., 2004). O óxido nítrico ($^{\circ}\text{NO}$, do inglês “nitric oxide”) derivado do endotélio, sintetizado pela $^{\circ}\text{NO}$ sintase endotelial (eNOS, do inglês “endothelial nitric oxide synthase”) a partir da L-arginina, não é apenas um mediador principal da vasodilatação dependente do endotélio, mas também está implicado criticamente na regulação de outras propriedades protetoras do endotélio saudável (LANDMESSER et al., 2004). Uma lesão ou ativação do endotélio alteram suas funções regulatórias e resultam em sua disfunção. Além

disso, condições comuns que predisõem à aterosclerose, como hipercolesterolemia, estão associadas à disfunção endotelial, levando a um fenótipo pró-inflamatório e pró-trombótico (LANDMESSER et al., 2000; BOAK; CHIN-DUSTING, 2004).

A primeira evidência experimental que relacionou a hipercolesterolemia com disfunção vascular foi observado pelo patologista russo Nikolaj N. Anitschkow (1885-1964), que após alimentar coelhos com dieta enriquecida com colesterol, observou que os animais apresentaram lesões vasculares muito semelhantes às observadas na aterosclerose humana (KONSTANTINOV et al., 2006). Posteriormente estudos em animais e humanos mostraram que a hipercolesterolemia causa a ativação focal do endotélio em grandes e médias artérias, alterando a biodisponibilidade de $^{\circ}\text{NO}$, que inicia um processo inflamatório nas paredes dos vasos culminando no processo aterogênico (HANSSON, 2005).

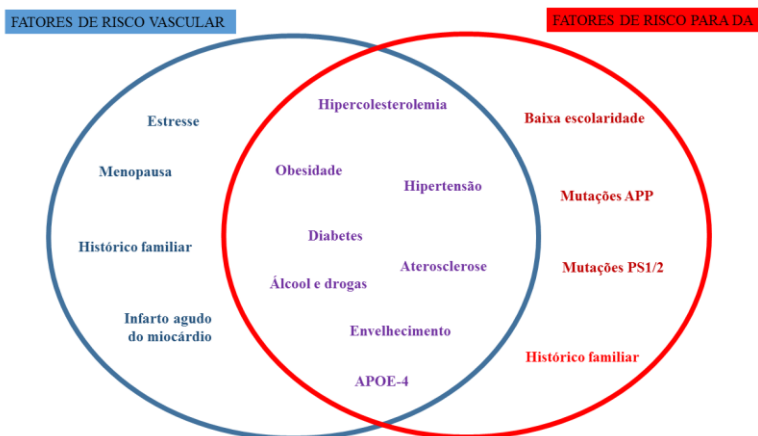
Com o avanço na utilização de animais modificados geneticamente, o estudo da hipercolesterolemia e seu envolvimento com a disfunção vascular ganhou força para melhor entender os mecanismos e buscar alternativas de tratamentos. Os camundongos com deleção gênica da apolipoproteína E (apoE^{-/-}) ou do receptor de LDL-c (LDLr^{-/-}) são amplamente empregados na atualidade, e ambos fornecem uma ferramenta prática para o estudo da hipercolesterolemia e suas consequências. Os camundongos LDLr^{-/-} foram desenvolvidos por Ishibashi e colaboradores no início da década de 90. Eles representam um modelo de HF, caracterizada por níveis moderados de LDL-c, com aumento de 2 vezes quando submetidos a uma dieta padrão, todavia, se for administrada uma dieta enriquecida com colesterol, os níveis plasmático aumentam consideravelmente (cerca de 5 a 8 vezes), desenvolvendo grandes lesões ateroscleróticas (ISHIBASHI et al., 1993).

Em um trabalho recente de nosso grupo de pesquisa demonstramos que camundongos LDLr^{-/-} apresentam níveis de colesterol plasmático cerca de 2 vezes maiores que os níveis plasmáticos de camundongos selvagens, independentemente da idade dos animais (MANCINI et al., 2014). Além disso, observamos que os camundongos hipercolesterolêmicos apresentaram uma diminuição no conteúdo de glutatona na aorta, que foi correlacionado negativamente com os níveis plasmáticos de colesterol, sugerindo uma possível associação entre a hipercolesterolemia e um comprometimento vascular nos camundongos LDLr^{-/-} (MANCINI et al., 2014). A glutatona é o antioxidante intracelular mais abundante e confere proteção contra danos oxidativos

(PRICE et al., 2000; YUNG et al., 2006). Um comprometimento no sistema antioxidante relacionado à glutatona no sistema vascular gera estresse oxidativo vascular e compromete as atividades fisiológicas do endotélio predispondo à aterosclerose (LI et al., 2014).

Nas últimas décadas o avanço no tratamento de doenças associadas com uma alta mortalidade, como as DCV, também vem resultando em um aumento na expectativa de vida da população e consequente aumento na prevalência de patologias associadas ao envelhecimento, como as doenças neurodegenerativas. Além disso, diversos trabalhos vêm demonstrando que muitos fatores de riscos associados às DCV, como a hipercolesterolemia, diabetes e obesidade, estão sendo considerados fatores de risco para o desenvolvimento de doenças que apresentam prejuízos cognitivos, como a doença cerebrovascular e DA (O'BRIEN et al., 2003; GORELICK et al., 2011; D.A., 2014). A figura 3 ilustra os principais fatores de riscos associados às doenças vasculares e o desenvolvimento da DA.

Figura 3. Principais fatores de risco relacionados às doenças cardiovasculares e ao desenvolvimento da DA.



(Fonte: Autor).

O fato de doenças vasculares e a DA compartilharem muitos fatores de riscos indica que seus mecanismos fisiopatológicos estão conectados. Portanto, a disfunção cerebrovascular pode ser um dos principais contribuintes para o desenvolvimento da DA (LA TORRE, DE, 2002; ALTMAN; RUTLEDGE, 2010a; KALARIA, 2010; GRAMMAS et al., 2011).

1.3. COLESTEROL E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Neurônios, assim como todas as outras células do corpo, necessitam de um suprimento constante de colesterol não esterificado. Este esterol deve vir a partir da absorção do ambiente extracelular utilizando ligantes específicos e transportadores de membrana (POSSE DE CHAVES et al., 1997), ou e de maneira mais atuante através da síntese “de novo” dentro das células neurais a partir de acetil-CoA (DIETSCHY; TURLEY, 2001). A biossíntese de colesterol envolve uma série altamente complexa de, pelo menos, trinta reações enzimáticas, e essa descoberta resultou no Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1964, aos pesquisadores Konrad Bloch e Feodor Lynen. O passo limitante da velocidade na biossíntese do colesterol e grande alvo farmacológico é a conversão da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) em mevalonato (Fig.1B), catalisada pela enzima HMG-CoA redutase (BURG; ESPENSHADE, 2011).

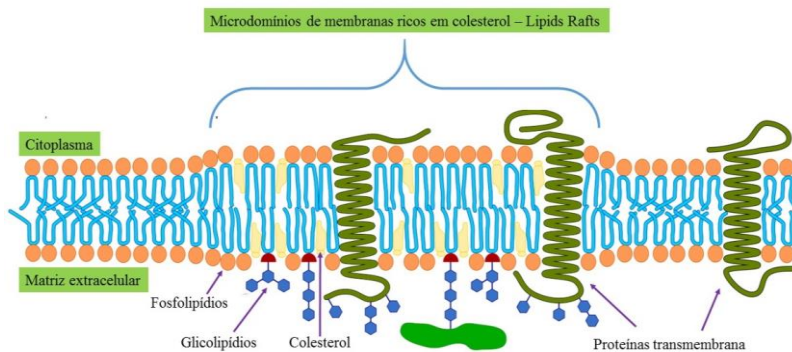
O colesterol é fundamental para a formação, estabilização e plasticidade sináptica no SNC (PFRIEGER, F. W., 2003). Estudos mostram que membrana vesicular sináptica contém altas concentrações de colesterol comparado às outras organelas (THIELE et al., 2000; PFRIEGER, F., 2003). Além disso, o colesterol está envolvido na interação colesterol-proteínas nas membranas e em microdomínios ricos em colesterol que favorece a curvatura da vesícula e seguinte liberação do conteúdo na fenda sináptica (HUTTNER; ZIMMERBERG, 2001). Proteínas de vesículas sinápticas como a sinaptofisina e sinaptobrevina são apontadas como possíveis alvos de complexação com colesterol (MITTER et al., 2003). Em conjunto, estes dados sugerem que para a síntese, transporte e liberação do conteúdo de vesículas pré-sinápticas são necessárias grandes quantidades de colesterol.

Por outro lado, a estabilidade das conexões sinápticas provavelmente depende de moléculas de adesão que unem os elementos pré e pós-sinápticos. Sua função pode depender do colesterol, considerando evidências de que muitas moléculas de adesão celular são localizadas nos microdomínios ricos de colesterol, incluindo as integrinas e caderinas (SIMONS; TOOMRE, 2000; LEITINGER; HOGG, 2002; TSUI-PIERCHALA et al., 2002).

Como mencionado anteriormente, o colesterol determina propriedades biofísicas das membranas, devido à diminuição na permeabilidade e regulação da fluidez. Além disso, o colesterol define propriedades funcionais de proteínas de membranas, como canais

iônicos e receptores devido as interações colesterol-proteínas (YEAGLE, 1985; BASTIAANSE, 1997; BURGER et al., 2000). Uma das características mais notáveis do colesterol nas membranas é formação desses microdomínios de membranas ricos em colesterol e esfingolipídios, conhecidos do inglês como “Lipid Rafts”. Essas estruturas especializadas de membranas servem como plataformas que concentram componentes celulares importantes para sinalização celular (TSUI-PIERCHALA et al., 2002; ZONTA; MINICHELLO, 2013). De importante relevância, componentes fundamentais para manutenção da barreira hemato-encefálica (BHE), como os canais proteicos permeáveis a água conhecidos como aquaporinas, e proteínas da junção oclusiva, como a ocludina, estão localizadas nos microdomínios ricos de colesterol (NUSRAT et al., 2000). Portanto, alterações na homeostase de colesterol podem causar um colapso nos *lipid rafts* e culminar em perturbação na BHE, alterando sua permeabilidade (TAKECHI, RYUSUKE et al., 2013; MORGAN et al., 2014). A Figura 4 ilustra de forma esquemática uma estrutura de *lipid rafts*.

Figura 4. Microdomínio de membrana plasmática – ‘Lipid Rafts’.

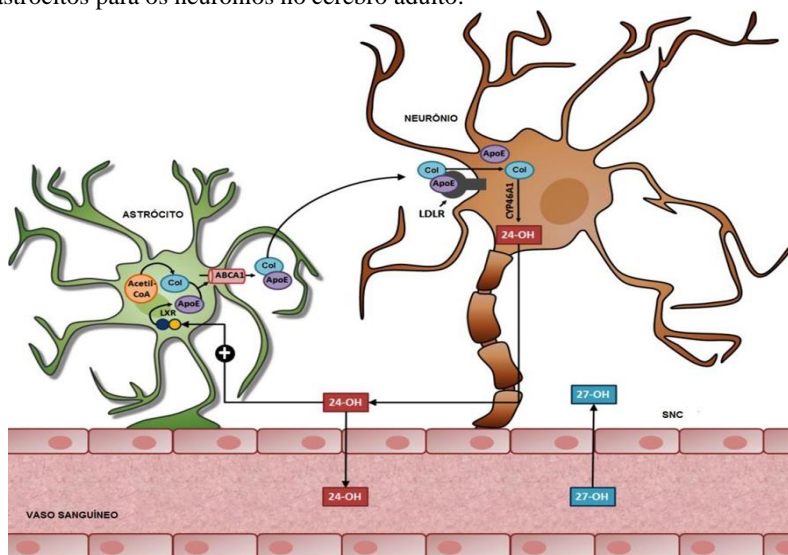


(Adaptado de WAHEED; FREED, 2010).

Cerca de 1/4 de todo colesterol corporal encontra-se no sistema nervoso central (SNC) e, apesar dos níveis plasmáticos de colesterol oscilarem durante o dia, os níveis cerebrais permanecem constantes. Em outras palavras, o colesterol cerebral possui um metabolismo particular por estar isolado do restante do corpo por meio da BHE (DIETSCHY; TURLEY, 2001). O colesterol excedente do SNC é convertido em 24-hidroxicolesterol (24-OH) pela enzima 24S-hidroxilase, e assim pode atravessar a BHE e ser excretado e metabolizado no fígado. Por outro

lado, o colesterol periférico pode ser convertido em 27-hidroxicolesterol (27-OH) pela enzima 27S-hidroxilase, e também pode atravessar a BHE (HEVERIN et al., 2005; BJÖRKHEM, 2006)(Fig.5).

Figura 5. Metabolismo do colesterol no SNC. Transporte do colesterol dos astrócitos para os neurônios no cérebro adulto.



(Traduzido de Moreira et al., 2014).

Portanto, níveis altos de colesterol circulante estão associados com níveis altos de 27-OH plasmático e, assim, pode-se especular que o influxo de 27-OH para o cérebro, em condições de hipercolesterolemia, esteja aumentado, como recentemente observado em coelhos (BROOKS et al., 2017).

Em análises *post-mortem* de cérebros de indivíduos com quadro clínico de DA foi demonstrado um significativo aumento nos níveis de 27-OH (SHAFATI et al., 2011). De modo notável, um estudo de Heverin e colaboradores (HEVERIN et al., 2014) mostrou que camundongos nocautes para a enzima 27S-hidroxilase não apresentaram prejuízos de memória após a ingestão crônica de dieta hipercolesterolêmica. Assim o colesterol dietético não é metabolizado a 27-OH e os níveis no SNC estariam diminuídos comparados aos animais selvagem que receberam a dieta. Em conjunto, este e outros estudos envolvendo o 27-OH (MATEOS et al., 2009) sugerem que os metabólitos oxidados do colesterol possam ser a via pelo qual o

colesterol possa estar induzindo prejuízos cognitivos (SCHREURS, 2010). Estes produtos oxidados de colesterol são moduladores de fatores de transcrição da própria biossíntese do colesterol (SCHROEPFER, 2000) e também pode afetar o desenvolvimento de calcificação em células vasculares (WATSON et al., 1994). Além disso, estão envolvidos na modificação oxidativas da LDL-c, na patogênese da aterosclerose (BROWN; JESSUP, 1999).

Até aqui podemos observar que a manutenção da integridade da BHE, bem como a plasticidade sináptica são particularmente sensíveis as alterações nas concentrações de colesterol. Dessa forma, podemos sugerir que uma perturbação na BHE devido a uma alteração na homeostase de colesterol, pode resultar em um comprometimento na função sináptica, que em última instância, causaria danos cognitivos (ZLOKOVIC, 2005; DO et al., 2014).

1.4. DOENÇA CEREBROVASCULAR

A doença cerebrovascular é uma doença vascular da circulação encefálica, que está associada a um grupo de condições que afetam o fornecimento de sangue para o cérebro, causando limitado ou nenhum fluxo de sangue encefálico (FSE) para as áreas afetadas (KUHLENCORDT et al., 2009). As doenças cerebrovasculares, tais como ataque isquêmico transitório, acidente vascular encefálico, hemorragia subaracnóidea e demência vascular, tornaram-se as principais causas de invalidez e mortalidade a longo prazo em todo o mundo (SABAYAN et al., 2012; ZHU et al., 2016).

A demência vascular é o segundo tipo de demência mais comum, representando cerca de 10% dos casos, ficando atrás da DA, que é responsável por 60 a 80 % dos casos de demência. Muitos especialistas acreditam que a demência vascular permanece subdiagnosticada - como DA - mesmo que sejam reconhecidas como diferentes (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2013). Um fluxo sanguíneo inadequado pode danificar e matar células em todo o corpo, e o SNC tem uma rica rede de vasos sanguíneos, as quais são muito vulneráveis ao estresse oxidativo e inflamação (GORELICK et al., 2011). Na demência vascular, as mudanças no perfil cognitivo podem ocorrer logo após um acidente vascular encefálico leve ou imperceptível, no qual os principais vasos sanguíneos do encéfalo são bloqueados (KORCZYN et al., 2012; SABAYAN et al., 2012). Alterações vasculares cerebrais muitas vezes coexistem com alterações ligadas a outros tipos de demência, incluindo

a doença de Alzheimer e demência com corpos de Lewy. Estudos mostram que as alterações vasculares e outras anomalias cerebrais podem interagir de forma a aumentar a probabilidade de diagnóstico de demência (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2013).

1.5. DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é uma enfermidade progressiva e irreversível envolvendo grave distúrbio na memória e cognição, que inevitavelmente resulta na necessidade de cuidados intensivos (BLENNOW et al., 2006). Estima-se que, em todo o mundo, cerca de 50 milhões de pacientes apresentam a DA, e prognósticos preveem que este número possa duplicar a cada 20 anos, atingindo cerca de 75 milhões de pessoas até 2030 e 130 milhões até 2050 de acordo com o World Alzheimer Report (PRINCE et al., 2015). No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ), a doença acomete cerca de 1,2 milhões de indivíduos.

Embora o principal fator de risco para a DA é o aumento da idade, a doença não é uma parte normal do envelhecimento. A maioria dos pacientes apresentam 65 anos de idade ou mais; sendo que existe uma pequena parcela desenvolvem a DA de início precoce, a qual surge pelos 40 ou 50 anos de idade (DATA, 2014). O termo DA refere-se a uma condição neuropatológica que possui duas principais alterações histológicas que caracterizam a doença: (1) emaranhados neurofibrilares resultados da hiperfosforilação da tau, proteína associada aos microtúbulos, e (2) formação de placas senis a partir da agregação de peptídeos β -amiloide (β -A), especialmente nas estruturas do lobo temporal medial e áreas corticais do encéfalo (REIMAN; CASELLI, 1999; BLENNOW et al., 2006).

Clinicamente, esta neuropatologia está relacionada a um severo prejuízo de memória e de outros comprometimentos cognitivos, como perda de raciocínio, habilidade espacial, mudanças na personalidade (e.g., mistura de comportamento agressivo com desilusões), além de, em última análise, incapacidade total e consequentemente a morte (MUNOZ; FELDMAN, 2000; ARMSTRONG, 2013). Mutações nos genes relacionados com o processamento da proteína percussora amiloide (PPA), presenilina-1 (PS-1) e presenilina-2 (PS-2) caracterizam a DA de origem genética (DA familiar ou de início precoce), representando uma pequena fração do total dos casos (de 1 a 5%) (BERTRAM; TANZI, 2008). A grande maioria dos casos é DA de origem esporádica (ou de início tardio) (95% dos casos), uma forma

mais complexa da doença, resultando a partir da combinação de fatores genéticos e ambientais (BALIN; HUDSON, 2014).

A DA é classicamente vista como um processo primário de neurodegeneração. No entanto, na fase final da doença, é bem conhecido que os pacientes com DA têm declínio físico. Portanto, existe uma associação entre a progressão da doença e manifestações sistêmicas que se estendem além do SNC. Ademais, o declínio físico é visto em diferentes graus nos estágios iniciais da doença, antes de presença significativa de declínio funcional e comportamental (JOHNSON et al., 2006). A presença de manifestações físicas ou sistêmicas da DA precocemente na doença, ou mesmo antes do aparecimento de sintomas clinicamente reconhecíveis, sugere que o declínio físico pode não representar simplesmente um resultado secundário do processo patológico do SNC. De fato, estudos têm sugerido há muito tempo que anormalidades nos processos metabólicos e bioquímicos descritos nos cérebros AD estão também presentes em células periféricas tais como fibroblastos de pele derivados de pacientes com DA (HUYNH, VAN et al., 1989; ETCHEBERRIGARAY; IBARRETA, 2001). Os indivíduos com DA também têm disfunção mitocondrial evidente tanto no SNC como na periferia (SWERDLOW; KISH, 2002; LEUNER et al., 2012), sugerindo que os processos patológicos podem coexistir tanto nos tecidos cerebrais como não cerebrais. O fato de que a DA está associada a uma série de manifestações físicas e sistêmicas, sugere que a DA é uma doença multifatorial que afeta tanto o SNC quanto o sistema periférico (MORRIS et al., 2014).

1.5.1. Modelos animais para o estudo da doença de Alzheimer

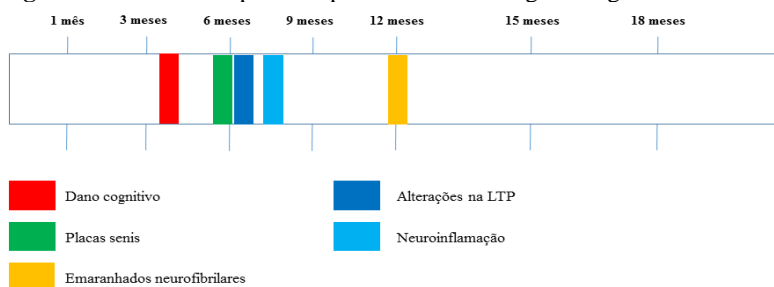
A descoberta de polimorfismos relacionados com a DA em genes que codificam tanto para a PPA quanto para as enzimas relacionadas ao seu processamento, fornece evidências para um envolvimento das placas amiloides no desenvolvimento da DA (HARDY; HIGGINS, 1992). Assim, a superexpressão de genes associados à doença humana em roedores serviu como base para a maioria dos modelos transgênicos. De fato, nas últimas duas décadas várias dezenas de modelos animais para o estudo da DA foram desenvolvidos com o objetivo de mimetizar a causa genética da DA humana por meio de geração de camundongos transgênicos que superexpressam formas mutantes da PPA, presinilina e/ou da proteína tau no encéfalo (LEE et al., 1996; ROCKENSTEIN et al., 2007). De fato, atualmente, camundongos transgênicos que superexpressam as formas mutantes da PPA são os modelos animais

mais utilizados para o estudo da DA. Muitos modelos transgênicos para a DA exibem formação de placas amiloides, perda neuronal, taupatias e comprometimentos vasculares e cognitivos, porém nenhum modelo transgênico até hoje consegue mimetizar o espectro completo das características fisiopatológicas da DA (para uma visão geral dos modelos animais atuais em pesquisa para o estudo da DA ver Van Dam and De Deyn (DAM, VAN; DEYN, DE, 2011). De fato, o declínio das funções cognitivas precede a formação da placa amiloide. Portanto, a relação entre placas amiloides e patologia DA não está estabelecida e precisa ser melhor estudada (LUCAS; RIFKIND, 2013).

1.5.2. Camundongos triplos transgênicos para a Doença de Alzheimer (3xTg-DA)

Camundongos triplos transgênicos (PPA_{Swe}, TAU_{P301L}, e PS1_{M146V}) homocigotos foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa coordenado por Frank M. LaFerla (ODDO et al., 2003). A abordagem técnica para gerar os camundongos 3xTg-DA, foi realizada através da co-microinjeção de dois genes que codificam para: (1) PPA humana (PPA_{Swe}) e (2) proteína tau (TAU_{P301L}) em embriões de camundongos knockin para a presinilina 1 (PS1_{M146V}). Estes animais exibem tanto placas senis como emaranhados neurofibrilares, além de grande deposição de peptídeos β -A em várias regiões cerebrais. Apresentam imunoreatividade positiva para peptídeos β -A intracelular já com 3 a 4 meses de idade. Depósitos extracelulares de peptídeos β -A após seis meses de idade ocorrem no córtex frontal (Fig.6).

Figura 6. Linha de tempo fenotípica dos camundongos 3xTg-DA



(Fonte: <http://www.alzforum.org>).

Enquanto que modificações na proteína tau, como a hiperfosforilação ocorrem mais tarde, por volta dos 12 a 15 meses (ODDO et al., 2003;

BILLINGS et al., 2005; STOVER et al., 2015). Apesar de ocorrer dano cognitivo e neuroinflamação relativamente cedo entre aos 6 e 9 meses, esse modelo não apresenta morte neuronal significativa (Fig.6).

1.5.3. Fatores de risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer esporádica

A(s) causa(s) da DA ainda não é (são) conhecida(s). No entanto, existe certo consenso, como mencionado acima, de que a DA esporádica se desenvolve como resultado de múltiplos fatores em vez de uma causa única (MUNOZ; FELDMAN, 2000; ARMSTRONG, 2013). Desde as primeiras descrições da doença, muitas teorias foram propostas na tentativa de relacionar as principais causas da doença, como: exacerbação do envelhecimento, disfunção mitocondrial, comprometimento da barreira hemato-encefálica, além de fatores de riscos ambientais e genéticos (ARMSTRONG, 2013). Em contraste com as causas por mutações genéticas, os fatores de riscos genéticos possuem papel importante para o desenvolvimento da DA esporádica. O primeiro a ser identificado foi o gene *APOE* no cromossomo 19, em que os portadores do alelo *APOE-ε4* apresentam um risco aumentado em oito vezes para desenvolver DA (CORDER et al., 1993; MASTERS et al., 2015). De fato, muitos outros genes parecem estar associados com o desenvolvimento da DA esporádica, de acordo com a Genome-Wide Association Studies (GWAS). Os primeiros conjuntos de loci identificados pela GWAS estão agrupados principalmente em três vias: de resposta imune, do processamento da PPA e do metabolismo lipídico e endocitose (REITZ; MAYEUX, 2014).

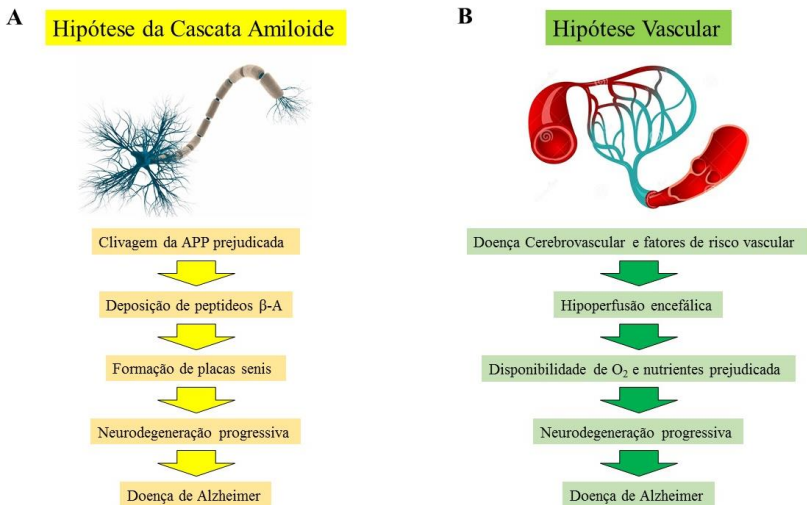
Dessa forma, o estilo de vida salutar é fundamental para a manutenção do bem estar do corpo e da mente e favorece a longevidade (AARSLAND et al., 2010; LA TORRE, DE, 2010; WEINSTEIN et al., 2012; ORSUCCI, D et al., 2013). Diversos genes associados à DA também estão implicados na aterosclerose, e essa dualidade pode explicar parcialmente a estreita relação entre a patologia vascular periférica e encefálica na DA (CARTER, 2007; ROCCHI et al., 2009). Além disso, essa associação é suportada, por estudos que mostraram anormalidades funcionais e estruturais dos vasos cerebrais de pacientes com DA (ZHU et al., 2007). Ademais, células da parede vascular e especialmente suas mitocôndrias, podem ser alvo central de danos oxidativos antes do desenvolvimento da DA, ou seja, a diminuição na perfusão vascular pode desencadear disfunção mitocondrial, que por sua vez, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZHU

et al., 2007)(BALOYANNIS, 2006). Por conseguinte, a perturbação do sistema cerebrovascular é provavelmente um contribuinte importante para a patogênese da DA.

1.5.4. Hipótese vascular para a Doença de Alzheimer

Diversas hipóteses concorrentes são propostas para explicar a fisiopatologia da DA. Por exemplo: Inicialmente foi atribuída a morte neuronal à toxicidade das placas amiloides solúveis (MEYER-LUEHMANN et al., 2008), em seguida a forma letal dos peptídeos β -A foi sugerido como a espécie intermediária, denominada oligômeros (RAUK, 2008). Estes estudos estão de acordo com a hipótese da cascata amiloide, que sustenta que a deposição e acumulação de peptídeos β -A no cérebro é o principal fator determinante da patogênese do DA. Em concordância, o processo patológico envolvendo a formação de emaranhados neurofibrilares contendo proteína tau, é sugerido iniciar com um desequilíbrio entre a produção e depuração de peptídeos β -A (SELKOE, 1991, 2002; HARDY; SELKOE, 2002). No entanto, embora esta cascata seja potencialmente viável na DA familiar, devido às mutações nos genes da PPA e de seu processamento, o seu papel na maioria dos casos esporádicos de DA ainda não está claro.

Resumidamente, a hipótese vascular postula que a DA se inicia após danos nos microvasos da circulação encefálica que podem ocorrer como o avanço da idade e com a exposição aos fatores de riscos vasculares, levando eventualmente a uma desorganização e disfunção na BHE (STONE, 2008). Consequentemente, estes eventos levam a uma diminuição no FSE (hipoperfusão), que provoca redução da biodisponibilidade de O_2 e nutrientes como a glicose para os tecidos causando uma crise neuroglial energética, que pode iniciar um processo de neurodegeneração. Nesta fase, ocorre o aparecimento de comprometimentos cognitivos leves que são o resultado desta escassez energética no SNC (LA TORRE, DE, 2004) Nesse sentido, a formação de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares seria devido à hipóxia causada pelo fluxo sanguíneo inadequado e, como resultado final da progressão da neurodegeneração é a instalação da DA (KELLEHER; SOIZA, 2013). (Fig.7).

Figura 7. Resumo das hipóteses amiloide e vascular para a DA.

(Traduzido de LA TORRE, DE, 2004).

De fato, a detecção de hipoperfusão cerebral regional através de técnicas de neuroimagem pode identificar pré-clinicamente indivíduos com risco de DA. Além disso, a hipoperfusão cerebral precede o hipometabolismo, o declínio cognitivo e a neurodegeneração na DA (LA TORRE, DE, 2002).

1.6. HIPERCOLESTEROLEMIA E A DOENÇA DE ALZHEIMER

As primeiras evidências da associação entre a hipercolesterolemia e a DA foi através de estudos realizados por Larry Sparks e colaboradores. Primeiramente, Sparks observou que em torno de 70% dos indivíduos que haviam falecido em decorrência de doença arterial coronariana também apresentavam placas amiloides em seus cérebros. Por outro lado, indivíduos com a mesma idade e que haviam falecido devido a outras causas eram bem menos susceptíveis a desenvolverem placas amiloides cerebrais (SPARKS et al., 1990). Posteriormente, os autores mostraram que coelhos alimentados por, pelo menos, quatro semanas com uma dieta rica em colesterol desenvolviam placas amiloides cerebrais e outros sinais patológicos relacionados à DA. Esses dados em conjunto com outro estudo (SPARKS et al., 1994), levaram Sparks a

propor uma conexão entre os níveis altos de colesterol plasmático, fator de risco vascular, e a predisposição a desenvolver DA.

Nesse sentido, estudos clínicos e epidemiológicos vêm indicando que indivíduos hipercolesterolêmicos são mais susceptíveis a desenvolver a DA (KIVIPELTO et al., 2001, 2005). Kivipelto e colaboradores primeiramente estudaram a relação entre dois principais fatores de risco vasculares, a hipertensão e a hipercolesterolemia em pessoas de meia-idade (cerca de 50 anos de idade). Após 21 anos de acompanhamento, eles observaram que pacientes com ambos os fatores de risco tiveram um risco significativamente maior de desenvolver DA na velhice do que aqueles com qualquer um dos fatores de risco isolados (KIVIPELTO et al., 2001). Posteriormente, utilizando a mesma base de dados, eles avaliaram a relação entre o índice de massa corporal e fatores de risco vascular com o desenvolvimento de demência e DA. A associação foi alterada com a adição de fatores, tais como a hipertensão, hipercolesterolemia e tabagismo, além de aqueles pacientes com histórico de distúrbios vasculares. A associação entre a obesidade, hipercolesterolemia e hipertensão na meia-idade foram os fatores que mais favoreceram o desenvolvimento de DA no envelhecimento (acima de 70 anos de idade) (KIVIPELTO et al., 2005). Em 2010, esse mesmo grupo de pesquisa observou que a concentração de ApoE e 24-OH no líquido cérebro espinal de pacientes com disfunção cognitiva moderada estavam significativamente maiores que os controles (SHAFATI et al., 2007), indicativos que para manter a homeostase, o excesso de colesterol é convertido em 24-OH ou é transferido para a HDL-c através dos transportadores ABCA1 e ABCG1 localizados em membranas celulares neuronais e eliminados no líquido cérebro espinal (LEONI et al., 2010).

Uma abordagem bastante utilizada ultimamente em roedores para induzir hipercolesterolemia sem alterações genéticas é a utilização de dietas enriquecidas com lipídeos e/ou colesterol. Assim, podemos estudar diretamente o efeito de um fator de risco ambiental (colesterol dietético) no comprometimento vascular e cognitivo (BOAK; CHINDUSTING, 2004; GRANHOLM et al., 2008; STAPLETON et al., 2010; ULLRICH et al., 2010; HAN et al., 2015) De fato, diversos estudos associam uma dieta enriquecida de colesterol (DC) com comprometimento de memória, como observado por Granholm e colaboradores, que demonstraram que oito semanas de DC (2%) aumentou significativamente os níveis plasmáticos de colesterol e causou prejuízo na memória de trabalho em ratos (Fischer 344) de 16 meses de idade, todavia não observaram alterações na distribuição da

laminina, um marcador de microvasos cerebrais (GRANHOLM et al., 2008). Essa mesma abordagem (DC (2%) por oito semanas) foi utilizada⁻ no estudo de Thirumangalakudi e colaboradores em camundongos C57BL6 do tipo selvagem e em camundongos LDLr^{-/-} (THIRUMANGALAKUDI et al., 2008). Os pesquisadores observaram que os camundongos do tipo selvagem que receberam a DC exibiram prejuízo de memória, acompanhado por neuroinflamação, alterações no processamento da PPA e hipercolesterolemia.

Em especial, Refolo e colaboradores demonstraram que camundongos mutantes PS/PPA (PS1_{M146V} /PPA_{K670N,M671L}, modelo duplo transgênicos para a DA) quando alimentados com dieta com 5% de colesterol por sete semanas desenvolvem um aumento significativo no acúmulo de peptídeo β -A no córtex e hipocampo, que foi associado aos níveis altos de colesterol plasmático (REFOLO et al., 2000). Posteriormente, os mesmos pesquisadores demonstraram que o tratamento destes animais com um fármaco hipolipemiante, foi capaz de reduzir os níveis de peptídeo β -A cerebral, bem como a formação de placas amiloides nesse mesmo modelo (REFOLO et al., 2001).

Nesta linha de evidências, estudos do nosso grupo de pesquisa vêm corroborando esses autores, e demonstram que camundongos hipercolesterolêmicos (LDLr^{-/-}) apresentam prejuízo de memória espacial, e quando estes camundongos foram submetidos a uma dieta rica em colesterol (1,25%), apresentam disfunção mitocondrial e estresse oxidativo no córtex pré frontal (OLIVEIRA, DE et al., 2011). Além disso, os camundongos hipercolesterolêmicos mostraram-se mais susceptíveis ao dano neurotóxico induzido pelo peptídeo β -A, que foi acompanhado por um aumento na permeabilidade da BHE e neuroinflamação (OLIVEIRA, DE et al., 2014). E de fundamental importância para o nosso estudo, foi observado que camundongos Swiss quando alimentados por oito semanas com uma dieta rica em colesterol (1,25% e 20% gordura saturada) apresentaram um prejuízo de memória espacial de curta duração, associado com aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex pré-frontal e hipocampo (MOREIRA et al., 2014). Todavia, o envolvimento do colesterol proveniente da dieta com o comprometimento cognitivo e a sua associação com uma disfunção vascular tem sido pouco compreendido.

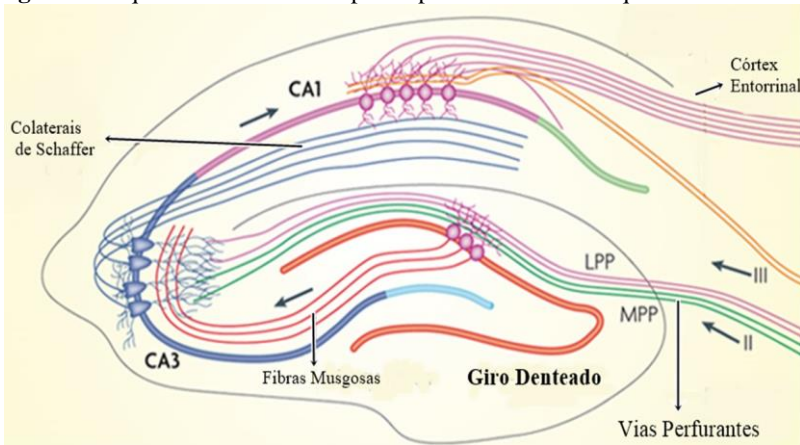
1.7. FORMAÇÃO HIPOCAMPAL E O ACOPLAMENTO NEUROVASCULAR

1.7.1. Hipocampo e a Potenciação de Longa Duração

A formação hipocampal ou (região hipocampal) é um grupo de áreas cerebrais que consiste no giro dentado, hipocampo, subculium, parasubculium e córtex entorrinal (SQUIRE et al., 2004; CARD, 2007). Na hierarquia do processamento da informação no lobo temporal medial, o hipocampo é o destino final das projeções a partir do córtex perirrinal, córtex parahipocampal e córtex entorrinal. Dessa forma, o hipocampo recebe e combina as múltiplas fontes de vias de entrada e está envolvido na formação e consolidação de novas memórias, formação do mapa cognitivo espacial, além de executar os padrões de separação e completar informações de entrada (CARD, 2007; WIXTED; SQUIRE, 2011; FALLIS, 2013; ROLLS, 2015). Além disso, a neurogênese na zona subgranular do hipocampo, responsável por gerar novos neurônios ao longo da vida adulta, está intimamente associada com um processo de ativação, recrutamento e remodelação vascular, sugerindo uma estreita relação entre a angiogênese e neurogênese (PALMER et al., 2000).

A principal via eferente do hipocampo se dá pelos neurônios da região CA1, que se projeta de volta ao córtex entorrinal. A informação do córtex entorrinal alcança os neurônios em CA1 por meio de duas vias excitatórias, uma via direta e uma indireta, que juntas são chamadas de vias perfurantes. Os axônios da via direta têm origem nos neurônios da camada III do córtex entorrinal e estabelecem sinapses nos dendritos apicais mais distais dos neurônios de CA1. Na via indireta, os axônios originam da camada II do córtex entorrinal e alcançam os neurônios de CA1 pela via trissináptica. No primeiro segmento da via, os axônios da camada II projetam-se pela via perfurante até as células granulares do giro dentado. Os axônios das células granulares projetam-se através da via das fibras musgosas até os neurônios piramidais em CA3 do hipocampo. Finalmente, axônios de CA3 projetam-se pela via das colaterais de *Schaffer* e estabelecem sinapses excitatórias nas regiões proximais dos dendritos dos neurônios piramidais de CA1 (CARD, 2007) (Fig.8).

Figura 8. Esquema de uma fatia hipocampal e seu circuito arquitetural.



(Traduzido de DENG et al., 2010).

Um estudo em 1973 observou que a via perforante da camada II do córtex entorrinal para os neurônios granulares do giro denteado, são notavelmente sensível a estímulos elétricos de alta frequência, que produz uma potenciação de longa duração (LTP, do inglês long term potentiation), ou seja, produziu um aumento de longa duração na amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPSs) nos neurônios do giro denteado (BLISS; GARDNER-MEDWIN, 1973). A LTP pode durar por dias ou mesmo semanas e essa abordagem é bastante utilizada em fatias de hipocampo e em culturas de células neuronais (RESNICK, 2002). Essa capacidade de modificação das sinapses é conhecida como plasticidade sináptica (COOKE; BLISS, 2006), e alterações na eficácia das conexões neurais formam a base da memória e do aprendizado (MAREN; BAUDRY, 1995). Embora a LTP tenha sido primeiramente demonstrada em sinapses da via perforante em neurônios do giro denteado, a maior parte dos estudos, hoje, são realizados nas sinapses hipocâmpais que ocorrem entre a via colateral de *Schaffer* e os neurônios piramidais de CA1 em preparações de finas fatias de hipocampo (RESNICK, 2002).

1.7.2. Modelo de estudo em fatias hipocâmpais

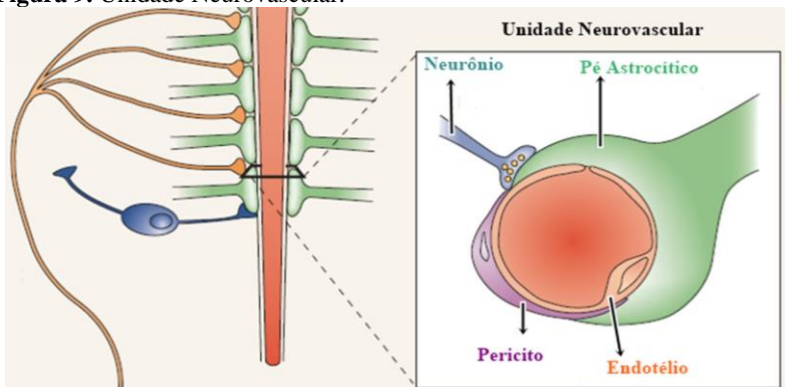
A maioria das pesquisas que objetivam estudar o fenômeno da LTP o faz através da análise eletrofisiológica da sinapse em fatias finas de tecidos neurais. As primeiras preparações descritas foram nos anos 50,

com o objetivo de estudar a fisiologia do SNC (TEYLER, 1980). Fatias cerebrais possuindo em média de 70 a 400 μm de espessura são preparadas através da rápida remoção cerebral e sua imersão em solução salina, sendo que a fatia é feita por cortes em um micrótomo. Em seguida, a fatia pode ser colocada em uma câmera de registro onde irá circular uma solução salina oxigenada (SCHULTZ, 2001). A técnica de estudo em fatias cerebrais é particularmente útil para a análise da atividade eletrofisiológica hipocampal devido à manutenção do circuito neuronal intrínseco ao tecido, que permanece intacto na fatia transversa (LARRY R. SQUIRE, 2013).

1.7.3. Acoplamento neurovascular

Quando neurônios em específicas regiões, como no hipocampo, são altamente ativados o fluxo sanguíneo encefálico aumenta de forma coordenada temporalmente e espacialmente para fornecer adequado suprimento de O_2 e nutrientes (ZONTA et al., 2003). A hiperemia fisiológica reflete a dilatação de arteríolas e capilares de uma região encefálica restrita em resposta a um aumento de atividade neuronal local, portanto, é fundamental para que o encéfalo mantenha sua integridade funcional e estrutural (CARMIGNOTO; GÓMEZ-GONZALO, 2010). Um grande corpo de evidências indica que neurônios, células gliais, pericitos e vasos sanguíneos encefálicos, constituem uma unidade funcional conhecida como “unidade neurovascular”, e a sua integridade possui papel crucial nos processos de hiperemia fisiológica (MUOIO et al., 2014) (Fig.9).

Figura 9. Unidade Neurovascular.



(Traduzido de KELLEHER; SOIZA, 2013).

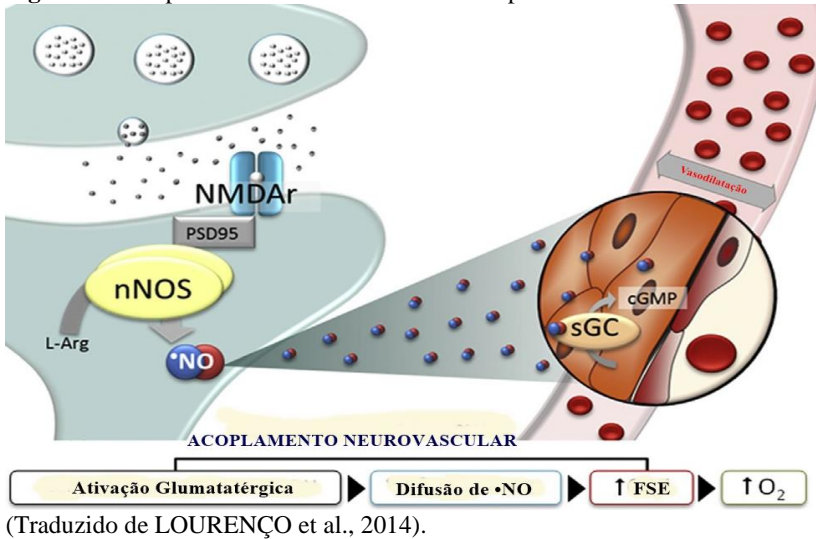
Alterações nestas interações celulares prejudicam a capacidade do SNC em fornecer fluxo suficiente para regiões ativas que pode resultar em condições neurodegenerativas (LECRUX; HAMEL, 2011). Além disso, alterações na permeabilidade da BHE, que poderia diminuir o FSE e conseqüentemente reduzir a quantidade de O_2 e nutrientes, são observadas em modelos animais de hipercolesterolemia induzidos por dieta e por manipulações genéticas. Chen e colaboradores mostraram que coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol apresentaram um aumento na permeabilidade da BHE, avaliado pelo aumento no extravasamento de IgG e fibrinogênio, e pela diminuição na quantidade de ocludina e zona oclusiva-1, duas proteínas importantes para integridade da BHE (CHEN et al., 2008). Dessa forma, estudos com dietas enriquecidas com colesterol mostram uma associação com alterações na homeostase do colesterol no SNC, aumentando seu influxo através de endocitose, que pode acumular em neurônios e aumentar o conteúdo cerebral de colesterol (GHRIBI et al., 2006; SPARKS, 2008; CHEN et al., 2010). De fato, encéfalos post-mortem de pacientes com DA, apresentaram níveis altos de LDL-c e ApoB100 comparados aos controles, e foram correlacionado positivamente com os níveis altos de colesterol plasmático (KUO et al., 1998). A ApoB100, principal apolipoproteína encontrada na LDL-c, foi mostrada estar envolvida com prejuízos cognitivos semelhantes aqueles encontrados em modelos de DA. Animais que superexpressam a ApoB100 apresentaram declínio na memória, lesões microvasculares encefálicas (SÜLE et al., 2009) e alterações no processamento da proteína percussora amiloide. Essas características fisiopatológicas foram associadas a uma acumulação de ApoB100 nos microvasos encefálicos (LÖFFLER et al., 2013).

Portanto, a interrupção da regulação do FSE impossibilita o SNC de usar mecanismos de controle vitais que garantem as quantidades adequadas de O_2 e nutrientes aos microambientes nos quais as células neurais funcionam. Uma desregulação cerebrovascular ocorre após um acidente vascular encefálico (PANTANO et al., 2008; KUHLENCORDT et al., 2009), e está estreitamente associada a fatores de risco para doenças cerebrovascular, como hipercolesterolemia e obesidade (Fig.3). Estas alterações prejudicam a capacidade do SNC em manter o FSE quando o fornecimento de sangue está comprometido, intensificando a isquemia e a lesão resultante (IADECOLA, 2004). De fundamental relevância para o nosso estudo, autores mostram que na DA existe uma disfunção cerebrovascular, todavia a importância patogênica dessa desregulação para a evolução da doença tem sido difícil de definir (LA TORRE, DE, 2004; ALTMAN; RUTLEDGE,

2010a). Portanto, para a manutenção da integridade funcional do SNC é crucial que o acoplamento neurovascular esteja intacto (IADECOLA, 2004). Nesse sentido, o trabalho desta tese está suportado na hipótese neurovascular para o desenvolvimento da DA, como proposto por Berislav V. Zlokovic (ZLOKOVIC, 2005). Os autores propõem que uma falha na depuração dos peptídeos β -A através da BHE, angiogênese aberrante e senescência do sistema cerebrovascular poderiam causar um desacoplamento neurovascular, hipoperfusão encefálica e inflamação neurovascular. Estes comprometimentos vasculares causaria um severo comprometimento da BHE, que resultaria em um desequilíbrio químico no ambiente neural, levando a perda de função sináptica e neuronal (ZLOKOVIC, 2005). Recentemente, foi demonstrado que certos medicamentos podem restabelecer a função vascular do endotélio, bem como a biodisponibilidade de NO resultando na normalização do FSE. Esses benefícios cerebrovasculares favoreceriam a perfusão cerebral, o que pode ajudar a manter a função neuronal e, possivelmente, atrasar a falha cognitiva. Os resultados com as terapias cardiovasculares sugerem que as drogas originalmente concebidas para tratar doenças cardiovasculares que simultaneamente restabelecem a função cerebrovascular e cognitiva o fazem através dos seus efeitos pleiotrópicos (HAMEL et al., 2016).

O acoplamento neurovascular ocorre dentro de alguns segundos do início da atividade neuronal intensa, e garante aos neurônios ativos que executem suas atividades perfeitamente (DEVONSHIRE et al., 2012). Nesse sentido, estudos sugerem que o NO produzido durante o aumento da atividade neuronal (Fig.10) pode atingir os vasos sanguíneos por difusão e induzir vasodilatação local favorecendo a biodisponibilidade de O_2 e nutrientes (IADECOLA, 1993; MENG et al., 1995; PELLIGRINO et al., 1996).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa associado em Portugal, demonstrou que camundongos 3xTg-DA apresentam uma combinação de alterações na função sináptica e metabólica no hipocampo em função da idade. O grupo 3xTg-DA jovens apresentaram um aumento na biodisponibilidade de NO enquanto que o grupo envelhecido apresentou níveis mais baixos de NO que o grupo controle de mesma idade (DIAS et al., 2016). Estes dados sugerem que a perturbação na biodisponibilidade do NO pode ser o elo que associa a doença cerebrovascular como desenvolvimento de DA.

Figura 10. Acoplamento neurovascular mediado pelo $\cdot\text{NO}$.

1.8. BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO E A LTP NO HIPOCAMPO

Durante a fase de indução da LTP, o glutamato liberado dos terminais pré-sinápticos das fibras colaterais de *Schaffer* ativa os receptores de glutamato do tipo AMPA (do inglês α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate) e NMDA (do inglês *N*-methyl-D-aspartate) na membrana pós-sináptica dos neurônios piramidais de CA1. No entanto, diferentemente das fibras musgosas, a LTP na via colateral de *Schaffer* requer a ativação de receptores NMDA no neurônio pós-sináptico, que dispara uma complexa cascata de sinalização, que é ativada com o aumento de influxo de íons cálcio para a célula. O aumento intracelular de cálcio ativa uma série de enzimas como a proteína cinase C, o complexo cálcio-calmodulina-II (CaMKII), e a tirosina cinase, como as mais importantes (O'DELL et al., 1991). Quando essas cinases são inibidas, ocorre bloqueio total da indução da LTP. Portanto, a ativação das cinases resulta em regulação positiva, através da fosforilação dos receptores do tipo AMPA pós-sinápticos, o que determina mudança em suas propriedades, que os tornam mais sensíveis ao glutamato (MALENKA et al., 1989; LIU et al., 2004).

Além disso, diversos eventos podem ocorrer para manter os níveis de glutamato elevado na fenda sináptica, e consequentemente manter os

receptores permeáveis aos íons. Dentre os eventos destacamos a liberação de NO por meio de sua síntese pela enzima NO sintase neuronal. Esta isoforma da enzima está associada à CaMKII , e os níveis fisiológicos de NO aumentará com o aumento da concentração intracelular de cálcio. Devido sua característica hidrofóbica, o NO pode atravessar facilmente as membranas celulares e atingir os neurônios pré-sinápticos favorecendo a liberação de glutamato, isto é, atuando como mensageiro retrógrado (O'DELL et al., 1991; SCHUMAN; MADISON, 1991) NO é uma molécula radicalar que atua de forma ubíqua regulando funções fisiológicas no SNC, no sistema vascular e também no sistema imunitário. O NO é sintetizado enzimaticamente a partir da L-arginina pelas NO sintases (NOS), que são classificadas de acordo com o tecido que a expressão é predominante – NO sintase neuronal (nNOS), NO sintase endotelial (eNOS) e a forma induzível (iNOS) (ALDERTON et al., 2001). Curiosamente, todos estes sistemas de alguma forma sofrem desregulação e/ou estão implicados nos mecanismos de patogenicidade de doenças relacionadas ao SNC, principalmente as neurodegenerativas, e doenças cardiovasculares (PACHER et al., 2007; WILCOCK et al., 2008; LIMÓN et al., 2009). Trabalhos anteriormente realizados pelos pesquisadores do grupo coordenado pelo Dr. João Laranjinha revelaram que, no hipocampo o NO produzido por ativação neuronal (LEDO et al., 2004, 2005) (Fig.11), pode difundir-se pelo tecido a uma distância suficiente para alcançar os vasos sanguíneos que conseqüentemente aumentar o fluxo de nutrientes e O_2 necessário para a atividade neuronal, sendo uma molécula chave no acoplamento neurovascular (LOURENÇO et al., 2014). Além disso, o NO é vital para a mitocôndria para o controle delicado de sua respiração, regulação de funções vitais, ativação do ciclo celular e apoptose (ANTUNES et al., 2004).

Figura 11. Esquema da determinação biodisponibilidade do óxido nítrico em fatias hipocâmpais.



(adaptado de LEDO et al., 2005).

1.9. DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E A DOENÇA DE ALZHEIMER

A mitocôndria é a organela celular responsável pela maior produção líquida de energia. Eugene Kennedy e Albert Lehninger descreveram a mais de 50 anos que a mitocôndria contém proteínas envolvidas na oxidação de nutrientes, bem como na respiração celular com concomitante geração de energia (BOYLE, 2005). Estudos têm demonstrado que mitocôndrias envelhecidas são morfológica e funcionalmente alteradas, possuem menor capacidade de produzir energia (ATP) e maior produção de EROs (YAN et al., 1997; MCCARROLL et al., 2004). Além disso, o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês deoxyribonucleic acid) mitocondrial é muito mais vulnerável a oxidações e mutações durante o envelhecimento comparado ao DNA nuclear (RICHTER et al., 1988). Ou seja, as mitocôndrias por si só são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo, e a sua disfunção está associada ao desenvolvimento de doenças vasculares e neurodegenerativas, como a DA (LEUNER et al., 2007; REDDY; BEAL, 2008; LISA, DI et al., 2009; ORSUCCI, DANIELE et al., 2013)

Nesta linha de evidência, Caspersen e colaboradores (2005) demonstraram que mitocôndrias cerebrais isoladas de camundongos transgênicos para PPA tinham uma menor taxa de consumo de O₂ basal, bem como redução na atividade dos complexos III e IV comparados aos não transgênicos. Essa disfunção mitocondrial foi acompanhada de depósitos de peptídeos β-A nas mitocôndrias de neurônios corticais dos animais transgênicos (CASPERSEN, 2005). Além disso, foi observado em plaquetas de pacientes com DA uma diminuição na atividade dos complexos III e IV (VALLA et al., 2006). Experimentos *in vitro* com células de neuroblastoma humanos SH-SY5Y após 48hs de tratamento com peptídeos β-A demonstraram diminuição no consumo de O₂ basal, no consumo máximo de O₂ e na capacidade de reserva mitocondrial que foram associados a uma diminuição na expressão de genes mitocondriais (GRAY et al., 2015). Muitas células trabalham em um nível basal de consumo de O₂ e produção de ATP, utilizando somente uma parte da sua capacidade bioenergética total. Perante certas condições, um tecido pode exigir uma súbita explosão de energia celular adicional em resposta ao estresse ou aumento na carga de trabalho. Assim, o termo capacidade de reserva mitocondrial denomina a diferença entre o consumo máximo de O₂ e o consumo basal de O₂ (DESLER et al., 2012). Portanto, se a capacidade de reserva da mitocôndria não for suficiente para promover a produção do ATP requerido, a célula pode ser dirigida para a morte celular ou senescência. O esgotamento da capacidade de reserva mitocondrial está relacionado a diversas patologias, incluindo a DA (YADAVA; NICHOLLS, 2007; NICHOLLS, 2008).

Estudos têm apontado para os níveis altos de colesterol plasmático com indutor de estresse oxidativo e a mitocôndria desempenha papel fundamental neste contexto (WARNHOLTZ et al., 1999; MADAMANCHI; RUNGE, 2007; PAIM et al., 2008). Além disso, foi observado que mitocôndrias isoladas de encéfalo de camundongos duplos transgênicos (PPA/PS1) de 10 meses de idade apresentaram níveis de colesterol nas membranas mitocondriais maiores que os não transgênicos (FERNANDEZ et al., 2009). Em conjunto esses estudos mostram que um aumento dos níveis de colesterol celular está associado com uma disfunção mitocondrial, fato que favorece o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa já demonstrou disfunção mitocondrial em mitocôndrias de córtex de camundongos hipercolesterolêmicos. Especificamente, Oliveira e colaboradores demonstrou que camundongos LDLr^{-/-} quando alimentados com uma dieta rica em colesterol, exibem uma menor

atividade enzimática do complexo I (NADH desidrogenase) e do complexo II (Succinato desidrogenase) em mitocôndrias cerebrais, que foi acompanhado com uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e de glutathione (OLIVEIRA, DE et al., 2011).

Portanto, as evidências acumuladas ao longo dos últimos anos postulam uma associação importante entre alterações na homeostase do colesterol, em particular as alterações induzidas por dieta alimentar em indivíduos que comem em excesso, e a fisiopatologia da doença de Alzheimer de origem esporádica através de uma disfunção sináptica e neurovascular.

2. JUSTIFICATIVA

A segunda conferência internacional sobre nutrição realizada em 2014, organizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela entidade Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (<http://www.fao.org/3/a-ml542e.pdf>), observou que desde a primeira conferência, realiza em 1992, ocorreu uma mudança significativa na nutrição global. Enquanto o número total de pessoas desnutridas tenha permanecido igual, ocorreu uma queda percentual em relação a população mundial. Já o número de pessoas com sobrepeso em todo o mundo saltou de valores baixíssimos para mais de 1 bilhão de pessoas. Ou seja, alimentos de fácil acesso, porém de baixa qualidade nutricional, estão mais disponíveis consequentemente sendo mais consumidos, assim favorecendo uma epidemia mundial de obesidade.

Por outro lado, outro grande desafio da sociedade moderna é o rápido aumento da população idosa, e consequentemente aumento nos casos de doenças relacionadas ao envelhecimento, dentre elas a doença de Alzheimer. A doença de Alzheimer é a causa mais comum de prejuízos cognitivos em pessoas com mais de 65 anos de idade. Na doença de Alzheimer esporádica, nem os fatores genéticos nem os ambientais separadamente provocam a doença, e sim uma associação entre eles é necessário. Portanto, a hipótese neurovascular para a DA vem ganhando força, uma vez que muitos fatores de risco vascular e fatores de risco relacionados às doenças neurodegenerativas são fatores comuns.

Neste contexto, a hipótese de estudo é que uma dieta rica em colesterol (e consequente aumento nos níveis de colesterol plasmático) seja capaz de potencializar os danos cognitivos e alterações sinápticas/neurovasculares observadas na DA familiar. Para testar esta hipótese experimentalmente, camundongos triplos transgênicos para a doença de Alzheimer (3xTg-DA) e os respectivos controles, foram expostos a uma dieta rica em colesterol por 8 semanas, e prejuízos cognitivos, sinápticos e neurovasculares foram avaliados.

Conjuntamente, os resultados deste estudo irão contribuir para o entendimento da relação entre hipercolesterolemia, tanto como fator genético e/ou ambiental, e o comprometimento neurovascular que resultariam em prejuízos cognitivos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi investigar a relação entre hipercolesterolemia e a disfunção cognitiva/neurovascular em camundongos NTg e 3xTg-DA, alimentados com uma dieta enriquecida com colesterol.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar o efeito da hipercolesterolemia, induzida por uma abordagem dietética, na disfunção cognitiva em camundongos NTg e em um modelo de doença de Alzheimer (3xTg-DA).
- Verificar o efeito da hipercolesterolemia na disfunção sináptica em camundongos NTg e em camundongos 3xTg-DA através da indução de LTP.
- Verificar o efeito da hipercolesterolemia na modulação da biodisponibilidade de NO e alterações na função mitocondrial em fatias de hipocampo de camundongos NTg e 3xTg-DA.
- Avaliar a alteração na permeabilidade da BHE induzida pela hipercolesterolemia em camundongos NTg e 3xTg-DA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

NMDA e 3-bromo-7-nitroindazol (3-Br-7-NI) foram obtidos da empresa Tocris Cookson (Avonmouth, UK). o-Fenilenodiamina e ascorbato foram obtidos da Fluka. A glutationa e o ácido dietilenotriaminopentacético da Sigma (St. Louis, EUA). Nafion foi da empresa Aldrich. Todos os outros reagentes foram de grau analítico. O tampão utilizado para os testes de microelétrodos e calibração foi tampão fosfato salina (PBS, do inglês Phosphate Buffer Saline) com a seguinte composição (em mM): 124 de NaCl, 2,7 de KCl, 8,1 de NaHPO₄, 1,8 de KH₂PO₄ e 0,1 de ácido dietilenotriaminopentacético, pH 7,4. O meio utilizado para as experiências de fatia de hipocampo foi o líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF, do inglês artificial cerebrospinal fluid) composto de (em mM): 124 de NaCl, 2 de KCl, 25 de NaHCO₃, 1,25 de KH₂PO₄, 1,5 de CaCl₂ e 10 de D-glicose. A composição deste aCSF modificado foi (em mM): 124 de NaCl, 2 de KCl, 25 de NaHCO₃, 1,25 de KH₂PO₄, 0,5 de CaCl₂, 10 de MgSO₄, 0,2 de ascorbato, 1 de glutationa e 10 de D-glicose. O aCSF foi oxigenado com uma mistura gasosa de 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂).

4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos experimentais envolvidos neste estudo foram delineados de tal maneira a minimizar ao máximo o sofrimento dos animais. Além disso, foi utilizado tamanho amostral mínimo e adequado para as análises estatísticas possibilitando a obtenção do máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos, de acordo com Diretivas do Conselho da Comunidade Europeia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (86/609 / ECC) e aprovados pelo Comitê de Cuidados com Animais do Centro de Neurociência e Biologia Celular de Coimbra (Portugal).

4.3. ANIMAIS

Nesse estudo foram utilizados camundongos triplos transgênicos 3xTg-DA (PPA_{Swe}, MAPT_{P301L}, e PSEN1_{M146V}) homocigotos, como modelo para a doença de Alzheimer e camundongos controle C57BL/6x129SV obtidos do laboratório coordenado por Frank M.

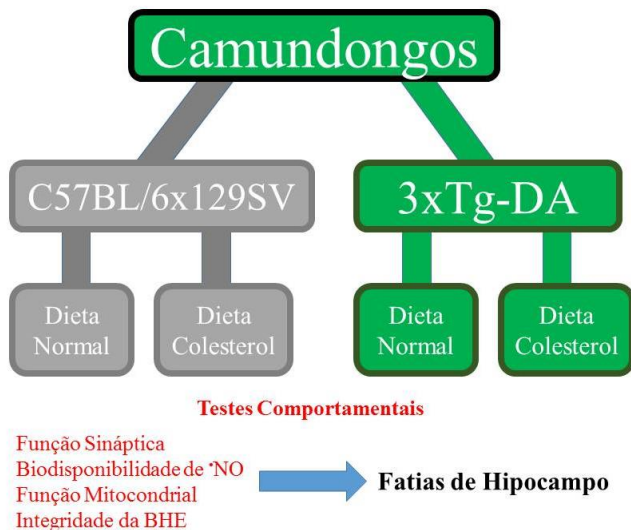
LaFerla e Salvatore Oddo (Universidade da Califórnia, Irvine, EUA) (ODDO et al., 2003) e alojados no biotério setorial do Centro de Neurociência e Biologia Celular da Universidade de Coimbra. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas em grupos de cinco animais por caixa (42 x 34 x 17 cm), mantidos em temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e dieta comercial padrão (Nuvilab CD-1, Nuvital Nutrientes S/A, Paraná, Brasil).

4.4. DESENHO EXPERIMENTAL

4.4.1. A hipercolesterolemia induzida por modificação dietética causa prejuízos cognitivos, disfunção sináptica e neurovascular similar a doença de Alzheimer?

O objetivo deste desenho experimental foi avaliar o efeito da hipercolesterolemia induzida por uma modificação dietética (dieta enriquecida com colesterol) em um modelo animal de doença de Alzheimer. Assim, camundongos C57BL/6x129SV selvagens e 3xTg-DA machos e fêmeas, de 3 meses de idade, receberam durante 8 semanas uma dieta enriquecida com colesterol (1,25% e 20% gordura saturada) e dieta normal, totalizando 4 grupos experimentais (Fig.12).

Figura 12. Resumo esquemático do protocolo experimental.



A dieta enriquecida com colesterol (DC) consistia de uma dieta padrão com o acréscimo de 1,25% de colesterol, 20% de gordura e 0,5% de ácido cólico, adquirida da Research Diets, Inc (Nova Jersey, EUA), e a Tabela 1 apresenta a composição da DC e a dieta normal (DN). Aqui nessa tese, estamos considerando uma dieta ‘rica’ em colesterol o mesmo que uma dieta enriquecida com colesterol. Após o período do protocolo experimental, os animais foram privados de alimento durante uma noite e o sangue foi coletado a partir do plexo ocular para determinação do colesterol plasmático. Após, os animais foram eutanasiados, e o tecido hipocampal foi removido para os experimentos eletrofisiológicos e neuroquímicos.

Tabela 1. Composição das dietas.

Ingredientes (% em gramas)	Dieta Normal	Dieta Colesterol
Proteínas	20.3	20.0
Gordura Saturada	4.0	19.7
Carboidratos	67.0	48.5
kcal/g	3.84	4.51
Caseína	200	200
L-cistina	3	3
Corn Starch	150	270
Maltodextrina 10	0	113
Sacarose	500	100
Celulose	50	50
Óleo de milho	50	0
Óleo de soja	0	200
Mix Mineral S10026B	35	50
Mix Vitamina V10001	10	10
Bitartrato de colina	2	2
Ácido cólico	0	5
Colesterol	0	12.5
Total (g)	1000	1003

4.5. NÍVEIS DE COLESTEROL PLASMÁTICO

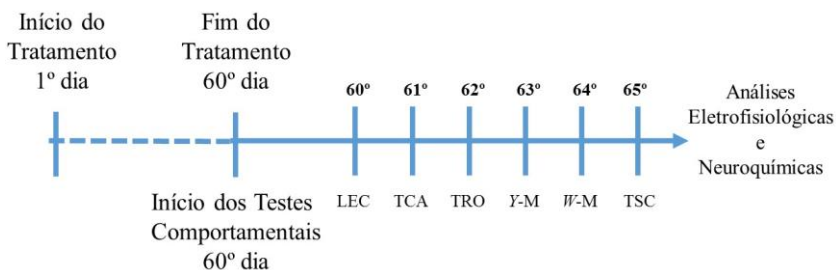
O sangue foi coletado do plexo ocular após uma privação de alimentos durante a noite e antes da eutanásia. Os níveis plasmáticos de colesterol foram medidos em plasma utilizando kit enzimático

comercial, de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais, Brasil).

4.6. TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes foram realizados entre 10:00hs e 17:00hs em uma sala som-atenuada sob luz de baixa intensidade (12 lx). O primeiro dia de teste comportamentais foi realizado exatamente no dia que completou 8 semanas de tratamento, ou seja, no 60º dia. A partir do 60º dia os seguintes testes foram efetuados na sequência ilustrada na figura 13.

Figura 13. Resumo esquemático da sequência dos testes comportamentais referentes ao desenho experimental. Labirinto elevado em forma de cruz (LEC), teste do campo aberto (TCA), teste de reconhecimento de objeto novo (TRO), labirinto em forma de Y-modificado (Y-M, do inglês Y-maze), labirinto aquático (W-M, do inglês Water-maze) e teste de suspensão pela cauda (TSC).



Foi permitido aos camundongos um período de habituação de 1h na sala antes do início dos testes. O comportamento foi monitorado através de uma câmara de vídeo posicionada acima dos aparelhos e os vídeos foram posteriormente analisados com o sistema de rastreamento de vídeo ANY Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). Os aparatos foram limpos com etanol 10% entre os animais para evitar sinais de odor.

4.6.1. Labirinto elevado em forma de cruz

O teste do labirinto elevado em forma de cruz (LEC) foi utilizado com base na sua capacidade previamente documentada em detectar efeitos de medicamentos tanto ansiolíticos como ansiogênicos em camundongos (LISTER, 1987). Resumidamente, o aparato consiste em quatro braços com 18 cm de comprimento e 6 cm de largura feitos de madeira coberta com fórmica impermeável e posicionados a 60 cm acima do chão. Dois braços opostos estavam rodeados por paredes (6

cm de altura, braços fechados), enquanto os outros dois estavam desprovidos de paredes fechadas (braços abertos). Os quatro braços foram conectados por uma plataforma central (6x6 cm). Cada camundongo foi colocado no centro do labirinto de frente para um braço fechado e o seu comportamento foi monitorizado durante 5 minutos. Sempre que um animal colocava as quatro patas em um braço, uma entrada foi marcada. A porcentagem de tempo e de entradas dos animais no braço aberto foi quantificada.

4.6.2. Teste do campo aberto

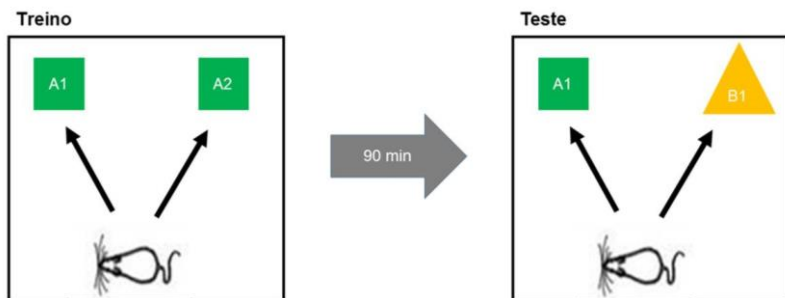
O teste no campo aberto (TCA) foi utilizado para avaliar a atividade locomotora por meio da distância total percorrida e em intervalos de 2 minutos. Nesse teste também avaliamos o comportamento exploratório dos animais por meio do número de levantamentos verticais (rearings, do inglês). Além disso, também foi utilizado como um processo de habituação para o teste de reconhecimento de objetos, realizado no mesmo aparato. Os animais foram colocados no centro da arena quadrada do aparato (50x50x40 cm) feito de PVC cinzento durante 10 min de sessão. A distância percorrida (m) foi gravada em intervalos de 2 minutos.

4.6.3. Teste de reconhecimento de objeto novo

O teste de reconhecimento de objeto novo (TRO) foi realizado com o objetivo de avaliar a memória de reconhecimento dos camundongos (LEGER et al., 2013). O hipocampo, estrutura responsável em formar padrões de objetos (ROLLS, 2015), possui importante papel na memória de reconhecimento (AGGLETON et al., 1999; NORMAN, 2010). O teste foi realizado 24 h após a sessão no campo aberto (segundo dia), conforme descrito acima. A tarefa consistiu em duas sessões de 5 min (treino e teste) separadas por um intervalo de 90 min, protocolo utilizado para avaliação de memória de curto prazo (90 min). Na sessão de treino, dois objetos idênticos foram colocados perto dos dois cantos opostos da arena. Durante a sessão de teste, um familiar (a partir da sessão de treinamento) e um novo objeto foram colocados novamente nos 2 cantos opostos da arena. Em ambas as sessões, os animais foram colocados individualmente no campo aberto de frente para o centro da parede oposta e permitiu explorar os objetos durante 5 min. Exploração de cada objeto foi definido por direcionar o nariz para o objeto a uma distância inferior a 1 cm e/ou tocar o objeto com o nariz ou com as patas

dianteiras. A utilização do objeto pelo animal para levantamento vertical não foi considerado um comportamento exploratório. A razão de discriminação foi definida como: $TN / (TN + TF)$, [TN = tempo gasto explorando o novo objeto; TF = tempo gasto explorando objeto familiar] (Fig.14).

Figura 14. Resumo esquemático do teste de reconhecimento de objeto novo.

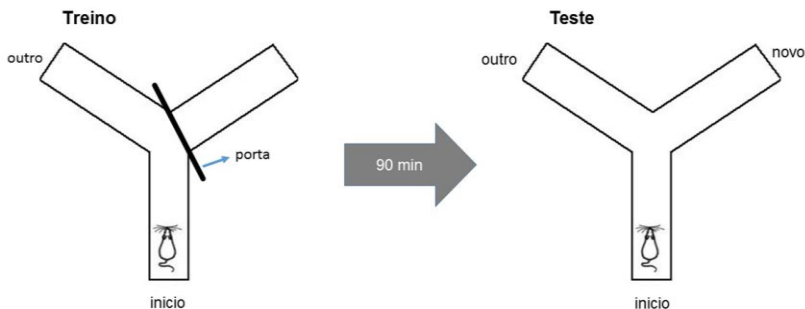


4.6.4. Labirinto em forma de Y-modificado

O labirinto em forma de Y- modificado (Y-M, do inglês Y-maze) é utilizado para avaliar a memória espacial e a exploração de novidade, tarefas que são em grande parte dependentes do hipocampo (JENKINS et al., 2004; SANDERSON et al., 2007; BIRD; BURGESS, 2008). A tarefa baseia-se na preferência inata dos camundongos em explorar áreas novas que não foram previamente exploradas, protocolo modificado de Soares e colaboradores (SOARES et al., 2013). O aparato utilizado neste teste consiste de em três braços (18 cm de comprimento, 6 cm de largura e 6 cm de altura) feitos de madeira coberta com fórmica impermeável elevada à uma altura de 50 cm acima do chão. Esta tarefa consiste de dois ensaios (treino e teste) de 8 min cada, separados por um intervalo de 90 min, protocolo utilizado para avaliação de memória de curto prazo (90 min). Durante a sessão de treino, um braço ("novo") foi bloqueado por uma porta removível e os camundongos foram colocados no final de um braço ("início") de frente para o centro e eles podiam escolher entre dois braços nessa sessão de treino: o braço de início e/ou o outro braço ("outro"). No final da sessão de treino, os camundongos foram removidos do labirinto e mantidos numa gaiola individual durante o intervalo (90 min). Durante o teste o braço "novo" foi aberto e os animais foram novamente colocados no braço de início e deixados a

explorar livremente os três braços durante 8 min. A porcentagem do número de entradas e a porcentagem de tempo gasto em cada braço nas duas sessões foram registradas. A entrada em um braço foi definida como a colocação de todas as quatro patas no braço (Fig15).

Figura 15. Resumo esquemático do teste Y-M



4.6.5. Labirinto aquático

A tarefa no labirinto aquático (*W-M*, do inglês *Water-maze*) utilizado neste estudo foi realizado em uma piscina semelhante à descrita por Morris e colaboradores (MORRIS et al., 1982). Aqui nós adaptamos a tarefa para os camundongos e foi utilizado uma versão de memória de trabalho do *W-M*, modificado de (AGUIAR et al., 2011). A memória de trabalho é breve e fugaz, servindo para o armazenamento temporário (segundos ou poucos minutos) de informações úteis para o raciocínio imediato e resolução de problemas, podendo ser descartadas (esquecidas) logo a seguir (BADDELEY, 1992, 2010). O hipocampo é importante para a localização espacial da plataforma, e o córtex pré-frontal é importante para a memória de trabalho (DUDCHENKO, 2004). Assim, nessa tarefa existe uma comunicação entre as duas estruturas para uma correta realização (RANGANATH, 2006).

O labirinto aquático utilizado neste estudo era circular e feito de fibra de vidro opaco, 1,80 m de diâmetro interno, 0,8 m de altura, e cheio até uma profundidade de 0,6 m com água mantida a 25 ° C. A plataforma de escape foi feita de Plexiglas transparente e submersa 1-1,5 cm abaixo da superfície da água. Os pontos de partida para os camundongos foram marcados na parte externa da piscina como Norte (N), Sul (S), Leste (E) e Oeste (W). Plataforma foi localizado no centro do quadrante Sudoeste (SW) em um ponto de 35 cm da parede da piscina. O aparato foi localizado numa sala com iluminação indireta incandescente. Um

monitor e um sistema de gravação de vídeo foram instalados em uma sala adjacente. Uma única sessão de treinamento que consistiu em 8 testes consecutivos, seguindo a sequência: N S E W N W E S, durante os quais os animais foram deixados no tanque de frente para a parede e, em seguida, permitiu nadar livremente para a plataforma submersa. Se o animal não encontrou a plataforma durante um período de 60 s, foi gentilmente guiado para ele. Deixou-se o animal permanecer na plataforma durante 10 s depois de escapar e foi então removido do tanque durante 10 min antes de ser colocado no próximo ponto de partida no tanque. Foram medidos os tempos de latência de fuga do ponto de partida para a plataforma. Este procedimento foi usado para assegurar que os animais mantivessem a informação visuoespacial do labirinto acessível a cada teste durante a execução da tarefa de memória de trabalho.

4.6.6. Teste de suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda (TSC) tornou-se um dos testes mais amplamente utilizados para avaliar a atividade do tipo antidepressivo de medicamentos em roedores. Baseia-se no fato de que animais submetidos ao estresse inescapável a curto prazo, de serem suspensos pela cauda, desenvolverão uma postura imóvel. A duração total da imobilidade induzida pelo teste de suspensão da cauda foi medida de acordo com o método descrito por Steru e colaboradores (STERU et al., 1985). Resumidamente, os camundongos foram suspensos a 50 cm acima do chão com uma fita adesiva colocada a aproximadamente 1 cm da ponta da sua cauda. O tempo de imobilidade foi registado durante um período de 5 min. Os animais foram considerados imobilizados apenas quando pendurados passivamente e completamente imóveis.

4.7. PREPARAÇÃO DE FATIAS HIPOCAMPAS

Para a realização das análises eletrofisiológicas, de dinâmica de concentração de $\dot{N}O$ e para o consumo de oxigênio mitocondrial, os hipocampus dos 4 grupos experimentais foram dissecados rapidamente e colocados em aCSF gelado e cortados utilizando um cortador de tecidos do tipo vibratório (Analítica) na espessura de 400 μm . As fatias foram separadas e transferidas para uma câmara de pré-incubação (BSC-PC, Harvard Apparatus) contendo aCSF. As fatias foram recuperadas nestas condições durante pelo menos 1 h antes de serem utilizadas.

4.8. ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICAS

As gravações eletrofisiológicas extracelulares do hipocampo foram realizadas conforme descrito anteriormente (ANDERSON; COLLINGRIDGE, 2001; DIÓGENES et al., 2004). Resumidamente, as fatias individuais foram transferidas para uma câmara de gravação e perfundidas com aCSF oxigenada a 30,5 ° C a um fluxo de 3 ml/min. Foram colocados eletrodos de aço inoxidável bipolar nas fibras colaterais de Schaffer e os estímulos de teste foram fornecidos através de um estimulador S44 (Grass Instruments, West Warwick, RI) com 1 unidade de isolamento de estímulo (PSIU6, Grass Instruments) com uma frequência de 0,06 Hz. Microeletrodos de vidro (1-2 MV) preenchidos com NaCl 4 M foram usados para registrar potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo no *estrato radiatum* da região CA1 do hipocampo. As gravações foram obtidas utilizando um amplificador ISO-80 (World Precision Instruments, Hertfordshire, Reino Unido) e digitalizadas utilizando uma placa ADC-42 (Pico Technologies, Pelham, NY, EUA). Para avaliar a plasticidade sináptica do hipocampo, utilizou-se um protocolo de explosão θ para induzir a LTP, que consistiu de 10 impulsos com quatro pulsos a 100 Hz com intervalo de cada impulso de 200 ms; Os fEPSPs foram registados durante 60 min adicionais (DIÓGENES et al., 2004). A inclinação média do fEPSP na linha de base foi fixada em 100%, e as variações da inclinação fEPSP foram expressas como percentagem da alteração a partir da linha de base. A transmissão sináptica basal foi medida utilizando-se a facilitação de pulso pareado (protocolo PPF), fenômeno originado pela acumulação de cálcio nos terminais pré-sinápticos, constituído por dois impulsos idênticos separados por um intervalo de cada impulso de 25 ms e a razão entre o segundo e o primeiro fEPSP foi calculado.

4.9. DINÂMICA DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Os microeletrodos de fibra de carbono foram fabricados como descrito anteriormente (SANTOS et al., 2008). Os microeletrodos foram testados quanto às suas propriedades gerais de gravação em tampão fosfato salina (0,05 M) por voltametria cíclica rápida (FCV, do inglês fast cyclic voltammetry) a uma velocidade de escaneamento de 200 V/s, entre -1,0 e + 1,0 V/AgCl durante 30s (Ensmann Instruments, EUA). Para melhorar as propriedades analíticas para as medições *in vitro* de NO , os microeletrodos foram revestidos com dois filmes de Nafion® (solução a

5%) e eletropolimerizados com solução de o-fenilenodiamina (5 mM) a um potencial constante de +0,7 V versus Ag/AgCl por 3 períodos de 15 min.

As fatias individuais foram colocadas numa câmara de registo (BSC-BU com BSC-ZT topo, Aparelho de Harvard) e perfundidas a um fluxo de 2 ml/min com aCSF normal a 32°C (controlador de temperatura Modelo TC-202A, Aparelho de Harvard), e continuamente borbulhada com O₂. Os microeletrodos para ¹NO foram inseridos na camada de células piramidais da sub-região CA1 da fatia do hipocampo de camundongos, a 100-200 µm no interior do tecido. Os elétrodos foram inseridos numa orientação antiparalela com um intervalo de 50 µm entre eles. A fatia do hipocampo foi estimulada com NMDA (100 µM) adicionado ao meio de perfusão durante 2 min. Os sinais ¹NO foram caracterizados em termos de amplitude de pico do sinal de ¹NO = concentração máxima de ¹NO ([¹NO] máx) (Fig.11), com base na conversão das correntes amperométricas para fluxos de ¹NO de acordo com a lei de Faraday ($I = nFU$, em que I corresponde ao corrente amperométrica, n corresponde a um elétron por molécula trocada pela oxidação do ¹NO, e F corresponde à constante de Faraday e U é o fluxo) e a taxa de decaimento do sinal de ¹NO, por meio da área sob a curva (Fig.11).

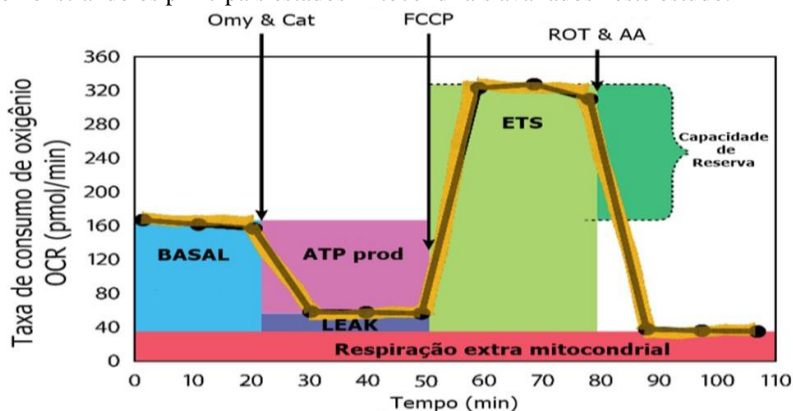
4.10. CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL

Para avaliar o consumo de oxigênio mitocondrial em fatias de hipocampo intactas, três a quatro fatias obtidas de cada grupo experimental foram transferidos para oxímetro 2K (respirometria de alta resolução, por Oroboros Instrumentos, Áustria) com 2 ml por câmaras, e foram determinados a taxa de consumo de O₂ (OCR, do inglês oxygen consumption rate) ou fluxo de O₂ por massa de tecido (pmol O₂/s/mg), mensurado em tempo real utilizando o software DatLab (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Áustria), como descrito anteriormente por nós (LOURENÇO et al., 2015). Devido à alta exigência de O₂ das faixas do hipocampo, as experiências foram realizadas em altas [O₂] e as câmaras foram reoxigenadas ao longo da experiência. Além disso, foram preparados manualmente “suportes” para que as fatias não se desmanchassem dentro da câmara. Estes suportes foram feitos de plástico inerte colados a uma rede de nylon, na qual recebia as 3 fatias para realização das leituras.

Primeiramente, foi avaliada a taxa de consumo de O₂ basal (BASAL), que foi mensurada em meio suplementado com albumina

bovina sérica (BSA, do inglês bovine serum albumin) e após a estabilização do fluxo de O_2 seguida à adição das fatias hipocâmpais às câmaras de registro do oxígrafo contendo aCSF + 25 mM de D-glucose e 0,23 mM de piruvato. Em seguida, a taxa de consumo de O_2 associado ao LEAK foi determinada adicionando-se oligomicina (Omy, do inglês oligomycin) (inibidor da enzima ATP sintase) na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e carboxiatractilósido (Cat) (inibidor do trocador ADP/ATP) na concentração de 12,5 mM. O estado mitocondrial de LEAK é uma condição na qual as mitocôndrias consomem O_2 , sem sintetizar ATP (não fosforilante), para compensar a fuga de prótons (GNAIGER, 2007). Na sequência, a taxa máxima de consumo de O_2 (ETS, do inglês electron transport system) foi determinada pela titulação com o ionóforo carbonilcianida p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP, do inglês carbonilcyanide p-trifluoromethoxyphenyl hydrazone), uma base fraca capaz de carrear os prótons do espaço intermembranas através das membranas, agindo como um desacoplador da fosforilação oxidativa. A taxa máxima de consumo de O_2 foi alcançada com concentrações de FCCP entre 0,2 e 0,4 μM . Por fim, o consumo de O_2 mitocondrial foi inibido de forma irreversível pela adição de rotenona (ROT) (2,2 μM) e antimicina-A (AA) (12,5 μM), inibidores dos complexos I e III, respectivamente (Fig. 16).

Figura 16. Esquema de um protocolo padrão utilizado neste estudo demonstrando os principais estados mitocondriais avaliados neste estudo.



(Fonte: <http://www.wklab.org/instrument-booking/seahorse-bioanalyzer>).

Nesta última etapa, a taxa de consumo de O_2 residual resultante representa o consumo de O_2 extramitocondrial, ou seja, o consumo

realizado por outras organelas e processos bioquímicos celulares independentes da mitocôndria (AMOÊDO et al., 2011). OCR dependente da produção de ATP (ATP prod) foi calculado pela diferença entre OCR basal e LEAK, e a capacidade de reserva mitocondrial foi calculada pela diferença entre ETS e OCR basal.

4.11. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os camundongos foram profundamente anestesiados sob uma atmosfera saturada com halotano e foram perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina a 0,9%, seguido de paraformaldeído a 4% em solução de 0,1 M de tampão fostato -salina (PBS, do inglês phosphate-buffered saline), pH 7,4. Após a perfusão, os cérebros foram removidos, pós-fixados na mesma solução fixadora durante 24 h à temperatura ambiente e crioprotégidos por imersão numa solução de sacarose a 30% em PBS a 4 °C. Os cérebros foram então congelados por imersão em isopentano e armazenados num congelador (-80 °C) para análises posteriores. Secções coronais seriadas (40 µm) de hipocampo foram obtidas com um criostato (Leica) a -20 °C. Utilizando a técnica “free-floating”, as fatias foram primeiramente bloqueadas utilizando soro de cavalo a 5% (HS, do inglês horse serum) diluído em PBS contendo Triton X-100 a 2% (PBS-Tx) durante 2h à temperatura ambiente. Em seguida as secções foram incubadas durante a noite a 4 °C com anti-aquaporina 4 (Santa Cruz Biotechnology, AQP-4, 1: 100, sc-9888) de cabra em HS a 1% diluído em PBS-Tx a 0,5%. Após três lavagens em PBS, as fatias foram incubadas com anti-cabra Alexa 568 (Invitrogen, 1: 400, A11079) em HS a 1% diluído em PBS-Tx a 0,5% durante 2 h à temperatura ambiente. Para a imunomarcagem de lectina de tomate, as fatias foram primeiro permeabilizadas em solução salina tris-tamponada (TBS, do inglês triton buffer saline) contendo Triton X-100 a 1% durante 2 h à temperatura ambiente. Em seguida as fatias foram incubadas durante a noite a 4 °C com lectina *Lycopersicon esculentum* (lectina de tomate, Vector Laboratories, Burlingame, VT), diluída a 1: 200. Após três lavagens em TBS, as fatias foram incubadas com Streptavidina, conjugado Alexa Fluor® 568 (Santa Cruz Biotechnology, 1: 500, s11226) durante 2 h à temperatura ambiente. Seguidamente, as secções foram lavadas três vezes em PBS e montadas em lâminas com Fluor Save (Millipore, 345789), e cobertas com lamínulas. Finalmente, as imagens das fatias de hipocampo de camundongos foram obtidas com

um microscópio confocal Olympus FV-10i e examinadas e quantificadas com Fiji ImageJ software.

4.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

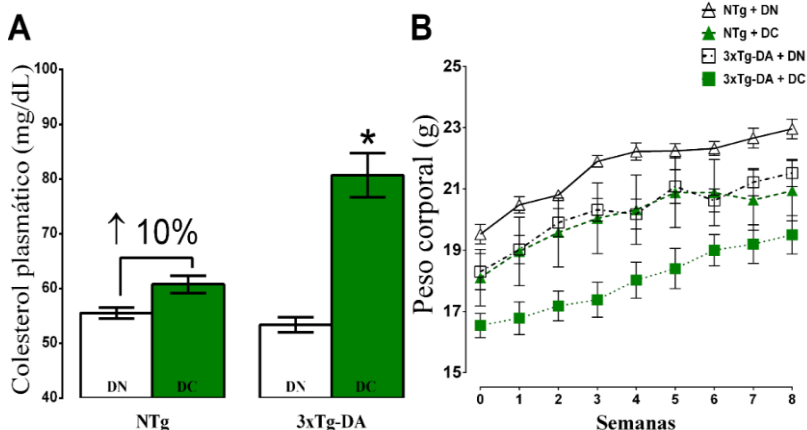
Todos os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e foram expressos como a média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância bidirecional (ANOVA) com genótipo e tratamento e idade como variáveis independentes. Após as ANOVAs significativas, realizaram-se comparações múltiplas utilizando o teste post hoc de Tukey. No teste de reconhecimento de objeto novo também foi determinado por meio do teste T de Student se o índice de reconhecimento diferente de menos 50% (investigação aleatória) e Y-Maze modificado foi determinado por meio do teste T de Student se a percentagem de entradas de braço e percentagem de tempo gasto em cada braço diferente de menos 33% (entradas aleatórias e tempo, respectivamente). O nível de significância aceito para os testes foi $p \leq 0,05$. Todos os testes foram realizados usando o pacote de software GraphPad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. A INGESTÃO DA DC POR 8 SEMANAS É CAPAZ DE INDUZIR HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS NTG E 3XTG-DA?

Em um primeiro momento, avaliamos se a administração de uma dieta com adição de 1,25% de colesterol e 20% de gordura saturada (dieta enriquecida com colesterol), por 8 semanas, seria capaz de elevar os níveis de colesterol plasmático nos camundongos NTg e em um modelo triplo transgênicos para a DA - 3xTg-DA. Conforme mostrado no painel A da figura 17 a análise estatística realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias, utilizando como variáveis dieta (DC ou DN) e genótipo (3xTg-DA ou NTg), indicou efeito da dieta [F(1,28)=34,336, $p \leq 0,05$], do genótipo [F(1,28)=10,278, $p \leq 0,05$] e da interação entre os dois fatores [F(1,28)=15,775, $p \leq 0,05$](Fig.17A). Os camundongos 3xTg-DA quando alimentados por 8 semanas com DC apresentaram níveis de colesterol plasmáticos maiores comparados aos 3xTg-DA que receberam uma dieta normal (DN). Os camundongos NTg + DC apresentaram um aumento cerca de 10% ($60,77 \pm 1,7$) em comparação com os NTg que receberam a DN.

Figura 17. Níveis plasmáticos de colesterol total (A) e a variação de ganho de peso (B) durante as 8 semanas de tratamento com a DC. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n = 6$ a 7 . (NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo transgênico para a DA, DN= dieta normal e DC= dieta com colesterol). * $p \leq 0,05$ comparado com 3xTg-DA.



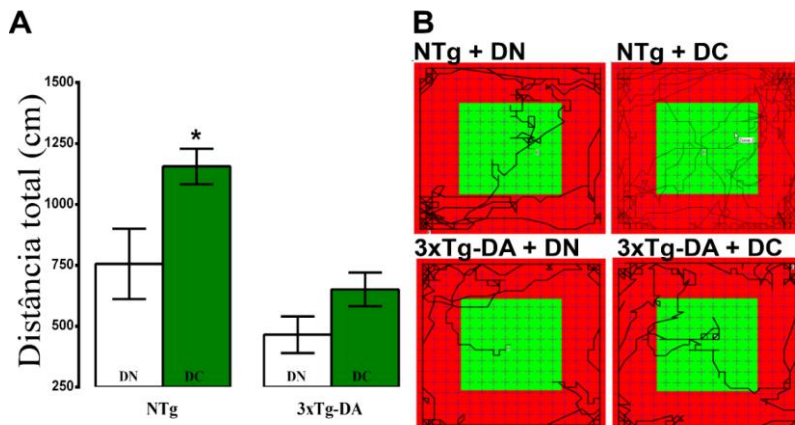
Entretanto devido à grande variação entre as médias dos quatro grupos, só pudemos observar diferença significativa no grupo dos NTg pela utilização do teste t de Student ($55,53 \pm 1,3$, $p \leq 0,05$, teste t de Student) (Fig. 17A).

Em relação ao perfil de alteração do peso corporal durante o tratamento com a DC, não observamos diferenças significativas entre os grupos (Fig. 17B). As variações médias no peso corporal (Δ peso corporal) entre o início e o fim do tratamento foram $\Delta = 3,14 \pm 0,50$ para NTg + DN; $3,75 \pm 0,59$ para NTg + DC; $3,28 \pm 0,40$ para 3xTg-DA + DN e $3,18 \pm 0,64$ para 3xTg-DA + DC. Portanto, a ingestão de DC aumentou os níveis de colesterol plasmático instalando um quadro de hipercolesterolemia em ambos os genótipos sem alterar o ganho de peso corporal.

5.2. A INGESTÃO DA DC POR 8 SEMANAS É CAPAZ DE INDUZIR PREJUÍZOS COGNITIVOS EM CAMUNDONGOS NTG SIMILAR AOS CAMUNDONGOS 3XTG-DA E INTENSIFICAR OS PREJUÍZOS NOS 3XTG-DA?

A atividade locomotora e exploratória dos animais foi avaliada no teste do campo aberto (Fig.18).

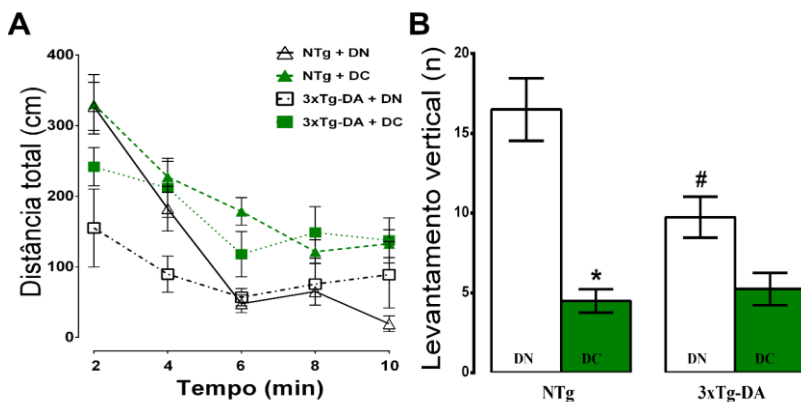
Figura 18. Distância total percorrida (A) em cm na arena do campo aberto e desenho representativo do percurso de um animal de cada grupo (B). (NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo transgênico para a DA, DN= dieta normal e DC= dieta com colesterol). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p \leq 0.05$ comparado com NTg + DN.



Ao avaliarmos a distância total percorrida na arena do campo aberto, a análise estatística realizada por ANOVA de duas vias indicou um efeito da dieta [$F(1,28)=11,10$, $p \leq 0,05$] e do genótipo [$F(1,28)=20,703$, $p \leq 0,05$]. Somente o grupo NTg + DC apresentou um aumento significativo na distância total percorrida comparado ao NTg + DN (Fig.18).

O aumento significativo na atividade locomotora de camundongos hipercolesterolêmicos ($LDLr^{-/-}$) já foi descrita na literatura (ELDER et al., 2008) e, recentemente, também evidenciado por nosso grupo de pesquisa (MOREIRA et al., 2012). No entanto, o presente estudo apresenta a primeira evidência de hiperlocomoção induzida por DC em camundongos NTg. Em seguida, avaliamos o comportamento exploratório e o levantamento vertical na arena do campo aberto.

Figura 19. Distância percorrida a intervalos de 2 minutos (A) na arena do campo aberto e levantamento vertical na arena do campo aberto. (NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo transgênico para a DA, DN= dieta normal e DC= dieta com colesterol). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p \leq 0,05$, # $p \leq 0,05$ comparado com NTg + DN.

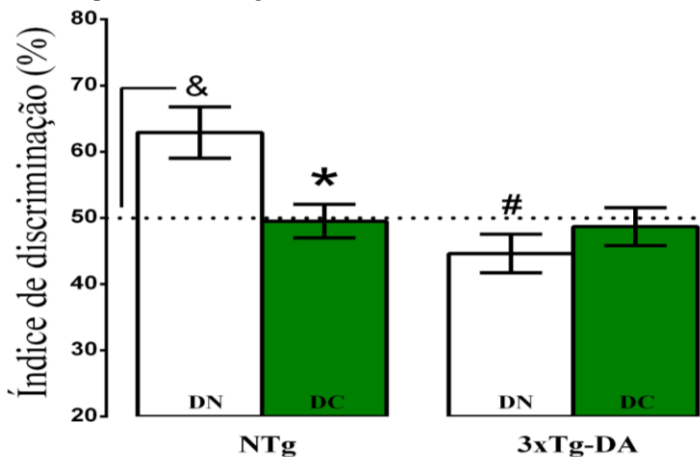


Conforme observado no painel A da figura 19, os camundongos NTg + DN (Triângulos abertos) iniciam a explorar o campo aberto e percorrer uma distância superior aos demais grupos durante os minutos iniciais, que se reduz rapidamente até ao sexto minuto de teste e em seguida se mantém estável a distância percorrida. O mesmo perfil não é observado nos animais 3xTg-DA (independente da dieta) (Quadrados abertos e fechados), sendo que estes animais mantêm a mesma distância percorrida durante os 10 minutos. Já o grupo NTg + DC apresentou um

perfil similar ao controle, porém com uma distância maior até ao oitavo minuto, quando a distância percorrida estabiliza (Triângulos fechado na figura 19A). Nós também observamos uma diminuição no levantamento vertical nos grupos NTg + DC e 3xTg-DA + DN (Fig. 19B). A análise estatística revelou que tanto a dieta [(F(1,17)=39,81, $p \leq 0,05$)] como o fator genótipo [(F(1,17)=5,26, $p \leq 0,05$)] e a interação entre os dois [(F(1,17)=8,22, $p \leq 0,05$)] contribuíram para esses efeitos.

A memória de reconhecimento foi mensurada por meio do teste de reconhecimento de objeto novo (Fig.20). O teste baseia-se na tendência espontânea de roedores, previamente expostos a dois objetos idênticos (familiar), para mais tarde explorar um objeto novo por um tempo mais longo que o objeto familiar (LEGER et al., 2013).

Figura 20. Teste de reconhecimento de objeto novo. (NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo transgênico para a DA, DN= dieta normal e DC= dieta com colesterol). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. O teste “*t*” foi utilizado para a determinação da mudança de desempenho no teste de reconhecimento de objeto, ou seja, a avaliação se a % de tempo explorando o objeto novo diferia significativamente de um valor teórico de 50% (& $p \leq 0,05$ comparado com um valor teórico de 50%). * $p \leq 0,05$, # $p \leq 0,05$ comparado com NTg + DN, ANOVA de duas vias.

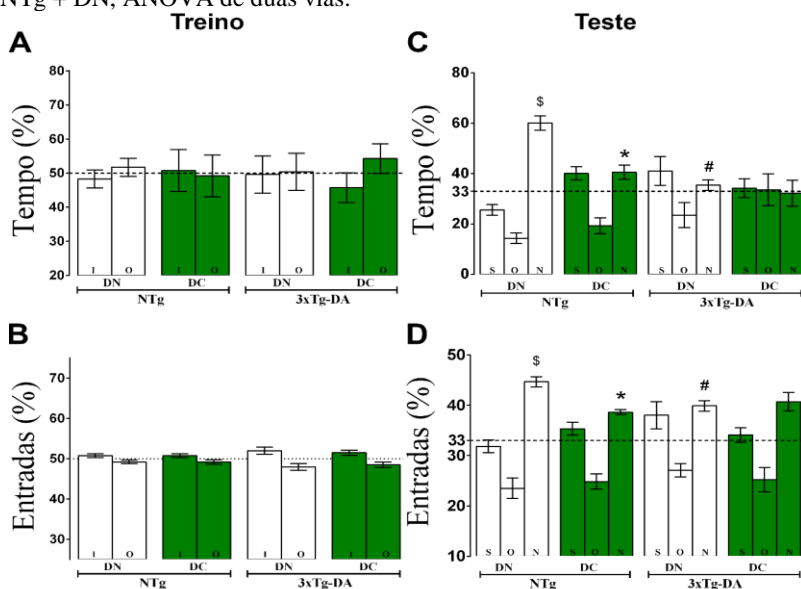


De acordo com a figura 20, apenas os camundongos NTg + DN exploraram o objeto novo por um tempo significativamente maior que o objeto familiar, como indicado pelo aumento no índice de discriminação em comparação a 50% ($t=2.483$, $p \leq 0,05$). Por outro lado, os grupos NTg + DC e 3xTg-DA (independente de dieta) não foram capazes de

discriminar o objeto novo do objeto familiar ($p > 0,05$). A análise estatística revelou que tanto o fator genótipo ($F(1,24) = 9,54$, $P \leq 0,05$) como a interação dos fatores ($1,24 = 7,93$, $P \leq 0,05$) contribuíram para esse efeito.

O teste do labirinto em forma de Y modificado baseia-se na preferência inata dos animais em explorar áreas que não foram anteriormente exploradas. Conforme observado na figura 21A e 21B, a análise estatística não indicou diferenças significativas durante a fase de treino, tanto no tempo gasto em cada braço em porcentagem (painel A) como no número de entradas em cada braço (painel B). Após o intervalo de 90 minutos, observamos que o grupo NTg + DN explorou uma % de tempo que foi significativamente diferente ($t = 7,29$, $p \leq 0,001$) do valor teórico de 33%, ou seja, eles perceberam que existe um braço novo que não foi anteriormente explorado (Fig. 21C).

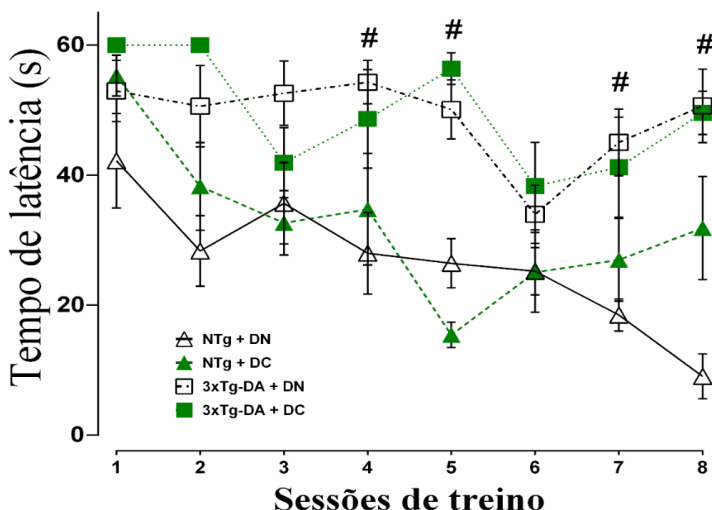
Figura 21. Labirinto em forma de Y- modificado. (A) tempo gasto e (B) número de entradas em cada braço durante o treino. (C) tempo gasto e o (D) número de entradas em cada braço durante o teste. (I= braço inicial, O= outro braço, N= braço novo, NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo transgênico para a DA, DN= dieta normal e DC= dieta com colesterol). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. $\$p \leq 0,05$ comparado a um valor teórico de 33% (teste t de Student). * $p \leq 0,05$, # $p \leq 0,05$ comparado com NTg + DN, ANOVA de duas vias.



No entanto, os animais NTg + DC e 3xTg-DA, independente da dieta, não foram capazes de identificar que existia um novo braço para explorar ($p > 0,05$). Esses resultados juntamente com os dados da figura 20 apontam para um prejuízo de memória espacial e de reconhecimento nos grupos de animais NTg + DC e no grupo 3xTg-DA independente da dieta.

Com o objetivo de avaliar o efeito da DC sobre a aquisição de memória operacional ou de trabalho, o tempo de latência para localizar a plataforma durante oito seções de treino foi mensurado no teste do labirinto aquático de Morris. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias (dieta e genótipo) com medidas repetidas e estão representados na figura 22.

Figura 22. Tempo de latência em segundos (NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo transgênico para a DA, DN= dieta normal e DC= dieta com colesterol). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. # $p \leq 0,05$ comparado com NTg + DN (ANOVA de duas vias, e com medidas repetitivas seguido pelo teste post-hoc de Tukey).

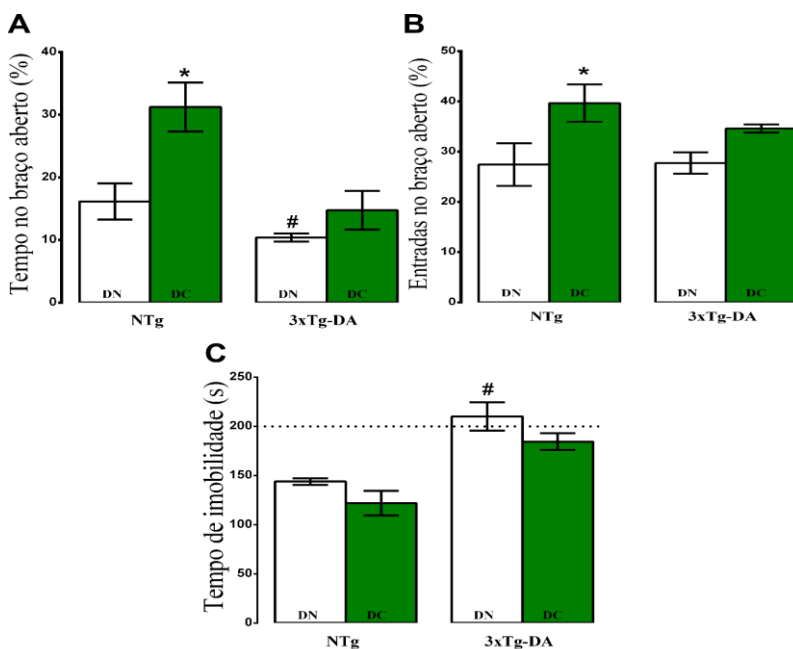


A análise estatística indicou efeito do genótipo [$F(1,34)=77,591$, $p \leq 0,05$], da repetição [$F(7,238)=6,6230$, $p \leq 0,05$], e interação entre o genótipo e repetição [$F(7,238)=2,838$, $p \leq 0,05$]. Nós visualizamos diferenças nos tempos de latência a partir do quarto ao oitavo treino, exceto no sexto treino, entre os grupos 3xTg-DA + DN versus NTg + DN ($p \leq 0,05$) e entre 3xTg-DA + DC versus NTg + DC ($p \leq 0,05$). De

fato, observamos que os animais 3xTg-DA, independente da dieta, não foram capazes de aprender o local onde está localizada a plataforma, ou seja, exibiram prejuízo na aquisição de memória operacional ou de trabalho (símbolos quadrados na figura 22).

Em seguida, avaliamos o efeito da DC em camundongos NTg e 3xTg-DA no teste do labirinto elevado em forma de cruz e no teste de suspensão pela cauda.

Figura 23. Tempo gasto (A) e número de entradas (B) no braço aberto no EPM e (C) tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda (NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo transgênico para a DA, DN= dieta normal e DC= dieta com colesterol). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p \leq 0.05$, # $p \leq 0.05$ comparado com NTg + DN.



Ao analisarmos o tempo gasto no braço aberto em percentagem, observamos um efeito da dieta [$F(1,20)=11,28$, $p \leq 0,05$] e do genótipo [$F(1,20)=14,81$, $p \leq 0,05$] indicado pela análise estatística ANOVA de duas vias. Os camundongos NTg + DC apresentaram um aumento no tempo gasto no braço aberto, enquanto os camundongos 3xTg-DA apresentaram uma diminuição significativa quando comparados aos

NTg + DN. Interessantemente, esse aumento no tempo no braço aberto observado no grupo NTg + DC foi acompanhado por um aumento no número relativo de entradas no mesmo braço, o qual, a análise estatística revelou efeito somente da dieta [$F(1,20)=9,87, p\leq 0,05$]. Este teste avalia situações naturalmente ameaçadoras, representadas no modelo pela altura e pelo espaço aberto, que explicaria a maior aversão para explorar os braços abertos em roedores Assim, podemos observar que a DC alterou a percepção de aversão devido ao aumento no tempo e no número de entradas no braço “aversivo” (aberto). No teste de suspensão pela cauda, podemos observar que o fator genótipo [$F(1,20)=37,16, p\leq 0,05$] contribuiu para o efeito observado, e o grupo 3xTg-DA + DN apresentou um aumento no tempo de mobilidade comparado ao NTg + DN, que corrobora com a diminuição do comportamento de levantamento vertical (Fig.19B), caracterizado no modelo 3xTg-DA, como já demonstrado anteriormente (STERNICZUK et al., 2010).

A tabela 2 mostra o resumo dos resultados encontrados nos testes cognitivos avaliados em camundongos NTg e 3xTg-DA após por 8 semanas de ingestão de DN e DC.

Tabela 2. Resumo dos resultados dos testes cognitivos

Teste Comportamental	Parâmetro	Grupos			
		NTg		3xTg-DA	
		DN	DC	DN	DC
Campo aberto	Distância total percorrida	-	↑*	ñ alterou	ñ alterou
	Levantamento vertical	-	↓*	↓ [#]	ñ alterou
Reconhecimento de objeto	Índice de discriminação	≠ 50%	= 50%	= 50%	= 50%
Labirinto em forma de Y- modificado	% de tempo no braço novo	≠ 33%	= 33%	= 33%	= 33%
	% de entradas no braço novo	≠ 33%	= 33%	= 33%	= 33%
Labirinto aquático	Tempo de latência	↓	↓	ñ alterou	ñ alterou
Labirinto em forma de cruz elevado	% de tempo no braço aberto	-	↑*	↓ [#]	ñ alterou
	% de entradas no braço aberto	-	↑*	ñ alterou	ñ alterou
Suspensão pela cauda	Tempo de imobilidade	-	-	↑ [#]	ñ alterou

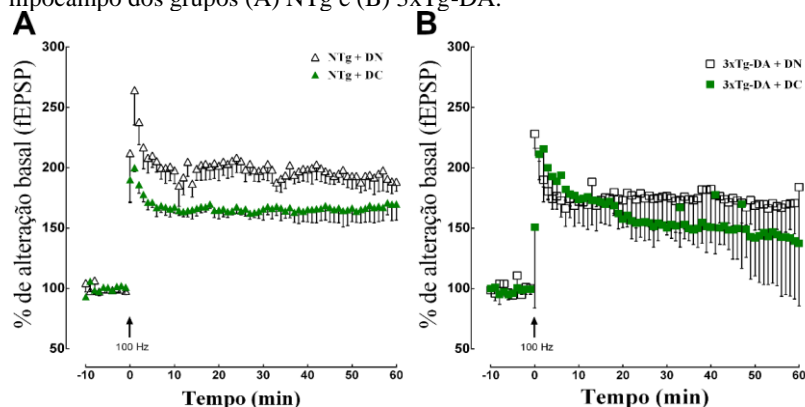
Até aqui, observamos que a hipercolesterolemia induzida pela ingestão de DC causou comprometimento no comportamento exploratório, prejuízos de memória espacial e de reconhecimento em camundongos NTg similares aos 3xTg-DA. Além disso, foram alteradas pela DC a atividade locomotora e o comportamento aversivo nos animais NTg. Os camundongos 3xTg-DA apresentam comprometimento no comportamento exploratório, prejuízos de memória espacial, de

reconhecimento e trabalho que não foram intensificados pela DC. Portanto, devido a algumas funções cognitivas estudadas acima estarem relacionadas, em partes, com a formação hipocampal, nós procuramos entender os mecanismos pelos quais a DC causa disfunção cognitiva em fatias hipocampais dissecadas dos grupos experimentais, para as avaliações eletrofisiológicas, dinâmica de concentração do *NO , respirometria de alta resolução e análises de imunofluorescência, como descrito na sessão “*Materiais e Métodos*”.

5.3. A INGESTÃO DA DC INDUZIU ALTERAÇÕES SOBRE A PLASTICIDADE SINÁPTICA DE CAMUNDONGOS NTG E 3XTG-DA?

A plasticidade sináptica envolve mudanças na eficácia nas comunicações sinápticas entre diversos circuitos neuronais, e que mediar o armazenamento de informações adquiridas durante a aprendizagem. Tanto os mecanismos pré-sinápticos quanto pós-sinápticos podem contribuir para a expressão da plasticidade sináptica (COOKE; BLISS, 2006).

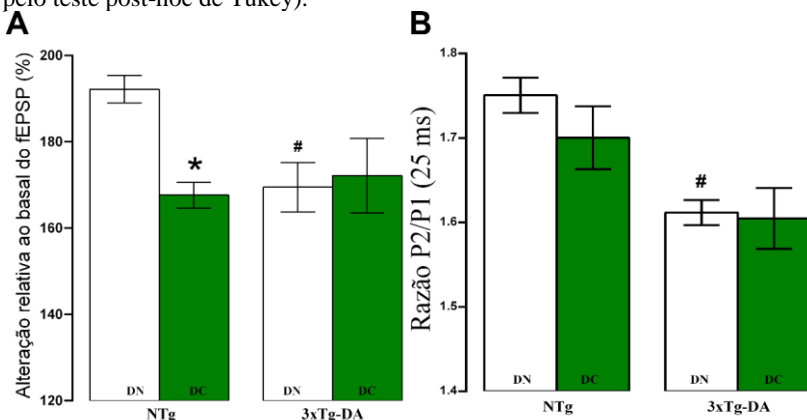
Figura 24. Figura representativa da modificação do slope, apresentada como % em relação à linha de base, antes e depois da estimulação tetânica em fatias de hipocampo dos grupos (A) NTg e (B) 3xTg-DA.



Assim, avaliamos o efeito da DC sobre a plasticidade sináptica hipocampal de camundongos NTg e 3xTg-DA. Para esse fim, avaliamos tanto a indução da LTP como a transmissão pré-sináptica basal através do protocolo de estimulação de pulso pareado. Conforme ilustrado na figura 24A e 24B, a estimulação de alta frequência (100 Hz) induziu um

aumento sustentado na amplitude do sinal do potencial pós-sináptico excitatório (fEPSP, do inglês field excitatory postsynaptic potential) em todos os grupos, como esperado. No entanto, a magnitude da LTP em relação a linha de base nas fatias hipocâmpais foi diminuída nos grupos NTg + DC e 3xTg-DA + DN comparados ao grupo NTg + DN. A análise estatística revelou que o fator genótipo [$F(1,226)=14,36, p\leq 0,05$] e a interação entre o genótipo e a dieta [$F(1,226)=27,00, p\leq 0,05$] contribuíram para os efeitos observados (Fig.25A). Ao avaliarmos a transmissão pré-sináptica basal através do protocolo de estimulação de pulso pareado, com 25 ms de intervalo entre os pulsos, observamos um efeito do genótipo somente [$(F(1,47)=12,54, p\leq 0,05)$](Fig.25B).

Figura 25. (A) % de amplitude do sinal dos últimos 60 min após a estimulação tetânica. (B) Razão P2/P1 a cada 25 ms. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. (NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo transgênico para a DA, DN= dieta normal e DC= dieta com colesterol). * $p\leq 0,05$, # $p\leq 0,05$ comparado com NTg + DN (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste post-hoc de Tukey).

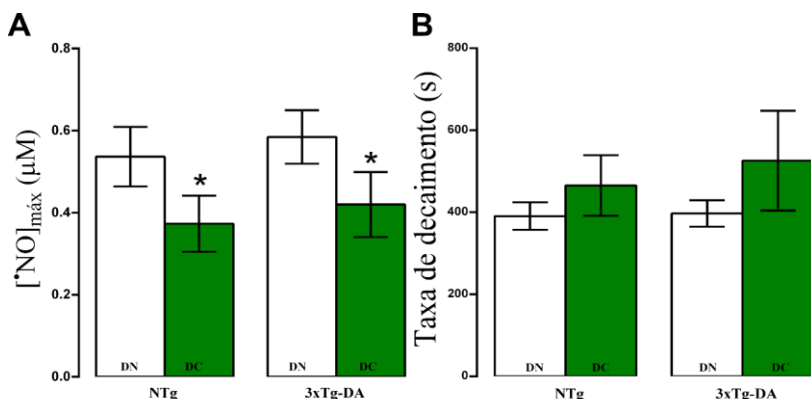


Esses resultados mostram a primeira evidência de diminuição na indução da LTP em camundongos NTg induzido pela DC. Esta diminuição na capacidade de realizar processos de plasticidade sináptica induzida pela hipercolesterolemia certamente contribui para os prejuízos cognitivos observados nos camundongos NTg, os quais foram muito similares aos 3xTg-DA (Fig. 24). Além disso, a DC não intensificou os efeitos de plasticidade sináptica já observadas nos 3xTg-DA, os quais já apresentam deficiências na transmissão pré e pós-sináptica (Fig. 25).

5.4. A INGESTÃO DA DC POSSUI EFEITOS SOBRE A BIODISPONIBILIDADE DE $\dot{\text{NO}}$ DE CAMUNDONGOS NTG E 3XTG-DA?

Em nosso estudo, avaliamos em fatias de hipocampo a dinâmica de concentração do $\dot{\text{NO}}$ por meio da concentração máxima de $\dot{\text{NO}}$ após ativação dos receptores de glutamato do tipo NMDA, e pela taxa de decaimento desta concentração. $\dot{\text{NO}}$ neuronal é bastante conhecido pela sua atuação como mensageiro retrógrado, de forma a sustentar os mecanismos da LTP na sub-região CA1 do hipocampo (PRAST; PHILIPPU, 2001). Conforme observado na figura 26A, a ingestão da DC induziu uma diminuição na $[\dot{\text{NO}}]_{\text{máx}}$ nos grupos NTg e 3xTg-DA comparado ao grupo NTg + DN e 3xTg-DA + DN respectivamente. A análise estatística realizada por ANOVA de duas vias indicou efeito somente da dieta [(F(1,67)=3,93, $p \leq 0,05$)].

Figura 26. Concentração máximo de $\dot{\text{NO}}$ (A) e taxa de decaimento do sinal de $\dot{\text{NO}}$ (B). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. (NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo transgênico para a DA, DN= dieta normal e DC= dieta com colesterol) * $p \leq 0,05$ comparado com NTg + DN.



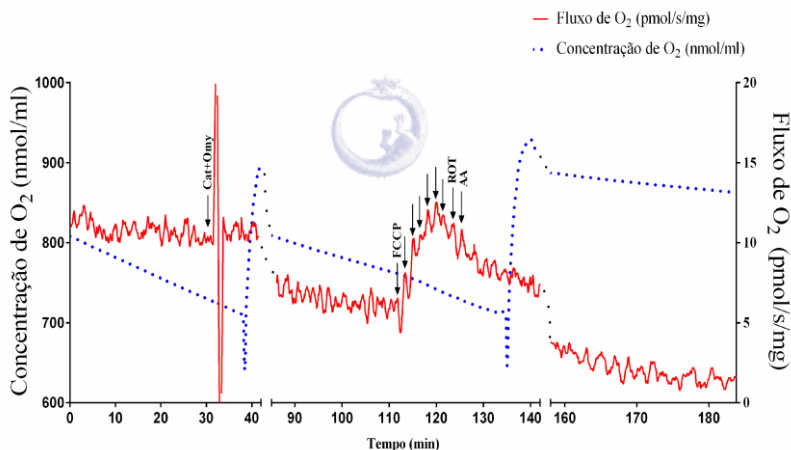
Em concordância com os resultados da LTP, podemos observar que outro efeito importante da ingestão da DC foi a diminuição na biodisponibilidade de $\dot{\text{NO}}$ por meio da redução da concentração de $\dot{\text{NO}}$. Assim, a atividade sináptica pode estar prejudicada, uma vez o $\dot{\text{NO}}$ é importante para a manutenção de O_2 e nutrientes aos neurônios, provenientes dos microvasos – acoplamento neurovascular. Assim, esses dados sugerem além de um comprometimento sináptico, existe também

uma contribuição neurovascular para os efeitos observados nos testes cognitivos.

5.5. A INGESTÃO DA DC INDUZIU ALTERAÇÕES SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL DE CAMUNDONGOS NTG E 3XTG-DA?

As mitocôndrias desempenham um papel essencial na respiração celular, através da síntese de ATP acoplada com o consumo de oxigênio. Dessa forma, a mitocôndria precisa de um suprimento contínuo de O_2 provenientes dos microvasos, assim, uma perturbação neurovascular pode contribuir para uma disfunção mitocondrial. Portanto, a disfunção mitocondrial e conseqüentemente a desregulação do metabolismo energético está fortemente associada com a fisiopatologia da DA. Em nosso estudo avaliamos através da respirometria de alta resolução (OROBOROS 2K Oxymeter) diversos parâmetros relacionados à função mitocondrial em fatias de hipocampo, conforme ilustrado na figura 27 e descrito em detalhes na seção “*Materiais e Métodos*”.

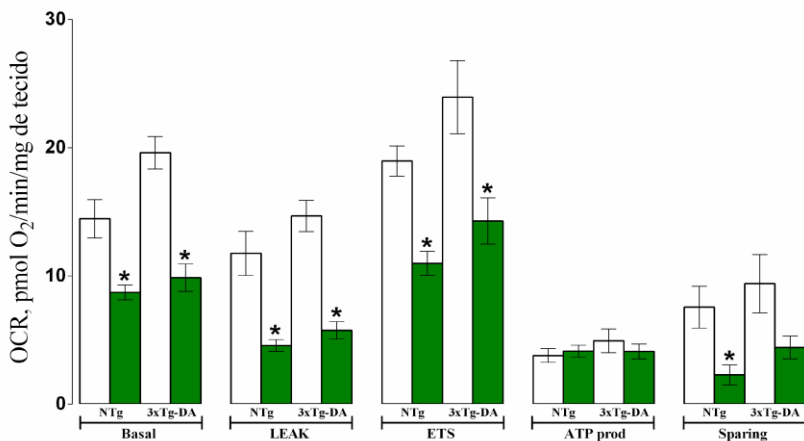
Figura 27. Esquema representativa do protocolo de respirometria em fatias hipocâmpais. Concentração de O_2 (linhas pontilhadas azuis) e fluxo de O_2 (linhas contínuas vermelhas). (cat+Omy= carboxiatractilósido + oligomicina, FCCP= carbonilcianida p-trifluorometoxifenil-hidrazona, ROT= rotenona e AA= antimicina-A).



Essa técnica nos permite mensurar a taxa de consumo de O_2 e suas pequenas variações em amostras vivas, segundo protocolos descritos

anteriormente (SEBOLLELA et al., 2010; PESTA e GNAIGER, 2012). Aqui nós padronizamos a mensuração da função mitocondrial em fatias hipocâmpais de camundongos. Nós observamos que a ingestão da DC causou uma drástica disfunção mitocondrial no hipocampo de camundongos NTg e 3xTg-DA, evidenciada pela diminuição na taxa de consumo de O_2 basal, associado ao estado de LEAK e ao estado de ETS em fatias hipocâmpais, de ambos os genótipos. Além disso, nós observamos que a capacidade de reserva mitocondrial foi diminuída nos camundongos NTg que receberam a DC. A análise estatística ANOVA de duas vias indicou que o fator dieta contribuiu para os efeitos observados no OCR Basal [(F (1,28) = 44,94, $p \leq 0,05$)], LEAK [(F (1,28)=50,56, $p \leq 0,05$)], ETS [(F(1,26)=26,97 $p \leq 0,05$), e o fator genótipo no OCR basal [(F(1,28)=7,43, $p \leq 0,05$)] e no ETS [(F(1,26)=5,96, $p \leq 0,05$)](Fig.28).

Figura 28. Taxa de consumo de oxigênio (OCR) associado à respiração basal das fatias, ao estado de LEAK, ao estado de ETS, ao consumo de oxigênio vinculado à produção de ATP e a capacidade de reserva mitocondrial (sparing) de fatias hipocâmpais de camundongos NTg e 3xTg-DA alimentados com DN e DC por 8 semanas. (NTg= animal não transgênico, 3xTg-DA= animal triplo transgênico para a DA, DN= dieta normal e DC= dieta com colesterol). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com NTg + DN.



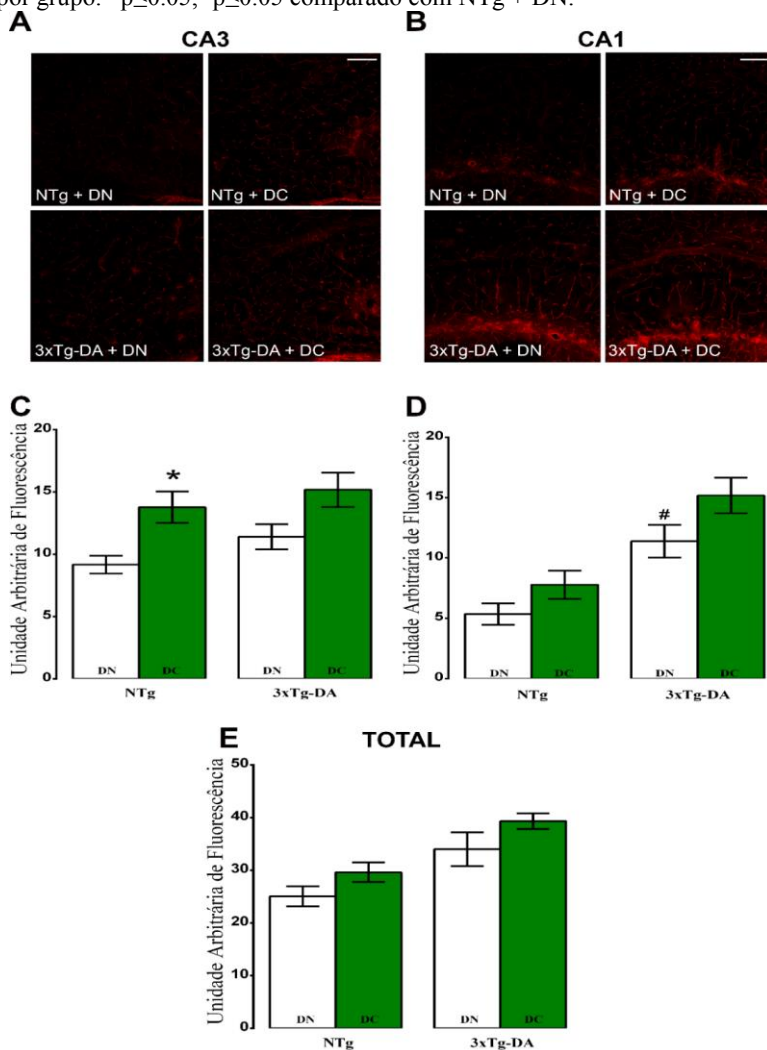
Notavelmente, não observamos diferenças nas taxas de consumo de O_2 dos 3 estados anteriormente mencionados (BASAL, LEAK e ETS) nos camundongos 3xTg-DA em relação aos NTg. Este dado sugere que as mitocôndrias dos 3xTg-DA se mantêm funcionais até pelo menos aos 6

meses de idade. A partir dos 6 meses, as manifestações como neuroinflamação e formação das placas senis tóxicas se tornam mais agressivas e podem contribuir para a disfunção mitocondrial neste modelo.

5.6. A INGESTÃO DA DC É CAPAZ DE ALTERAR A INTEGRIDADE DA BHE DE CAMUNDONGOS NTG E 3XTG-DA?

Estudos sugerem que a hipercolesterolemia pode comprometer a BHE e conseqüentemente promover um aumento do influxo cerebral de moléculas da periferia e ativa o processo neuroinflamatório. Esta modificação na homeostase cerebral pode então conduzir prejuízos cognitivos (PUGLIELLI et al., 2003; LECERF; LORGERIL, DE, 2011). A detecção imunofluorescente de AQP-4, canal de água altamente expressado em astrócitos, e de lectina de tomate, marcador utilizado para identificar vasos sanguíneos, foram utilizados como biomarcadores de integridade de BHE em fatias de hipocampo de camundongos NTg e 3xTg-DA alimentados com DN ou DC. Como pode ser apreciado na figura 29, a imunorreatividade para a AQP-4 na sub-região CA3 (Fig. 29A e 29C) do hipocampo foi maior no grupo NTg + DC comparado ao NTg + DN. Já na sub-região CA1 (Fig. 29B e 29D), a imunorreatividade para a AQP-4 foi maior no 3xTg + DN comparado ao NTg + DN. A análise estatística revelou que para a sub-região CA3 houve um efeito do fator dieta [(F(1,12)=14,9, p≤0,05)] para os resultados observados. E para sub-região CA1 houve um efeito do fator dieta [(F (1,12)=6,27, p≤0,05)] e do genótipo [(F (1,12)=29,11, p≤0,05)].

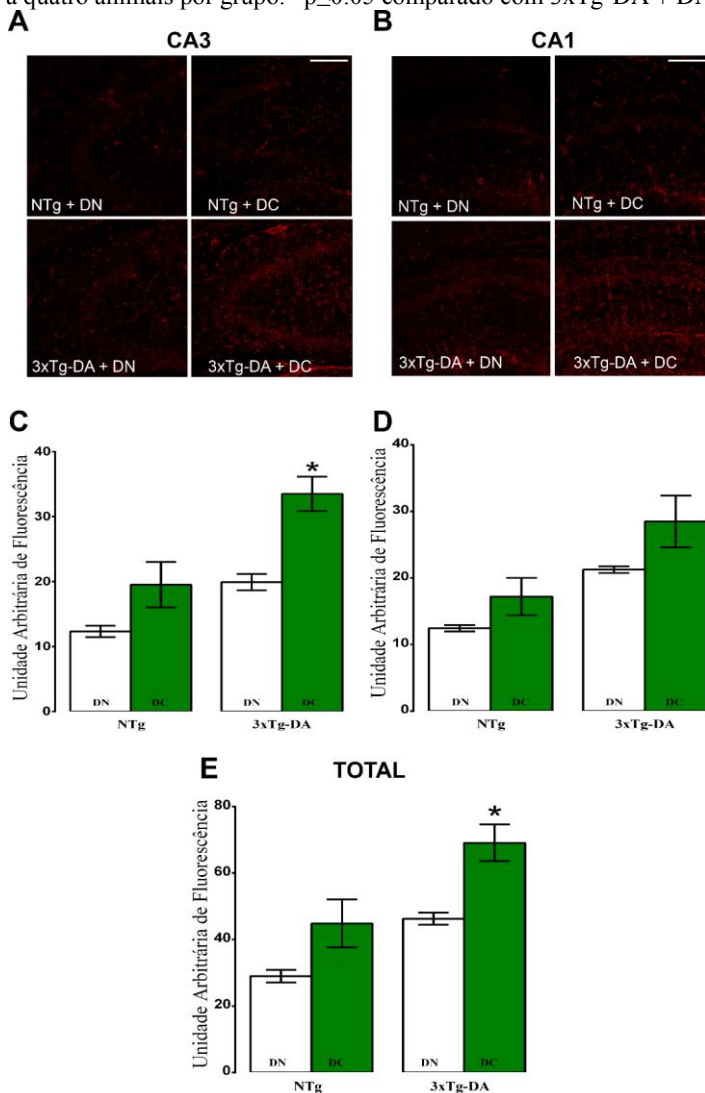
Figura 29. Os painéis (A) e (B) mostram imagens representativas de imunorreatividade para AQP-4 nas regiões CA3 e CA1 respectivamente, do hipocampo de camundongos NTg + DN. NTg + DC, 3xTg-DA + DN e 3xTg-DA + DC. Barra de escala = 100 μ m. Para cada sub-região, a intensidade de fluorescência relacionada a imunoreatividade para a AQP-4 foi quantificada e plotada em gráficos de barras em (C) CA3 e (D) CA1 e hipocampo total (E). Os dados são expressos como média \pm SEM das médias de três a quatro animais por grupo. * $p \leq 0.05$, # $p \leq 0.05$ comparado com NTg + DN.



A lectina de tomate (*Lycopersicon esculentum*) é um marcador bastante utilizado para marcar vasos sanguíneos, uma vez que ela se liga seletivamente aos glicocálix das células endoteliais perfundidas. Ao avaliarmos a quantificação da imunorreatividade para a lectina observamos que o grupo 3xTg-DA + DC apresentou maior marcação comparado ao 3xTg-DA + DN na sub-região CA3 do hipocampo (Fig. 30A e 30C). Esse mesmo efeito foi observado na quantificação total do hipocampo (Fig.30E). Os fatores dieta [(F(1,12)=20,05, $p \leq 0,05$)] e genótipo [(F(1,12)=21,59, $p \leq 0,05$)] foram os contribuintes para essas observações na sub-região CA3, sem ocorrer interação entre eles, revelados pela a análise estatística ANOVA de duas vias. Para a imunorreatividade da lectina no hipocampo total, os fatores dieta [(F(1,12)=15052, $p \leq 0,05$)] e genótipo [(F(1,12)=17,93, $p \leq 0,05$)] foram os contribuintes para os efeitos observados, revelados pela análise de ANOVA de duas vias.

Observamos que a ingestão de DC foi capaz de alterar a integridade da BHE nos camundongos NTg evidenciada pelo aumento na imunorreatividade para AQP-4 na sub-região CA3 do hipocampo. Já os camundongos 3xTg-DA apresentaram uma alteração na sub-região CA1 do hipocampo, evidência também pelo aumento de imunorreatividade para AQP-4. Não podemos destacar que aparentemente a DC causou um aumento na imunorreatividade para AQP-4 nas 3 sub-regiões nos 3xTg-DA. Que juntamente com os efeitos observados na imunorreatividade para a lectina de tomate, o qual a DC induziu um aumento nos 3xTg-DA praticamente nas 3 regiões avaliadas. Dessa forma, sugerimos que uma DC causa uma perturbação na integridade da BHE de camundongos NTg e 3xTg-DA.

Figura 30. Os painéis (A) e (B) mostram imagens representativas de imunorreatividade para lectina de tomate nas regiões CA3 e CA1 respectivamente, do hipocampo de camundongos NTg + DN, NTg + DC, 3xTg-DA + DN e 3xTg-DA + DC. Barra de escala = 100 μ m. Para cada sub-região, a intensidade de fluorescência da imunorreatividade para lectina de tomate foi quantificada e plotada em gráficos de barras em (C) CA3 e (D) CA1 e hipocampo total (E). Os dados são expressos como média \pm SEM das médias de três a quatro animais por grupo. * $p < 0.05$ comparado com 3xTg-DA + DN.



6. DISCUSSÃO

Evidências clínicas e epidemiológicas vêm se acumulando nos últimos anos sobre uma maior susceptibilidade de indivíduos hipercolesterolêmicos a desenvolver a doença de Alzheimer (KIVIPELTO et al., 2001, 2005). Em roedores, estudos mostram que dietas enriquecidas com colesterol induzem alterações hipocâmpais e comprometimento de memória de curto e longo prazo (GRANHOLM et al., 2008; THIRUMANGALAKUDI et al., 2008; MOREIRA et al., 2014). Além disso, um dano neurovascular foi observado em camundongos selvagens induzido pelo colesterol dietético (ZECHARIAH et al., 2013), o qual foi similar aos 3xTG-DA (HOHSFIELD et al., 2014). No entanto, os mecanismos específicos pelos quais o colesterol dietético promove comprometimento neurovascular e cognitivo ainda estão mal compreendidos.

Neste estudo, utilizamos uma abordagem dietética (dieta enriquecida com 1,25% de colesterol e 20% de gordura saturada) para mimetizar um fator de risco ambiental (dieta hipercolesterolêmica) no desenvolvimento da doença de Alzheimer. Para este fim, avaliamos o impacto da ingestão de uma DC, durante 8 semanas, sobre a função cognitiva de camundongos NTg e 3xTg-DA e a relação com uma disfunção sináptica e mitocondrial, além de alterações na biodisponibilidade de NO e na BHE. Utilizamos um modelo triplo transgênico para DA (3xTg-DA) de forma a entender os efeitos de fatores de risco ambientais (DC) sobre o desenvolvimento da doença. Os camundongos 3xTg-DA, um modelo experimental da DA, apresentam comprometimento cognitivo logo aos 4 meses de idade (BILLINGS et al., 2005) e prejuízos de plasticidade sináptica aos 6 meses de idade (ODDO et al., 2003) e com alterações neurovasculares com 14 meses de idade (HOHSFIELD et al., 2014).

Surpreendentemente, a maior contribuição deste estudo foi demonstrar que os animais NTg, sem qualquer modificação genética que predisponha à DA, quando alimentados por 8 semanas com DC desenvolveram hipercolesterolemia moderada (aumento de 10% nos níveis plasmáticos de colesterol) e apresentaram prejuízos de memória espacial de curta duração nos testes de reconhecimento de objeto e no labirinto de forma de Y-modificado. As alterações nos testes comportamentais foram semelhantes às aquelas por nós verificadas e já descritas para os camundongos 3xTg-DA, nos quais não observamos uma exacerbação das alterações comportamentais pela dieta. Além disso, o comprometimento cognitivo desencadeado pela dieta DC nos

NTg foi acompanhado de uma diminuição na LTP, na $[\text{NO}]_{\text{max}}$ e no consumo de oxigênio mitocondrial e por alterações na integridade da BHE. Por outro lado, além de não verificarmos intensificação do comprometimento cognitivo nos animais 3xTg-DA, nossos resultados revelaram que a ingestão da DC induziu hipercolesterolemia grave (cerca de 50% de aumento), comprometimento da respiração mitocondrial em fatias de hipocampo e alterações na integridade da BHE. Estes resultados sugerem que os animais 3xTG-DA são mais susceptíveis à hipercolesterolemia induzida por dieta que os animais NTg. Essa maior susceptibilidade pode estar relacionada ao modelo 3xTG-DA, que apresenta diversas manifestações de doenças sistêmicas, com doenças autoimune e inflamatórias, e evidenciada hepatomegalia (MARCHESE et al., 2014). Portanto, essa hepatomegalia poderia causar uma maior dificuldade em metabolizar os lipídeos dietéticos no fígado favorecendo a hipercolesterolemia nos 3xTG-DA. Notavelmente, não observamos diferenças entre os grupos no ganho de peso corporal após as 8 semanas de tratamento. Em um estudo anterior de nosso grupo, mostramos que camundongos Swiss alimentados com a mesma dieta e pelo mesmo período, apresentaram hipercolesterolemia sem ganho de peso corporal (MOREIRA et al., 2014). Além disso, estudos mostram que camundongos C57BL/6 somente ganham peso com dietas até 20% de gordura se o tratamento iniciar logo após o desmame (HWANG et al., 2010).

Interessantemente, nossos resultados mostram um aumento na atividade locomotora de camundongos NTg + DC. Um aumento na distância total percorrida no campo aberto já foi evidenciado por nosso grupo de pesquisa em camundongos hipercolesterolêmicos induzidos por manipulação genética ($\text{LDLr}^{-/-}$) (MOREIRA et al., 2012) e essa hiperlocomotoção foi associada à ausência de função do receptor de LDL-c (ELDER et al., 2008). Por outro lado, aqui nessa tese, nossos dados mostram a primeira evidência da literatura de aumento da atividade locomotora em camundongos NTg induzido por uma dieta rica em colesterol. Recentemente, Strekalova e colaboradores mostraram que C57BL/6 após alimentados com dieta enriquecida com 0,2% de colesterol apresentaram um aumento na velocidade média horizontal (STREKALOVA et al., 2015), que corrobora nossos achados. Além disso, essa alteração na locomoção dos animais pode estar relacionada a uma falta de habituação no campo aberto.

Nós também avaliamos o comportamento exploratório dos grupos e observamos que os camundongos NTg + DC apresentaram um comportamento diferente daquele grupo que recebeu uma dieta normal e

muito semelhante aos camundongos 3xTg-DA. Nós observamos que a DC induziu uma diminuição no levantamento vertical nos NTg similar aos 3xTg-DA. Além disso, observamos que a DC causou um aumento no tempo e no número de entrada no braço aberto do labirinto elevado em forma cruz nos camundongos NTg, e essa alteração observada no LCE são também observadas em animais com lesão na região ventral do hipocampo (KJELSTRUP et al., 2002). O hipocampo ventral e a amígdala são estruturas corticais relacionadas a comportamentos aversivos (BANNERMAN et al., 2004; MCHUGH et al., 2004). Ao analisamos os 3xTg-DA, independente do tratamento, não observamos nenhuma diferença na locomoção total, porém com um comportamento exploratório limitado, avaliado pela falta de habituação ao campo aberto, redução no levantamento vertical e um aumento no tempo de imobilidade. Estes resultados estão de acordo com o declínio no desempenho cognitivo dos camundongos 3xTg-DA de 18 meses de idade, em estudo publicado recentemente (ROMANO et al., 2015).

Como anteriormente mencionado, nosso grupo de pesquisa demonstrou que camundongos Swiss alimentados com uma DC apresentaram prejuízo na memória espacial de curta duração avaliada no teste de realocação de objetos (MOREIRA et al., 2014). Neste estudo, nós estendemos essas observações para avaliar o efeito da DC sobre a memória espacial de curta duração avaliada no teste de reconhecimento de objeto e na preferência pela novidade. Estes dois testes necessitam em parte das circuitarias hipocampais funcionais, e também da ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA na sub-região CA1 do hipocampo (MUMBY et al., 1996; NIU et al., 2009; WARBURTON et al., 2013). Além disso, o hipocampo é fundamental para a organização espacial dos braços no Y-M e dos objetos no teste do reconhecimento do objeto (BURES et al., 1997; PETIT et al., 2011). Nossos resultados mostram a primeira evidência de que camundongos NTg alimentados com dieta com alto teor de colesterol e 3xTg-DA (independente do tratamento) não apresentaram a capacidade de discriminar entre diferentes localizações espaciais no labirinto em forma de Y. Em concordância com esses dados, observamos que a dieta induziu uma deterioração na memória de reconhecimento de objeto nos NTg similar ao observado no 3xTg-DA. Portanto, enquanto que camundongos normais (NTg + DN) são capazes de preferencialmente explorar um local novo e/ou um objeto novo por mais tempo que um local ou objeto familiar, os camundongos NTg + DC e 3xTg-DA (independente da dieta) falham em apresentar uma memória de curto prazo, que em partes é dependente do hipocampo, para localização e objetos familiares.

Por outro lado, ao avaliarmos o efeito da DC na memória de trabalho no teste do labirinto aquático, observamos que somente os animais 3xTg-DA apresentaram prejuízos, e que a DC nada influenciou. Nesse paradigma, os camundongos são treinados para encontrar a plataforma em 8 seções seguidas com intervalos de 5 minutos entre as seções, que caracteriza a memória de trabalho ou de procedimentos. Animais com lesões hipocampais falham em encontrar a plataforma (LACROIX et al., 2002; SCHMITT et al., 2003). Porém nesta tarefa exclusivamente, os animais são obrigados a lembrar a cada seção onde está a plataforma e assim alcançá-la mais rapidamente, diminuindo o tempo de latência, e é exatamente o que ocorre com os animais NTg (independente da dieta) que a cada nova seção reduzem o tempo de latência. Além disso, Xie e colaboradores mostraram que o colesterol dietético não alterou a performance no teste do labirinto aquático após 7 seções consecutivas em camundongos diabéticos (XIE; DU, 2005). Ademais, camundongos hipercolesterolêmicos, por manipulação genética, e camundongos selvagens quando alimentados com uma dieta rica em colesterol apresentam perfis similares na mesma tarefa após 8 seções de treino (ELDER et al., 2008).

Nossos resultados nos permitem supor que os efeitos observados na memória espacial de curto prazo de camundongos NTg + DC somente no labirinto em forma de Y modificado e na tarefa RO (alternância espacial), juntamente com o aumento da atividade locomotora em campo aberto e LEC, podem ser devido à falta de habituação espacial. Ou seja, a memória espacial de curto prazo dependente do hipocampo, resultante da habituação a locais espaciais familiares, não é formada corretamente e, portanto, leva a uma redução na tendência de explorar um novo braço ou novo objeto (SANDERSON; BANNERMAN, 2012). A exposição aos braços do aparato e a objetos familiares na fase de treino resultou na habituação da exploração espacial, então, os animais devem mostrar uma maior preferência para explorar o novo braço e objeto em relação ao familiar, indicando assim que a exploração do objeto e do braço familiar foi habituada. Por outro lado, o desempenho das tarefas do labirinto aquático depende da manutenção ativa e da manipulação de informações em cada seção para que os camundongos possam chegar à plataforma, caso contrário os animais não aprendem a tarefa (DUDA et al., 2016). Um estudo de Vöika e colaboradores corroboram essa informação. Os autores utilizaram um modelo de doença do tipo C de Niemann-Pick, uma desordem autossômica recessiva que resulta em uma deterioração progressiva do sistema nervoso central, devido a uma alteração na homeostase de colesterol

intracelular, o qual é acumulado em endossomas causando neurotoxicidade. Eles demonstraram que estes animais apresentam uma diminuição no comportamento exploratório e falta de habituação ao campo aberto, no entanto, estes camundongos são capazes de aprender a localizar a plataforma na tarefa do labirinto aquático (VÕIKAR et al., 2002).

Tomados em conjuntos, nossos resultados reforçam a hipótese de que fatores ambientais que alteram os níveis plasmáticos de colesterol, com a DC, contribuem significativamente para disfunções cognitivas em camundongos NTg as quais são similares àquelas observadas no modelo 3xTg-DA.

Os mecanismos exatos subjacentes às deficiências cognitivas dependentes da formação hipocampal e a associação com colesterol dietético são ainda desconhecidos. Os neurônios, tais como todas as outras células do corpo, possuem um fornecimento contínuo de colesterol não esterificado, quer a partir da síntese de novo intracelular ou da absorção de colesterol a partir do ambiente extracelular utilizando ligantes específicos tais como a apolipoproteína E (apoE)(LEONI et al., 2010). De forma interessante, indivíduos que possuem o alelo 4 da apoE (apoE-4) apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento da DA (CORDER et al., 1993; EVANS et al., 2000; CHEN et al., 2011), assim, este achado seria o primeiro elo entre o metabolismo de colesterol e o seu envolvimento com a DA (PUGLIELLI et al., 2003; CARTER, 2007; ALTMAN; RUTLEDGE, 2010b).

A plasticidade sináptica é o processo biológico pelo qual padrões específicos de atividade sináptica resultam em mudanças na eficácia da comunicação entre os neurônios. A LTP é uma forma de plasticidade sináptica encontrada em sinapses excitatórias nos encéfalos de mamíferos e é um dos mecanismos fisiológicos importantes para a aprendizagem e memória (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; LYNCH, 2004). Além disso, a LTP é dependente da unidade neurovascular funcional para fornecer oxigênio e metabolitos adequados (LICHT et al., 2011) Aqui, nós avaliamos por métodos de eletrofisiologia se a DC é capaz de induzir alterações de transmissão sináptica e plasticidade em camundongos NTg e 3xTg-DA. Pela primeira vez, observou-se uma diminuição da plasticidade sináptica em camundongos NTg alimentados com DC, que foi similar ao grupo 3xTg-DA. Podemos sugerir que este resultado está de acordo com um declínio de proteínas importantes para a formação de espinhos dendritos como a debrina, e a proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD95, do inglês postsynaptic density protein 95), que foram diminuídas em camundongos C57BL/6 após 8

semanas de tratamento com DC (BHAT; THIRUMANGALAKUDI, 2013). Por outro lado, com a avaliação da transmissão sináptica basal por meio do protocolo de facilitação de pulso pareado, que é principalmente dependente do tratamento pré-sináptico do cálcio (COLLIN et al., 2005), verificamos que apenas os animais 3xTg-DA (independentemente do tratamento) apresentaram comprometimento, estando de acordo com ODDO e colaboradores (ODDO et al., 2003).

Estudamos também os efeitos da DC na dinâmica da concentração de $\cdot\text{NO}$, que foi realizada com uma resolução espacial elevada no *stratum pyramidale* da sub-região CA1 do hipocampo. A produção de $\cdot\text{NO}$ nos neurônios, pela óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), está intimamente ligada à ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA (NMDAr, do inglês N-methyl-D-aspartate receptor) (GARTHWAITE, 2008) e atua principalmente como um mensageiro intra e intercelular. Devido a suas características, o $\cdot\text{NO}$ é capaz de se difundir rapidamente e influencia todas as moléculas nas células-alvo sensíveis a este radical. Dentre elas, o alvo principal é a guanilato ciclase solúvel (GCs) e a via de sinalização $\cdot\text{NO}/\text{GCs}/\text{GMPc}$ (guanosina monofosfato cíclico) desempenha um papel na memória e nos processos de aprendizagem, bem como na LTP (PRAST; PHILIPPU, 2001). De fato, alterações dependentes da idade na produção de $\cdot\text{NO}$ nos neurônios podem desempenhar um papel significativo no declínio das funções sinápticas e metabólicas na DA (LAW et al., 2001; CHAKROBORTY et al., 2015). Portanto, e de acordo com as alterações na LTP, nossos resultados mostraram uma diminuição na concentração máxima de $\cdot\text{NO}$ no hipocampo induzida pela DC em ambos os genótipos. Devido a importância do $\cdot\text{NO}$ para a manutenção do LTP e para o acoplamento neurovascular, podemos sugerir que essa diminuição da biodisponibilidade de $\cdot\text{NO}$ na fenda sináptica, bem como nos microvasos, podem contribuir para os prejuízos observados nos animais NTg + DC. Em relação aos camundongos 3xTg-DA, o nosso grupo de pesquisa mostrou que aos 3 a 6 meses de idade estes animais exibem um aumento na concentração máxima de $\cdot\text{NO}$ (DIAS et al., 2016), e que aqui, nós observamos que os animais 3xTg-DA apresentam níveis semelhantes aos do controle NTg. Isto sugere que os animais transgênicos apresentam mecanismos compensatórios, tais como o aumento da expressão da NOSn (DIAS et al., 2016), no início do desenvolvimento até aos 3 meses de idade, que interessantemente, são capazes de manter intactas as funções sinápticas e a cognitivas (ODDO et al., 2003). A partir dos 3 meses, estudos demonstram o início dos danos cognitivos, acompanhados pela formação das placas senis,

comprometimento na LTP e neuroinflamação (ODDO et al., 2003; STERNICZUK et al., 2010; STOVER et al., 2015), e nós corroboramos esses dados, demonstrando que com 6 meses os animais 3xTg-DA apresentam $[\text{NO}]_{\text{max}}$ similar aos NTg e que a DC diminuiu ainda mais esses valores.

Os neurônios dependem criticamente da função mitocondrial para executar os processos complexos de neurotransmissão e plasticidade sináptica (KANN; KOVÁCS, 2007). Portanto, a disfunção dessa organela desempenha um papel central na patogênese de distúrbios neurodegenerativos, incluindo a DA associadas a disfunção vascular (GU et al., 2012). Em nosso estudo, verificamos que a ingestão da dieta com alto teor de colesterol causou modificações nos parâmetros respirométricos em ambos os genótipos (NTg e 3xTg-DA), caracterizando o processo de disfunção mitocondrial hipocampal associada à hipercolesterolemia. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que os camundongos NTg e 3xTg-DA apresentam diminuição na fosforilação oxidativa no hipocampo aos 12 meses de idade (DIAS et al., 2016). Além disso, a DC causou uma diminuição na capacidade de reserva mitocondrial somente nos animais NTg. A capacidade de reserva é um dos mecanismos mais importante de defesa celular (YADAVA; NICHOLLS, 2007). A ativação do NMDAr impõe uma carga elevada de consumo de ATP ao neurônio, o que se reflete em uma taxa aumentada no consumo de oxigênio mitocondrial *in situ* (JEKABSONS; NICHOLLS, 2004). No entanto, se o ATP não for produzido em quantidade suficiente pode ocorrer excitotoxicidade, um dos mecanismos chaves de neurodegeneração (COWBURN et al., 1990; BUTTERFIELD; POCERNICH, 2003). Portanto, o tecido tem capacidade de reserva mitocondrial para responder adequadamente a situações de aumento da demanda de energia ou em resposta ao dano oxidativo (YADAVA; NICHOLLS, 2007), assim o comprometimento deste mecanismo está associado a uma série de patologias que afetam os tecidos que exigem alta demanda energética, como o SNC (NICHOLLS, 2008; DESLER et al., 2012). Nossos resultados não mostraram efeito da DC sobre o consumo de oxigênio dependente da produção de ATP em ambos os genótipos, sugerindo que, o tecido utiliza de outros mecanismos, como o esgotamento da capacidade de reserva para manter a síntese de ATP.

Para manter uma atividade neuronal normal e o suprimento adequado de ATP, as células necessitam de substratos transportados pelo fluxo sanguíneo (IADECOLA, 2004) e os mecanismos que acoplam a atividade neuronal ao FSC são chamados de acoplamento neurovascular

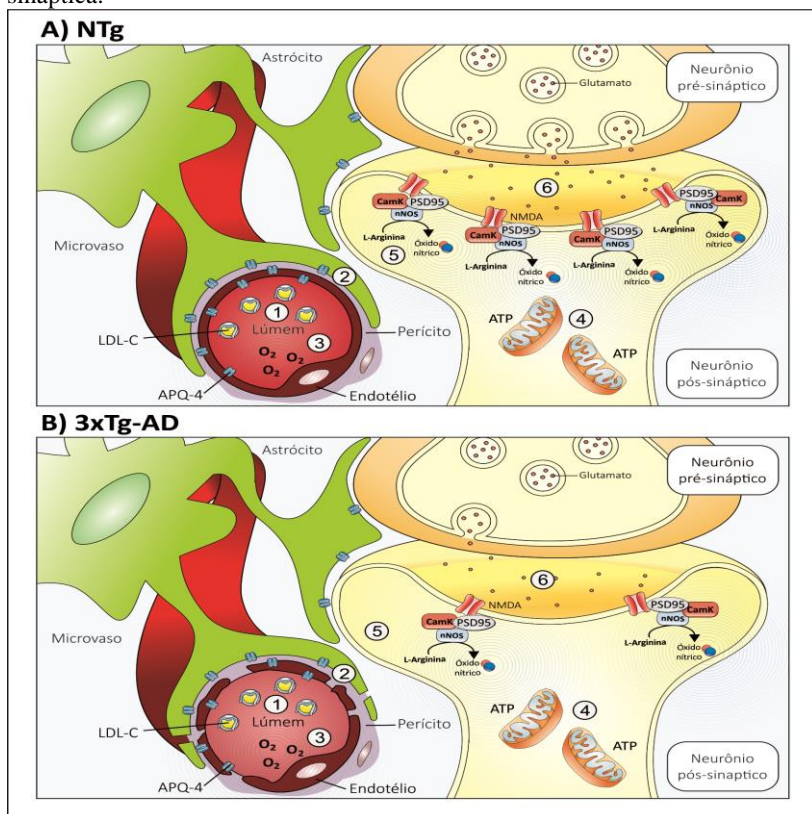
(ATTWELL et al., 2010). Para esse fim, requer-se que a unidade neurovascular esteja intacta, atuando como um regulador dinâmico do balanço iônico, um facilitador do transporte de nutrientes e uma barreira para moléculas potencialmente nocivas (HAWKINS; DAVIS, 2005). Neste sentido, estudos mostram que as alterações cerebrais microvasculares podem contribuir para o declínio das funções cognitivas (JAYA PRASANTHI et al., 2008; OLIVEIRA, DE et al., 2014). Além disso, tem sido documentado que a ativação vascular e angiogênese são reguladas positivamente em microvasos cerebrais derivados de DA (GRAMMAS et al., 2011).

Nossos resultados mostraram que os camundongos 3xTg-AD exibiram um aumento na imunorreatividade para a AQP-4 no hipocampo e um aumento aparente na imunorreatividade para a lectina de tomate, que pode estar associada à patologia vascular da DA (LA TORRE, DE, 2002). Alta densidade de AQP-4 é encontrada nos processos astrocíticos envolvendo as células endoteliais, e sinais de ruptura de BHE coincidem com a forte indução de mRNA de AQP-4 (TOMÁS-CAMARDIEL et al., 2005). Outro componente importante da BHE são as junções oclusivas (TJs, do inglês tight junctions) endoteliais, que exibem propriedade fundamental de limitar o movimento intercelular de solutos, íons e água (SANDOVAL; WITT, 2008). As TJs são localizadas nos microdomínios da membrana enriquecida com colesterol (Lipid Rafts) (NUSRAT et al., 2000), portanto, alterações na composição de colesterol nos *lipid rafts*, devido a um colapso na homeostase do colesterol podem perturbar as composição das TJs e aumentar a permeabilidade da BHE (TAKECHI, R et al., 2013; TAKECHI, RYUSUKE et al., 2013; MORGAN et al., 2014). Esta perturbação nos *lipid rafts* e consequente comprometimento da BHE, pode ser o mecanismo pelo qual a DC induziu um aumento na imunorreatividade a AQP-4 no hipocampo dos animais NTg + DC e na imunorreatividade para a lectina de tomate no hipocampo do grupo 3xTg-DA.

Uma visão esquemática dos principais achados dessa tese está ilustrada na Fig. 31. O painel A ilustra os efeitos da DC (numeração de 1 a 6) nos camundongos NTg. Resumidamente, a DC induziu um aumento nos níveis plasmáticos de colesterol após 8 semanas de tratamento (1). Em seguida, a DC causou uma perturbação na BHE (2) alterando sua homeostase. A DC causou uma redução no consumo de oxigênio mitocondrial (3), induzindo disfunção mitocondrial. A disfunção mitocondrial (4) prejudica a atividade neuronal. Além disso, a DC através da redução na produção de NO (5) e danos de plasticidade

sináptica (6) provocaram prejuízos de memória e cognição nos camundongos NTg. Já nos camundongos 3xTg-DA representados no painel B, os efeitos da DC (representada pelos números), demonstram que não houve uma intensificação nos prejuízos já conhecidos de função sináptica e cognitiva (6) nesses animais. Além disso, a ingestão de DC provocou uma redução na produção de NO (5) acompanhada de uma diminuição no consumo de oxigênio mitocondrial (3), caracterizando disfunção mitocondrial (4). Observamos também uma alteração na integridade da BHE induzida pela dieta nas fatias hipocâmpais dos 3xTg-DA (2) e severa hipercolesterolemia (1).

Figura 31. Esquema representativo dos principais efeitos da DC em camundongos NTg (A) e em 3xTg-DA (B). (1) Hipercolesterolemia, (2) perturbação na BHE, (3) redução no consumo de oxigênio (4) disfunção mitocondrial, (5) alteração na biodisponibilidade do NO e (6) disfunção sináptica.



Nesse trabalho de doutorado observamos experimentalmente que a hipercolesterolemia induzida por dieta alimentar está associada a uma disfunção cognitiva em animais não transgênicos que foi acompanhada por uma disfunção sináptica e neurovascular similares aquelas observadas em um modelo de Alzheimer familiar. Os achados deste trabalho reforçam a associação dos fatores de risco relacionado as doenças cardiovasculares, como dieta rica em colesterol/gordura, à patofisiologia da doença de Alzheimer. Finalmente nos leva a pensar na melhoria na qualidade alimentícia da sociedade para diminuir os problemas relacionadas aos prejuízos cognitivos.

7. CONCLUSÕES PONTUAIS

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

- A ingestão de DC por 8 semanas induziu hipercolesterolemia em camundongos NTg e 3xTg-DA.
- Camundongos NTg que receberam a DC apresentou prejuízos cognitivos semelhantes aos 3xTg-DA.
- Camundongos 3xTg-DA apresentaram comprometimentos cognitivos e sinápticos que não foram exacerbados pela ingestão de DC.
- A ingestão de DC induziu prejuízo na plasticidade sináptica em camundongos NTg semelhante aos 3xTg-DA.
- A biodisponibilidade de ¹⁴C-NO hipocampal nos camundongos NTg e 3xTg-DA foi prejudicada pela ingestão de DC.
- A ingestão de DC induziu uma disfunção mitocondrial no hipocampo de ambos os camundongos NTg e 3xT-DA
- A integridade da BHE no hipocampo foi alterada pela ingestão de DC em camundongos NTg e 3xTg-DA.

Referências Bibliográficas

- AARSLAND, D.; SARDAHAEE, F. S.; ANDERSSSEN, S.; BALLARD, C. Is physical activity a potential preventive factor for vascular dementia? A systematic review. **Aging & mental health**, v. 14, n. 4, p. 386–95, 2010.
- AGGLETON, J. P.; BROWN, M. W.; WAN, H. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. **J Neurosci**, v. 19, n. 3, p. 1142–1148, 1999.
- AGUIAR, A. S.; CASTRO, A. A.; MOREIRA, E. L.; et al. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 11–12, p. 560–567, 2011.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 2001.
- ALTMAN, R.; RUTLEDGE, J. C. The vascular contribution to Alzheimer's disease. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 119, n. 10, p. 407–21, 2010a.
- ALTMAN, R.; RUTLEDGE, J. C. The vascular contribution to Alzheimer's disease. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 119, n. 10, p. 407–21, 2010b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2950620&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, p. 110 –133., 2013. Disponível em: <http://www.alz.org/alzheimers_disease_facts_and_figures.asp#quickFacts>. .
- AMOÊDO, N. D.; RODRIGUES, M. F.; PEZZUTO, P.; et al. Energy metabolism in H460 lung cancer cells: Effects of histone deacetylase inhibitors. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.
- ANDERSON, W. W.; COLLINGRIDGE, G. L. The LTP Program: A data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 108, n. 1, p. 71–83, 2001.
- ANTUNES, F.; BOVERIS, A.; CADENAS, E. On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 48, p. 16774–16779, 2004.
- ARMSTRONG, R. A. What causes alzheimer's disease? **Folia**

neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, v. 51, n. 3, p. 169–88, 2013.

ATTWELL, D.; BUCHAN, A. M.; CHARPAK, S.; et al. Glial and neuronal control of brain blood flow. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 232–43, 2010.

BADDELEY, A. Working memory. **Science**, v. 255, n. 5044, p. 556–559, 1992.

BADDELEY, A. Working memory. **Current biology : CB**, v. 20, n. 4, p. R136-40, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982209021332>> . .

BALIN, B. J.; HUDSON, A. P. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. **Current allergy and asthma reports**, 2014.

BALOYANNIS, S. J. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 9, n. 2, p. 119–126, 2006.

BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N. P.; MCHUGH, S. B.; et al. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, n. 3, p. 273–83, 2004.

BASTIAANSE, E. The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. **Cardiovascular Research**, v. 33, n. 2, p. 272–283, 1997. Disponível em: <<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/33/2/272.long>> . .

BERTRAM, L.; TANZI, R. E. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 10, p. 768–78, 2008.

BHAT, N. R.; THIRUMANGALAKUDI, L. Increased tau phosphorylation and impaired brain insulin/IGF signaling in mice fed a high fat/high cholesterol diet. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 36, n. 4, p. 781–789, 2013.

BILLINGS, L. M.; ODDO, S.; GREEN, K. N.; MCGAUGH, J. L.; LAFERLA, F. M. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. **Neuron**, 2005.

BIRD, C. M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 182–194, 2008.

BJÖRKHEM, I. Crossing the barrier: Oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. **Journal of Internal Medicine**, 2006.

BLENNOW, K.; LEON, M. J. DE; ZETTERBERG, H. Alzheimer's

disease. **Lancet**, 2006.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 1993.

BLISS, T. V.; GARDNER-MEDWIN, A. R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of physiology**, v. 232, n. 2, p. 357–74, 1973.

BOAK, L.; CHIN-DUSTING, J. P. F. Hypercholesterolemia and endothelium dysfunction: role of dietary supplementation as vascular protective agents. **Current vascular pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 45–52, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15320832>> .

BOYLE, J. Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, n. 1, p. 74–75, 2005.

BROOKS, S. W.; DYKES, A. C.; SCHREURS, B. G. A High-Cholesterol Diet Increases 27-Hydroxycholesterol and Modifies Estrogen Receptor Expression and Neurodegeneration in Rabbit Hippocampus. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 56, n. 1, p. 185–196, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27911307>%0Ahttp://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-160725> .

BROWN, A. J.; JESSUP, W. Oxysterols and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 1999.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. **Journal of Clinical Investigation**, 1983.

BURES, J.; FENTON, A. A.; KAMINSKY, Y.; ZINYUK, L. Place cells and place navigation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 1, p. 343–50, 1997.

BURG, J. S.; ESPENSHADE, P. J. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. **Progress in Lipid Research**, 2011.

BURGER, K.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Regulation of receptor function by cholesterol. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 57, p. 1577–1592, 2000.

BUTTERFIELD, D. A.; POCERNICH, C. B. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: Therapeutic implications. **CNS Drugs**, 2003.

CARD, S. **The Hippocampus book**. 2007.

CARMIGNOTO, G.; GÓMEZ-GONZALO, M. The contribution of

astrocyte signalling to neurovascular coupling. **Brain Research Reviews**, 2010.

CARTER, C. J. Convergence of genes implicated in Alzheimer's disease on the cerebral cholesterol shuttle: APP, cholesterol, lipoproteins, and atherosclerosis. **Neurochemistry International**, 2007.

CASPERSEN, C. Mitochondrial A : a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 14, p. 2040–1, 2005.

CHAKROBORTY, S.; KIM, J.; SCHNEIDER, C.; WEST, A. R.; STUTZMANN, G. E. Nitric Oxide Signaling Is Recruited As a Compensatory Mechanism for Sustaining Synaptic Plasticity in Alzheimer's Disease Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 17, p. 6893–6902, 2015.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Bioquímica Ilustrada. **Uma ética para quantos?**, v. XXXIII, n. 2, p. 544, 2006.

CHEN, H.-K.; JI, Z.-S.; DODSON, S. E.; et al. Apolipoprotein E4 domain interaction mediates detrimental effects on mitochondria and is a potential therapeutic target for Alzheimer disease. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 7, p. 5215–21, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3037634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/5/2013.

CHEN, X.; GAWRYLUK, J. W.; WAGENER, J. F.; GHRIBI, O.; GEIGER, J. D. Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer's disease. **Journal of neuroinflammation**, v. 5, p. 12, 2008.

CHEN, X.; WAGENER, J. F.; MORGAN, D. H.; et al. Endolysosome mechanisms associated with Alzheimer's disease-like pathology in rabbits ingesting cholesterol-enriched diet. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 22, n. 4, p. 1289–1303, 2010.

COLLIN, T.; MARTY, A.; LLANO, I. Presynaptic calcium stores and synaptic transmission. **Current Opinion in Neurobiology**, 2005.

COOKE, S. F.; BLISS, T. V. P. Plasticity in the human central nervous system. **Brain : a journal of neurology**, v. 129, n. Pt 7, p. 1659–73, 2006.

CORDER, E. H.; SAUNDERS, A. M.; STRITTMATTER, W. J.; et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science (New York, N.Y.)**, v. 261, n. 5123, p. 921–923, 1993.

COWBURN, R. F.; HARDY, J. A.; ROBERTS, P. J. Glutamatergic neurotransmission in Alzheimer's disease. **Biochem.Soc.Trans.**, v. 18, n. 0300–5127, p. 390–392, 1990.

- D.A., D. Alzheimer's disease and vascular dementia: One potentially preventable and modifiable disease? Part II: Management, prevention and future perspective. **Neurodegenerative Disease Management**, v. 4, n. 3, p. 261–270, 2014. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/loi/nmt%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=2014529677>>. .
- DAM, D. VAN; DEYN, P. P. DE. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. **British Journal of Pharmacology**, 2011.
- DATA, W. L. C.-P. WHO. **Igarss 2014**, , n. 1, p. 1–65, 2014.
- DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 339–50, 2010.
- DESLER, C.; HANSEN, T. L.; FREDERIKSEN, J. B.; et al. Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging? **Journal of Aging Research**, 2012.
- DEVONSHIRE, I. M.; PAPADAKIS, N. G.; PORT, M.; et al. Neurovascular coupling is brain region-dependent. **NeuroImage**, v. 59, n. 3, p. 1997–2006, 2012.
- DIAS, C.; LOURENÇO, C. F.; FERREIRO, E.; et al. Age-dependent changes in the glutamate-nitric oxide pathway in the hippocampus of the triple transgenic model of Alzheimer's disease: implications for neurometabolic regulation. **Neurobiology of Aging**, v. 46, p. 84–95, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.06.012>>. .
- DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Cholesterol metabolism in the brain. **Current Opinion in Lipidology**, v. 12, n. 2, p. 105–112, 2001.
- DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D.; SPADY, D. K. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. **Journal of lipid research**, v. 34, n. 10, p. 1637–1659, 1993.
- DIÓGENES, M. J.; FERNANDES, C. C.; SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 12, p. 2905–2913, 2004.
- DO, T. M.; ALATA, W.; DODACKI, A.; et al. Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**,

v. 81, p. 311–317, 2014.

DUDA, W.; WESIERSKA, M.; OSTASZEWSKI, P.; et al. MK-801 and memantine act differently on short-term memory tested with different time-intervals in the Morris water maze test. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p. 15–23, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432816302996>>. .

DUDCHENKO, P. A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **Anais...** v. 28, p.699–709, 2004.

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

ETCHEBERRIGARAY, R.; IBARRETA, D. [Ionic channels and second messenger alterations in Alzheimer's disease. Relevance of studies in nonneuronal cells]. **Rev Neurol**, v. 33, n. 8, p. 740–749, 2001.

EVANS, R. M.; EMSLEY, C. L.; GAO, S.; et al. Serum cholesterol, APOE genotype, and the risk of Alzheimer's disease: A population-based study of African Americans. **Neurology**, v. 54, n. 1, p. 240–242, 2000.

FALLIS, A. . The Hippocampus as a Cognitive Map. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

FERNANDEZ, A.; LLACUNA, L.; FERNANDEZ-CHECA, J. C.; et al. Mitochondrial Cholesterol Loading Exacerbates Amyloid Peptide-Induced Inflammation and Neurotoxicity. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 20, p. 6394–6405, 2009.

GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **European Journal of Neuroscience**, 2008.

GHRIBI, O.; LARSEN, B.; SCHRAG, M.; HERMAN, M. M. High cholesterol content in neurons increases BACE, β -amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. **Experimental Neurology**, v. 200, n. 2, p. 460–467, 2006.

GNAIGER, E. High-Resolution Respirometry The Oxygraph for High-Resolution Respirometry. **Mitochondr Physiol Network**, v. 6.1, p. 1–19, 2007.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, p. 425–430, 1990.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 4, p. 431–438, 2009.

GORELICK, P. B.; SCUTERI, A.; BLACK, S. E.; et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: A statement for healthcare professionals from the American Heart

- Association/American Stroke Association. **Stroke**, 2011.
- GOTTO, A. M. Cholesterol management in theory and practice. **Circulation**, v. 96, n. 12, p. 4424–4430, 1997.
- GRAMMAS, P.; SANCHEZ, A.; TRIPATHY, D.; LUO, E.; MARTINEZ, J. Vascular signaling abnormalities in Alzheimer disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 78, n. SUPPL. 1, 2011.
- GRANHOLM, A.-C.; BIMONTE-NELSON, H. A.; MOORE, A. B.; et al. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 14, n. 2, p. 133–45, 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2670571&ool=pmcentrez&rendertype=abstract>. .
- GRAY, N. E.; SAMPATH, H.; ZWEIG, J. A.; QUINN, J. F.; SOUMYANATH, A. Centella asiatica Attenuates Amyloid-beta-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 45, n. 3, p. 933–946, 2015.
- GROULEFF, J.; IRUDAYAM, S. J.; SKEBY, K. K.; SCHIØTT, B. The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1848, n. 9, p. 1783–1795, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.029> %5Cn<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527361500108X>>. .
- GU, X. M.; HUANG, H. C.; JIANG, Z. F. Mitochondrial dysfunction and cellular metabolic deficiency in Alzheimer's disease. **Neuroscience Bulletin**, 2012.
- HAMEL, E.; ROYEA, J.; ONGALI, B.; TONG, X. K. Neurovascular and Cognitive failure in Alzheimer's Disease: Benefits of Cardiovascular Therapy. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2016.
- HAN, S.; JIAO, J.; ZHANG, W.; et al. Dietary fiber prevents obesity-related liver lipotoxicity by modulating sterol-regulatory element binding protein pathway in C57BL/6J mice fed a high-fat/cholesterol diet. **Sci Rep**, v. 5, p. 15256, 2015.
- HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 16, p. 1685–1695, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843671>>. .
- HANSSON, G. K.; HERMANSSON, A. The immune system in atherosclerosis. **Nature immunology**, v. 12, n. 3, p. 204–12, 2011. Nature Publishing Group. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321594>>. Acesso em: 30/5/2013.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 256, n. 5054, p. 184–5, 1992.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. **Science**, v. 297, n. July, p. 353–357, 2002.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 2, p. 173–85, 2005.

HEVERIN, M.; MAIOLI, S.; PHAM, T.; et al. 27-Hydroxycholesterol mediates negative effects of dietary cholesterol on cognition in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 278, p. 356–359, 2014.

HEVERIN, M.; MEANEY, S.; LUTJOHANN, D.; et al. Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. **J Lipid Res**, v. 46, n. 5, p. 1047–1052, 2005.

HOHSFIELD, L. A.; DASCHIL, N.; ORÄDD, G.; STRÖMBERG, I.; HUMPEL, C. Vascular pathology of 20-month-old hypercholesterolemia mice in comparison to triple-transgenic and APPSwDI Alzheimer's disease mouse models. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 63, p. 83–95, 2014.

HUTTNER, W. B.; ZIMMERBERG, J. Implications of lipid microdomains for membrane curvature, budding and fission: Commentary. **Current Opinion in Cell Biology**, 2001.

HUYNH, T. VAN; COLE, G.; KATZMAN, R.; HUANG, K. P.; SAITOH, T. Reduced protein kinase C immunoreactivity and altered protein phosphorylation in Alzheimer's disease fibroblasts. **Archives of neurology**, v. 46, n. 11, p. 1195–9, 1989.

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

IADECOLA, C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? **Trends in neurosciences**, v. 16, n. 6, p. 206–14, 1993.

IADECOLA, C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 347–360, 2004.

ISHIBASHI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.; et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice

- and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 2, p. 883–93, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8349823>>5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC294927>. .
- JAYA PRASANTHI, R. P.; SCHOMMER, E.; THOMASSON, S.; et al. Regulation of beta-amyloid levels in the brain of cholesterol-fed rabbit, a model system for sporadic Alzheimer's disease. **Mech Ageing Dev**, v. 129, n. 11, p. 649–655, 2008.
- JEKABSONS, M. B.; NICHOLLS, D. G. In Situ respiration and bioenergetic status of mitochondria in primary cerebellar granule neuronal cultures exposed continuously to glutamate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32989–33000, 2004.
- JENKINS, T. A.; AMIN, E.; PEARCE, J. M.; BROWN, M. W.; AGGLETON, J. P. Novel spatial arrangements of familiar visual stimuli promote activity in the rat hippocampal formation but not the parahippocampal cortices: A c-fos expression study. **Neuroscience**, v. 124, n. 1, p. 43–52, 2004.
- JOHNSON, D. K.; WILKINS, C. H.; MORRIS, J. C. Accelerated weight loss may precede diagnosis in Alzheimer disease. **Archives of neurology**, v. 63, n. 9, p. 1312–7, 2006.
- KALARIA, R. N. Vascular basis for brain degeneration: Faltering controls and risk factors for dementia. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. SUPPL. 2, 2010.
- KALMIJN, S.; LAUNER, L. J.; OTT, A; et al. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. **Annals of neurology**, v. 42, n. 5, p. 776–782, 1997.
- KANE, J. P.; HARDMAN, D. A.; PAULUS, H. E. Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 5, p. 2465–2469, 1980.
- KANN, O.; KOVÁCS, R. Mitochondria and neuronal activity. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 292, n. 2, p. C641-57, 2007.
- KELLEHER, R. J.; SOIZA, R. L. Evidence of endothelial dysfunction in the development of Alzheimer's disease: Is Alzheimer's a vascular disorder? **Am J Cardiovasc Dis**, v. 3, n. 4, p. 197–226, 2013.
- KIVIPELTO, M.; HELKALA, E.; LAAKSO, M. P.; et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's Disease in later life: Longitudinal, population based study. **Bmj**, v. 322, n. June, p. 1447–1451, 2001.
- KIVIPELTO, M.; NGANDU, T.; FRATIGLIONI, L.; et al. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer

- disease. **Archives of neurology**, v. 62, n. 10, p. 1556–60, 2005.
- KJELSTRUP, K. G.; TUVNES, F. A.; STEFFENACH, H.-A.; et al. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10825–30, 2002.
- KONSTANTINOV, I. E.; MEJEVOI, N.; ANICHKOV, N. M. Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis. **Texas Heart Institute journal**, v. 33, n. 4, p. 417–23, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1764970&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
- KORCZYN, A. D.; VAKHAPOVA, V.; GRINBERG, L. T. Vascular dementia. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 322, n. 1–2, p. 2–10, 2012.
- KUHLENCORDT, P. J.; RÖLING, J.; HOFFMANN, U. [Cerebrovascular diseases]. **Der Internist**, v. 50, n. 8, p. 945–51, 2009.
- KUO, Y. M.; EMMERLING, M. R.; BISGAIER, C. L.; et al. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 252, n. 3, p. 711–5, 1998.
- LA TORRE, J. C. DE. Alzheimer disease as a vascular disorder: Nosological evidence. **Stroke**, v. 33, n. 4, p. 1152–1162, 2002.
- LA TORRE, J. C. DE. Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. **Lancet Neurology**, 2004.
- LA TORRE, J. C. DE. Vascular risk factor detection and control may prevent Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, 2010.
- LACROIX, L.; WHITE, I.; FELDON, J. Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. **Behavioural Brain Research**, v. 133, n. 1, p. 57–68, 2002.
- LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia: mechanisms, pathophysiological importance, and therapeutic interventions. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 26, n. 5, p. 529–37, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129409>>. .
- LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? **Circulation**, v. 109, n. 21 Suppl 1, p. II27-33, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173060>>. .
- LARRY R. SQUIRE. **Fundamental Neuroscience**. 2013.
- LAW, A.; GAUTHIER, S.; QUIRION, R. Say NO to Alzheimer's disease: The putative links between nitric oxide and dementia of the

- Alzheimer's type. **Brain Research Reviews**, 2001.
- LECERF, J.-M.; LORGERIL, M. DE. Dietary cholesterol: from physiology to cardiovascular risk. **The British journal of nutrition**, v. 106, n. 1, p. 6–14, 2011.
- LECRUX, C.; HAMEL, E. The neurovascular unit in brain function and disease. **Acta Physiologica**, 2011.
- LEDO, A.; BARBOSA, R. M.; GERHARDT, G. A.; CADENAS, E.; LARANJINHA, J. Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 48, p. 17483–17488, 2005.
- LEDO, A.; FRADE, J.; BARBOSA, R. M.; LARANJINHA, J. Nitric oxide in brain: Diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. **Molecular Aspects of Medicine**, 2004.
- LEE, M. K.; BORCHELT, D. R.; WONG, P. C.; SISODIA, S. S.; PRICE, D. L. Transgenic models of neurodegenerative diseases. **Curr Opin Neurobiol**, v. 6, n. 5, p. 651–660, 1996.
- LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; BOUET, V.; et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 2013.
- LEITINGER, B.; HOGG, N. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 5, p. 963–972, 2002.
- LEONI, V.; SOLOMON, A.; KIVIPELTO, M. Links between ApoE, brain cholesterol metabolism, tau and amyloid beta-peptide in patients with cognitive impairment. **Biochemical Society transactions**, v. 38, n. 4, p. 1021–1025, 2010.
- LEUNER, K.; HAUPTMANN, S.; ABDEL-KADER, R.; et al. Mitochondrial dysfunction: the first domino in brain aging and Alzheimer's disease? **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 10, p. 1659–1675, 2007.
- LEUNER, K.; SCHULZ, K.; SCHÜTT, T.; et al. Peripheral mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Focus on lymphocytes. **Molecular Neurobiology**, v. 46, n. 1, p. 194–204, 2012.
- LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 2014.
- LICHT, T.; GOSHEN, I.; AVITAL, A.; et al. Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 12, p. 5081–5086, 2011.
- LIMÓN, I. D.; DÍAZ, A.; MENDIETA, L.; et al. Amyloid-??25-35 impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats.

- Neuroscience Research**, v. 63, n. 2, p. 129–137, 2009.
- LISA, F. DI; KALUDERCIC, N.; CARPI, A.; MENABÒ, R.; GIORGIO, M. Mitochondria and vascular pathology. **Pharmacological reports: PR**, v. 61, n. 1, p. 123–30, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307700>>. .
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.
- LIU, L.; WONG, T. P.; POZZA, M. F.; et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. **Science**, v. 304, n. 5673, p. 1021–1024, 2004.
- LÖFFLER, T.; FLUNKERT, S.; HAVAS, D.; et al. Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPP^{sl} mice. **Neurobiology of Aging**, v. 34, n. 10, p. 2379–2388, 2013.
- LOURENÇO, C. F.; LEDO, A.; DIAS, C.; BARBOSA, R. M.; LARANJINHA, J. Neurovascular and neurometabolic derailment in aging and Alzheimer's disease. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 7, n. May, p. 103, 2015.
- LOURENÇO, C. F.; SANTOS, R. M.; BARBOSA, R. M.; et al. Neurovascular coupling in hippocampus is mediated via diffusion by neuronal-derived nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 421–429, 2014.
- LUCAS, H. R.; RIFKIND, J. M. Considering the vascular hypothesis of alzheimer's disease: Effect of copper associated amyloid on red blood cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **Anais...** . v. 765, p.131–138, 2013.
- LYNCH, M. A. Long-Term Potentiation and Memory. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 87–136, 2004.
- MADAMANCHI, N. R.; RUNGE, M. S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation Research**, 2007.
- MALENKA, R.; KAUER, J.; PERKEL, D.; et al. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. **Nature**, v. 340, n. 6234, p. 554–557, 1989.
- MANCINI, G.; OLIVEIRA, J. DE; HORT, M. A.; et al. Diphenyl diselenide differently modulates cardiovascular redox responses in young adult and middle-aged low-density lipoprotein receptor knockout hypercholesterolemic mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 387–397, 2014.
- MARCHESE, M.; COWAN, D.; HEAD, E.; et al. Autoimmune manifestations in the 3xtg-ad model of alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 39, n. 1, p. 191–210, 2014.
- MAREN, S.; BAUDRY, M. Properties and mechanisms of long-term

- synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. **Neurobiology of learning and memory**, 1995.
- MASTERS, C. L.; BATEMAN, R.; BLENNOW, K.; et al. Alzheimer's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15056, 2015.
- MATEOS, L.; AKTERIN, S.; GIL-BEA, F. J.; et al. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein in rodent brain is down-regulated by high fat diet in vivo and by 27-hydroxycholesterol in vitro. **Brain Pathology**, v. 19, n. 1, p. 69–80, 2009.
- MCCARROLL, S. A.; MURPHY, C. T.; ZOU, S.; et al. Comparing genomic expression patterns across species identifies shared transcriptional profile in aging. **Nature Genetics**, v. 36, n. 2, p. 197–204, 2004.
- MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M. J.; RAWLINS, J. N. P.; BANNERMAN, D. M. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. **Behavioral neuroscience**, v. 118, n. 1, p. 63–78, 2004.
- MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. **World Health Organization**, p. 2–14, 2011.
- MENG, W.; TOBIN, J. R.; BUSIJA, D. W. Glutamate-induced cerebral vasodilation is mediated by nitric oxide through N-methyl-D-aspartate receptors. **Stroke**, v. 26, n. 5, p. 857–62; discussion 863, 1995.
- MEYER-LUEHMANN, M.; SPIRES-JONES, T. L.; PRADA, C.; et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. **Nature**, v. 451, n. 7179, p. 720–724, 2008.
- MITTER, D.; REISINGER, C.; HINZ, B.; et al. The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. **Journal of Neurochemistry**, v. 84, n. 1, p. 35–42, 2003.
- MOREIRA, E. L. G.; OLIVEIRA, J. DE; ENGEL, D. F.; 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**, v. 121, n. 4, p. 415–426, 2014.
- MOREIRA, E. L. G.; OLIVEIRA, J. DE; NUNES, J. C.; et al. Age-Related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}): Evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 32, n. 2, p. 495–511, 2012.
- MORGAN, D. H.; GHRIBI, O.; HUI, L.; GEIGER, J. D.; CHEN, X.

- Cholesterol-enriched diet disrupts the blood-testis barrier in rabbits. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, p. ajpendo.00416.2014, 2014.
- MORRIS, J. K.; HONEA, R. A.; VIDONI, E. D.; SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M. Is Alzheimer's disease a systemic disease? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1842, n. 9, p. 1340–9, 2014.
- MORRIS, R. G.; GARRUD, P.; RAWLINS, J. N.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, 1982.
- MUMBY, D. G.; WOOD, E. R.; DUVA, C. A.; et al. Ischemia-induced object-recognition deficits in rats are attenuated by hippocampal ablation before or soon after ischemia. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, n. 2, p. 266–281, 1996.
- MUNOZ, D. G.; FELDMAN, H. Causes of Alzheimer's disease. **CMAJ**, 2000.
- MUOIO, V.; PERSSON, P. B.; SENDESKI, M. M. The neurovascular unit - concept review. **Acta Physiologica**, 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Princípios de bioquímica de Lehninger**, 2011.
- NICHOLLS, D. G. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. Annals of the New York Academy of Sciences. **Anais... .** v. 1147, p.53–60, 2008.
- NIU, L.; CAO, B.; ZHU, H.; et al. Impaired in vivo synaptic plasticity in dentate gyrus and spatial memory in juvenile rats induced by prenatal morphine exposure. **Hippocampus**, v. 19, n. 7, p. 649–657, 2009.
- NORMAN, K. A. How hippocampus and cortex contribute to recognition memory: Revisiting the complementary learning systems model. **Hippocampus**, v. 20, n. 11, p. 1217–1227, 2010.
- NUSRAT, A.; PARKOS, C. A.; VERKADE, P.; et al. Tight junctions are membrane microdomains. **Journal of cell science**, v. 113, n. 1, p. 1771–1781, 2000.
- O'BRIEN, J. T.; ERKINJUNTTI, T.; REISBERG, B.; et al. Vascular cognitive impairment. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 2, p. 89–98, 2003.
- O'DELL, T. J.; HAWKINS, R. D.; KANDEL, E. R.; ARANCIO, O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 24, p. 11285–9, 1991.
- ODDO, S.; CACCAMO, A.; SHEPHERD, J. D.; et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. **Neuron**, v. 39, n. 3, p. 409–421, 2003.

- OLIVEIRA, J. DE; HORT, M. A.; MOREIRA, E. L. G.; et al. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: Relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience**, v. 197, p. 99–106, 2011.
- OLIVEIRA, J. DE; MOREIRA, E. L. G.; SANTOS, D. B. DOS; et al. Increased susceptibility to amyloid- β -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 41, n. 1, p. 43–60, 2014.
- ORSUCCI, D.; MANCUSO, M.; IENCO, E. C.; et al. Vascular factors and mitochondrial dysfunction: a central role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Curr Neurovasc Res**, v. 10, n. 1, p. 76–80, 2013.
- ORSUCCI, D.; MANCUSO, M.; IENCO, E. C.; et al. Vascular factors and mitochondrial dysfunction: a central role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Current neurovascular research**, v. 10, n. 1, p. 76–80, 2013.
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 2007.
- PAIM, B. A.; VELHO, J. A.; CASTILHO, R. F.; OLIVEIRA, H. C. F.; VERCESI, A. E. Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 3, p. 444–451, 2008.
- PALMER, T. D.; WILLHOITE, A. R.; GAGE, F. H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 425, n. 4, p. 479–494, 2000.
- PANTANO, P.; TOTARO, P.; RAZ, E. Cerebrovascular diseases. **Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 29 Suppl 3, p. 314–8, 2008.
- PELLIGRINO, D. A.; GAY, R. L.; BAUGHMAN, V. L.; WANG, Q. NO synthase inhibition modulates NMDA-induced changes in cerebral blood flow and EEG activity. **The American journal of physiology**, 1996.
- PETIT, G. H.; TOBIN, C.; KRISHNAN, K.; et al. Pregnenolone sulfate and its enantiomer: Differential modulation of memory in a spatial discrimination task using forebrain NMDA receptor deficient mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 211–215, 2011.
- PFRIEGER, F. Role of cholesterol in synapse formation and function.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v. 1610, n. 2, p. 271–280, 2003.

PFRIEGER, F. W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 60, n. 6, p. 1158–71, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12861382>>. .

POSSE DE CHAVES, E. I.; RUSINOL, A. E.; VANCE, D. E.; CAMPENOT, R. B.; VANCE, J. E. Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 49, p. 30766–30773, 1997.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 1, p. 51–68, 2001.

PRICE, D.; VITA, J.; KEANEY, J. J. Redox control of vascular nitric oxide bioavailability. **Antioxid Redox Signal**, v. 2, n. 4, p. 919–35, 2000.

PRINCE, M.; WIMO, A.; GUERCHET, M.; et al. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. **Alzheimer's Disease International**, p. 84, 2015.

PUGLIELLI, L.; TANZI, R. E.; KOVACS, D. M. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 345–51, 2003.

RANGANATH, C. Working memory for visual objects: Complementary roles of inferior temporal, medial temporal, and prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 139, n. 1, p. 277–289, 2006.

RAUK, A. Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, , n. 10, p. 1273–1282, 2008.

REDDY, P. H.; BEAL, M. F. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. **Trends Mol Med**, v. 14, n. 2, p. 45–53, 2008.

REFOLO, L. M.; MALESTER, B.; LAFRANCOIS, J.; et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. **Neurobiology of disease**, v. 7, n. 4, p. 321–331, 2000.

REFOLO, L. M.; PAPPOLLA, M. A.; LAFRANCOIS, J.; et al. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of disease**, v. 8, n. 5, p. 890–9, 2001.

REIMAN, E. M.; CASELLI, R. J. Alzheimer's disease. **Maturitas**, 1999.

- REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, 2014.
- RESNICK, D. K. Fundamental Neuroscience, Second Edition., **The Spine Journal**, 2002.
- RICHTER, C.; PARK, J. W.; AMES, B. N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 17, p. 6465–7, 1988.
- ROCCHI, A.; ORSUCCI, D.; TOGNONI, G.; CERAVOLO, R.; SICILIANO, G. The role of vascular factors in late-onset sporadic Alzheimer's disease. Genetic and molecular aspects. **Current Alzheimer Research**, v. 6, n. 3, p. 224–237, 2009.
- ROCKENSTEIN, E.; CREWS, L.; MASLIAH, E. Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2007.
- ROLLS, E. T. Pattern completion and pattern separation mechanisms in the hippocampus. **The Neurobiological Basis of Memory: A System, Attribute, and Process Analysis**. p.77–113, 2015.
- ROMANO, A.; PACE, L.; TEMPESTA, B.; et al. Depressive-Like Behavior Is Paired to Monoaminergic Alteration in a Murine Model of Alzheimer's Disease. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, p. 1–12, 2015.
- ROSS, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. **The New England journal of medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 1999.
- SABAYAN, B.; JANSEN, S.; OLEKSIK, A. M.; et al. Cerebrovascular hemodynamics in Alzheimer's disease and vascular dementia: A meta-analysis of transcranial Doppler studies. **Ageing Research Reviews**, 2012.
- SANDERSON, D. J.; BANNERMAN, D. M. The role of habituation in hippocampus-dependent spatial working memory tasks: Evidence from GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice. **Hippocampus**, v. 22, n. 5, p. 981–994, 2012.
- SANDERSON, D. J.; GRAY, A.; SIMON, A.; et al. Deletion of glutamate receptor-A (GluR-A) AMPA receptor subunits impairs one-trial spatial memory. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 559–569, 2007.
- SANDOVAL, K. E.; WITT, K. A. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. **Neurobiology of Disease**, 2008.
- SANTOS, R. M.; LOURENÇO, C. F.; PIEDADE, A. P.; et al. A comparative study of carbon fiber-based microelectrodes for the measurement of nitric oxide in brain tissue. **Biosensors and**

- Bioelectronics**, v. 24, n. 4, p. 704–709, 2008.
- SCHMITT, W. B.; DEACON, R. M. J.; SEEBURG, P. H.; RAWLINS, J. N. P.; BANNERMAN, D. M. A within-subjects, within-task demonstration of intact spatial reference memory and impaired spatial working memory in glutamate receptor-A-deficient mice. **The Journal of neuroscience**, v. 23, n. 9, p. 3953–9, 2003.
- SCHREURS, B. G. The effects of cholesterol on learning and memory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2010.
- SCHROEPFER, G. J. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. **Physiological reviews**, v. 80, n. 1, p. 361–554, 2000.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617772>>.
- SCHULTZ, S. K. Principles of Neural Science, 4th ed. **American Journal of Psychiatry**, 2001.
- SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5037, p. 1503–1506, 1991.
- SELKOE, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. **Neuron**, 1991.
- SELKOE, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5594, p. 789–791, 2002.
- SHAFATI, M.; MARUTLE, A.; PETTERSSON, H.; et al. Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation. **Journal of lipid research**, v. 52, n. 5, p. 1004–10, 2011.
- SHAFATI, M.; SOLOMON, A.; KIVIPELTO, M.; BJÖRKHEM, I.; LEONI, V. Levels of ApoE in cerebrospinal fluid are correlated with Tau and 24S-hydroxycholesterol in patients with cognitive disorders. **Neuroscience Letters**, v. 425, n. 2, p. 78–82, 2007.
- SIBLEY, C.; STONE, N. J. Familial hypercholesterolemia: A challenge of diagnosis and therapy. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, 2006.
- SIMÃO, A.; PRECOMA, D.; ANDRADE, J.; et al. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 6, p. 1–63, 2013.
- SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 31–39, 2000.
- SOARES, E.; PREDIGER, R. D.; NUNES, S.; et al. Spatial memory impairments in a prediabetic rat model. **Neuroscience**, v. 250, p. 565–577, 2013.
- SPARKS, D. L. The early and ongoing experience with the cholesterol-fed rabbit as a model of Alzheimer's disease: the old, the new and the

- pilot. **J Alzheimers Dis**, v. 15, n. 4, p. 641–656, 2008.
- SPARKS, D. L.; HUNSAKER 3RD, J. C.; SCHEFF, S. W.; et al. Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 11, n. 6, p. 601–607, 1990.
- SPARKS, D. L.; SCHEFF, S. W.; HUNSAKER, J. C.; et al. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. **Experimental neurology**, v. 126, n. 1, p. 88–94, 1994.
- SQUIRE, L. R.; STARK, C. E.; CLARK, R. E. The medial temporal lobe. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 279–306, 2004.
- STAPLETON, P. A.; GOODWILL, A. G.; JAMES, M. E.; BROCK, R. W.; FRISBEE, J. C. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 7, n. 1, p. 54, 2010. Disponível em: <<http://www.journal-inflammation.com/content/7/1/54>>. .
- STERNICZUK, R.; ANTLE, M. C.; LAFERLA, F. M.; DYCK, R. H. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes. **Brain Research**, v. 1348, p. 149–155, 2010.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.
- STONE, J. What initiates the formation of senile plaques? The origin of Alzheimer-like dementias in capillary haemorrhages. **Medical Hypotheses**, v. 71, n. 3, p. 347–359, 2008.
- STOVER, K. R.; CAMPBELL, M. A.; WINNSEN, C. M. VAN; BROWN, R. E. Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 289, p. 29–38, 2015.
- STREKALOVA, T.; EVANS, M.; COSTA-NUNES, J.; et al. Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 48, p. 42–47, 2015.
- SÜLE, Z.; MRACSKÓ, É.; BERECKZI, E.; et al. Capillary injury in the ischemic brain of hyperlipidemic, apolipoprotein B-100 transgenic mice. **Life Sciences**, v. 84, n. 25–26, p. 935–939, 2009.
- SWERDLOW, R. H.; KISH, S. J. Mitochondria in Alzheimer's disease. **International Review of Neurobiology**, v. 53, p. 341–385, 2002.
- TAKECHI, R.; GALLOWAY, S.; PALLEBAGE-GAMARALLAGE, M. M.; et al. Probucol prevents blood-brain barrier dysfunction in wild-type mice induced by saturated fat or cholesterol feeding. **Clinical and**

Experimental Pharmacology and Physiology, v. 40, n. 1, p. 45–52, 2013.

TAKECHI, R.; PALLEBAGE-GAMARALLAGE, M. M.; LAM, V.; GILES, C.; MAMO, J. C. Aging-related changes in blood-brain barrier integrity and the effect of dietary fat. **Neurodegener Dis**, v. 12, n. 3, p. 125–135, 2013.

TEYLER, T. J. Brain slice preparation: Hippocampus. **Brain Research Bulletin**, v. 5, n. 4, p. 391–403, 1980.

THIELE, C.; HANNAH, M. J.; FAHRENHOLZ, F.; HUTTNER, W. B. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. **Nature cell biology**, v. 2, n. 1, p. 42–49, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/71366>>.

THIRUMANGALAKUDI, L.; PRAKASAM, A.; ZHANG, R.; et al. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 1, p. 475–485, 2008.

TOMÁS-CAMARDIEL, M.; VENERO, J. L.; HERRERA, A. J.; et al. Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: Protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals. **Journal of Neuroscience Research**, v. 80, n. 2, p. 235–246, 2005.

TRAILL, W. B.; MAZZOCCHI, M.; SHANKAR, B.; HALLAM, D. Importance of government policies and other influences in transforming global diets. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 9, p. 591–604, 2014.

TSUI-PIERCHALA, B. A.; ENCINAS, M.; MILBRANDT, J.; JOHNSON, E. M. Lipid rafts in neuronal signaling and function. **Trends in Neurosciences**, 2002.

ULLRICH, C.; PIRCHL, M.; HUMPEL, C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 45, n. 4, p. 408–417, 2010.

VALLA, J.; SCHNEIDER, L.; NIEDZIELKO, T.; et al. Impaired platelet mitochondrial activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Mitochondrion**, v. 6, n. 6, p. 323–330, 2006.

VÕIKAR, V.; RAUVALA, H.; IKONEN, E. Cognitive deficit and development of motor impairment in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. **Behavioural Brain Research**, v. 132, n. 1, p. 1–10, 2002.

WAHEED, A. A.; FREED, E. O. The role of lipids in retrovirus replication. **Viruses**, 2010.

WARBURTON, E. C.; BARKER, G. R. I.; BROWN, M. W. Investigations into the involvement of NMDA mechanisms in

- recognition memory. **Neuropharmacology**, 2013.
- WARNHOLTZ, A.; NICKENIG, G.; SCHULZ, E.; et al. Increased NADH-oxidase mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. **Circulation**, v. 99, n. 15, p. 2027–2033, 1999.
- WATSON, K. E.; BOSTRÖM, K.; RAVINDRANATH, R.; et al. TGF- β 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 5, p. 2106–2113, 1994.
- WEBER, C.; NOELS, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1410–22, 2011.
- WEINSTEIN, G.; WOLF, P. A.; BEISER, A. S.; AU, R.; SESHADRI, S. Risk estimations, risk factors, and genetic variants associated with alzheimer's disease in selected publications from the framingham heart study. **Advances in Alzheimer's Disease**, v. 3, p. 439–445, 2012.
- WILCOCK, D. M.; LEWIS, M. R.; NOSTRAND, W. E. VAN; et al. Progression of amyloid pathology to Alzheimer's disease pathology in an amyloid precursor protein transgenic mouse model by removal of nitric oxide synthase 2. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 7, p. 1537–45, 2008.
- WIXTED, J. T.; SQUIRE, L. R. The medial temporal lobe and the attributes of memory. **Trends in Cognitive Sciences**, 2011.
- WOUTERS, K.; GORP, P. J. VAN; BIEGHS, V.; et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 474–486, 2008.
- XIE, W.; DU, L. High-cholesterol diets impair short-term retention of memory in alloxan-induced diabetic mice, but not acquisition of memory nor retention of memory in prediabetic mice. **Life Sciences**, v. 77, n. 5, p. 481–495, 2005.
- YADAVA, N.; NICHOLLS, D. G. Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 27, p. 7310–7317, 2007.
- YAN, L. J.; LEVINE, R. L.; SOHAL, R. S. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1998 Feb 17;95(4):1968]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11168–11172, 1997.
- YEAGLE, P. L. Cholesterol and the cell membrane. **BBA - Reviews on**

Biomembranes, v. 822, n. 3–4, p. 267–287, 1985.

YUNG, L. M.; LEUNG, F. P.; YAO, X.; CHEN, Z.-Y.; HUANG, Y. Reactive oxygen species in vascular wall. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 6, n. 1, p. 1–19, 2006.

ZECHARIAH, A.; JIN, F.; HAGEMANN, N.; et al. Hyperlipidemia attenuates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis, impairs cerebral blood flow, and disturbs stroke recovery via decreased pericyte coverage of brain endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 7, p. 1561–1567, 2013.

ZHU, J.; SONG, W.; LI, L.; FAN, X. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases. **Molecular brain**, v. 9, p. 30, 2016. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4802712&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ZHU, X.; SMITH, M. A.; HONDA, K.; et al. Vascular oxidative stress in Alzheimer disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 257, n. 1–2, p. 240–246, 2007.

ZLOKOVIC, B. V. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. **Trends in Neurosciences**, 2005.

ZONTA, B.; MINICHELLO, L. Synaptic membrane rafts: Traffic lights for local neurotrophin signaling? **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, 2013.

ZONTA, M.; ANGULO, M. C.; GOBBO, S.; et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 43–50, 2003.