

Eduardo Luiz Gasnhar Moreira

**A HIPERCOLESTEROLEMIA COMO UM FATOR DE RISCO
PARA O DESENVOLVIMENTO DE COMPROMETIMENTO
COGNITIVO LEVE: EVIDÊNCIAS OBTIDAS EM MODELOS
EXPERIMENTAIS**

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

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Farina

Florianópolis
2013

Dedico esta Tese ao meu pequeno
Carlão, te amo filho!

AGRADECIMENTOS

Este é o ponto final de cerca de três anos de trabalho. Um importante passo no meu desenvolvimento profissional e pessoal foi dado. Embora esta Tese seja um produto individual, ela só foi possível com o suporte e auxílio de diversas outras pessoas. Eu sou muito grato por todos que me ajudaram a chegar até aqui.

Aproveito esta oportunidade para agradecer:

Ao Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger, grande amigo e orientador. Agradeço-o pela confiança em mim depositada desde o mestrado, pelos vários anos de parceria e tantos ensinamentos e, sobretudo, por ter me dado liberdade de fazer muitas coisas da minha maneira, por entender a importância da independência.

Ao Prof. Dr. Marcelo Farina pela co-orientação, por ter me aberto as portas de seu laboratório e, sobretudo pelo voto de confiança desde o meu primeiro contato, ainda no início da graduação em Farmácia. Pela amizade, convivência e ensinamentos que contribuíram na minha formação acadêmico-científica.

A Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, por despertar minha visão crítica e paixão pela ciência. Pela amizade, ensinamentos, incentivo e apoio irrestrito durante todo o período em que trabalhamos juntos.

Aos Professores Dr. Roger Walz, Dr. João Carlos Xikota e ao Dr. Jean Costa Nunes, pela oportunidade em participar do Centro de Neurociências Aplicadas (HU/UFSC), pela amizade, discussões científicas e colaborações experimentais.

A Prof^a. Dr^a. Andreza Fabro de Bem, pela amizade e orientação. Pelo entusiasmo pela pesquisa e em especial, pelo tema hipercolesterolemia e doença de Alzheimer. Pelos momentos de discussão científica e por ter me aberto as portas de seu laboratório.

A Jade de Oliveira, minha colega na pesquisa com hipercolesterolemia e déficits cognitivos. Muito obrigado pelas discussões científicas, ideias, sugestões, e tantos e tantos auxílios em experimentos.

Ao Prof. Dr. Aderbal Aguiar, pela amizade, colaboração e principalmente, pelas diversas e diversas discussões científicas, na maioria das vezes associadas a um bom churrasco e claro, cerveja.

A Dr^a Danúbia Bonfanti dos Santos, pela amizade e colaboração durante todo esse período. Por ter me auxiliado em diversos experimentos bioquímicos e ter me recebido no laboratório do Prof. Marcelo.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves (UFRGS) por me receber em seu laboratório, e ao Dr. Márcio Ferreira Dutra, pela amizade e colaboração nos experimentos de Imunofluorescência.

A Prof^ª. Dr^a. Eliane Maria Goldfeder, pela amizade e discussões científicas. Por ter me aberto às portas de seu laboratório e me ensinado pessoalmente técnicas de preparação e interpretação de material histológico.

Aos colegas do laboratório (i) do Prof. Rui: Adalberto, Andreia, Daniel, Filipe, Josiel, Jozimar, Juliana, Marcelo Libório, Morgana, Néelson, Paulo, Róbson, Samantha, Sandro, Vanessa (ii) do Prof. Marcelo: Alessandra, Aline, Anderson, Carolina, Cinara, Dirleise, Heloísa, Júlia, Juliana, Kaite, Luciana, Mariana, Renata, Viviane (iii) do laboratório da Prof^ª. Andreza, Daiane, Gianni, Lara e Marcão.

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 Izídio, Dr. Nelson H. Gabilan e Dr. Rafael C. Dutra, pelas críticas, sugestões e reflexões adicionais, que contribuíram dando maior consistência e qualidade à pró-forma da tese.

Aos professores membros da banca examinadora do doutorado, Dr. Aderbal Aguiar, Dr. Fabrício Pamplona, Dr. Geison Souza Izídio, Dr. Juliano Ferreira, Dr. Rafael C. Dutra, e Dr. Sérgio Teixeira Ferreira 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.

Aos meus pais Geovani e Neuza, exemplos de caráter e honestidade, por todo o apoio, amor, carinho e educação em todas as etapas da minha vida.

A Cristiane, pelo amor, carinho e amizade, em quem sempre encontrei incentivo e companheirismo incondicionais.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPESC pelas bolsas de estudo e auxílio financeiro.

A todas as pessoas não mencionadas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

A experiência é o nome que damos aos nossos erros.

(Oscar Wilde)

RESUMO

Evidências acumuladas ao longo das duas últimas décadas sugerem uma associação positiva entre a hipercolesterolemia e o desenvolvimento da doença de Alzheimer esporádica. Estudos prospectivos demonstraram que esta relação parece ser idade-dependente, sendo a hipercolesterolemia um possível fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer décadas após. A hipercolesterolemia familiar é uma doença genética do metabolismo das lipoproteínas cujo modo de herança é autossômico codominante e que se caracteriza por níveis muito elevados de colesterol plasmático. O fenótipo clínico de hipercolesterolemia familiar é geralmente decorrente de defeitos no gene *LDLR*, que codifica o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Recentemente, um estudo prospectivo demonstrou que pacientes com hipercolesterolemia familiar de meia-idade apresentam uma elevada incidência de comprometimento cognitivo leve em comparação a indivíduos sem hipercolesterolemia familiar. Neste contexto, a caracterização do comprometimento cognitivo leve em modelos experimentais de hipercolesterolemia familiar torna-se imperativa, visando tanto o desenvolvimento de abordagens terapêuticas e preventivas, quanto o entendimento de mecanismos moleculares responsáveis pelo declínio cognitivo associado com a hipercolesterolemia. Os resultados desta tese demonstram que camundongos nocaute para o receptor de LDL (*LDLR*^{-/-}) de quatorze meses (“meia-idade”), um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, apresentaram prejuízos cognitivos em testes de memória operacional, de referência espacial e de procedimento. Também foi observado um desequilíbrio no sistema antioxidante dependente da glutatona (GSH) e um aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no córtex pré-frontal dos camundongos *LDLR*^{-/-} de “meia-idade”. O fármaco hipolipemiante probucol e o exercício físico voluntário (rodas de correr) diminuíram de modo significativo os níveis de colesterol plasmático de camundongos *LDLR*^{-/-}, todavia, apenas o exercício físico voluntário foi capaz de atenuar os prejuízos cognitivos dos camundongos *LDLR*^{-/-}. Por outro lado, a exposição a uma dieta hipercolesterolêmica (1,25 % de colesterol) por dois meses também induziu déficits cognitivos em camundongos *Swiss*, bem como aumentou significativamente a atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal e hipocampo. De modo interessante, a exposição de células de neuroblastoma humano da linhagem SH-5Y6Y à LDL também induziu um aumento na atividade da enzima AChE. Ademais,

foi demonstrado que camundongos LDLr^{-/-} parecem apresentar uma maior susceptibilidade a insultos neurotóxicos, como à neurotoxicidade induzida pela exposição crônica ao metilmercúrio (MeHg). Em conjunto, os achados do presente estudo caracterizam principalmente a presença de comprometimento cognitivo leve em camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade”, tal como observado em pacientes com hipercolesterolemia familiar de meia-idade. Os resultados deste estudo encorajam estudos adicionais para investigar o valor terapêutico do exercício físico regular no controle do comprometimento cognitivo leve em pacientes com hipercolesterolemia familiar, bem como a associação de fármacos hipolipemiantes com inibidores da enzima AChE no tratamento da doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia. Doença de Alzheimer. Comprometimento cognitivo leve. Camundongos nocaute para o receptor de LDL. Acetilcolinesterase. Exercício físico.

ABSTRACT

Accumulating evidence over the past decades compellingly argues that people with high serum cholesterol concentration in midlife have a significantly higher risk of Alzheimer's disease (AD) in later life. Familial hypercholesterolemia (FH) is an inherited metabolic disorder characterized by high levels of plasma low density lipoproteins (LDL). FH remains the most common monogenic disorder of lipoprotein metabolism, and it is mainly due to mutations in the LDL receptor (LDLR) gene that leads to the plasma accumulation of cholesterol ester-laden LDL particles. It was recently showed that middle age patients with FH show a particularly high incidence of mild cognitive impairments (MCI). Thus, the characterization of MCI in experimental models of FH aimed at developing therapeutic and preventive approaches for the cognitive decline associated with hypercholesterolemia is imperative. The results presented herein show that middle-aged low-density lipoprotein receptor-deficient (LDLR^{-/-}) mice, an experimental model of FH, exhibit working, spatial reference, and procedural memory impairments, which were associated with the occurrence of antioxidant imbalance, oxidative damage, and putative decrease of cholinergic signaling in the prefrontal cortex. The lipid-lowering drug probucol and physical exercise (voluntary running wheel) similarly decreased total plasma cholesterol levels in LDLR^{-/-} mice, however, only physical exercise mitigated the spatial memory deficits of LDLR^{-/-} mice. Moreover, mild hypercholesterolemia was modeled in Swiss mice (high fat/cholesterol diet) in order to evaluate primary biochemical events linked to hypercholesterolemia-induced cognitive impairments. An impaired short-term object location memory was observed in hypercholesterolemic mice, which was associated with an increased acetylcholinesterase (AChE) activity within the prefrontal cortex and hippocampus. Notably, LDL cholesterol significantly increased in a dose-dependent manner the activity of AChE in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Finally, hypercholesterolemic LDLR^{-/-} mice were more susceptible to methylmercury (MeHg)-induced cerebellar glial activation, suggesting that hypercholesterolemia in itself may pose a risk factor in MeHg-induced neurotoxicity. Overall, this study corroborated previous clinical data regarding the observation of MCI in FH patients. The present findings may have important implications, since they provide an opportunity for clinical interventions such as control of vascular risk factors that minimize, arrest, or even reverse cognitive deterioration.

Keywords: Hypercholesterolemia. Alzheimer's disease. Mild cognitive impairments. Low-density lipoprotein receptor-deficient (LDLr^{-/-}) mice. Acetylcholinesterase. Physical exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fontes do colesterol hepático e rotas pelas quais o colesterol deixa o fígado.	02
Figura 2	Principais etapas envolvidas na biossíntese do colesterol.	04
Figura 3	Homeostase do colesterol no sistema nervoso central (SNC).	08
Figura 4	Ilustração gráfica de distribuição normal e intervalo de referência dos níveis de colesterol na população.	09
Figura 5	Valores de referência para o perfil lipídico em adultos.	10
Figura 6	Número total de publicações (“todos os anos”) contendo as palavras “hipercolesterolemia”.	21
Figura 7	Relação entre a idade dos participantes e o resultado de estudos acerca dos efeitos da hipercolesterolemia no risco de desenvolvimento/progressão de demência.	23
Figura 8	O aumento de colesterol nas membranas celulares pode afetar a produção do peptídeo β -amiloide cerebral.	27
Figura 9	Disfunção da barreira hemato-encefálica (BHE), com consequente extravasamento de componentes séricos através das paredes de pequenos vasos cerebrais.	30
Figura 10	Desenho experimental 2: Estratégias hipolipemiantes revertem os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr ^{-/-} ?	40

Figura 11	Desenho experimental 3: O enriquecimento ambiental durante períodos críticos do desenvolvimento previne os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr ^{-/-} adultos?	41
Figura 12	Desenho experimental 4: Em busca de mecanismos bioquímicos iniciais que relacionam a hipercolesterolemia com prejuízos cognitivos.	42
Figura 13	Desenho experimental 5a: Camundongos hipercolesterolêmicos são mais susceptíveis aos efeitos de neurotóxicantes?	43
Figura 14	Desenho experimental 5b: Efeitos do MeHg sobre a atividade locomotora, níveis de colesterol plasmático e atividade de GPx cerebelar em camundongos C57Bl/6.	44
Figura 15	Representação esquemática do teste de realocação de objetos.	46
Figura 16	Hipercolesterolemia em camundongos nocaute para o receptor de LDL.	57
Figura 17	Avaliação do número de cruzamentos totais e da porcentagem de cruzamentos centrais em camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} de 3 e 14 meses no teste do campo aberto.	58
Figura 18	Déficits cognitivos em camundongos LDLr ^{-/-} de “meia-idade”.	60
Figura 19	Avaliação da atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-}	61
Figura 20	Avaliação do efeito do inibidor da enzima AChE tacrina na performance de camundongos LDLr ^{-/-} de 14 meses no teste da esQUIVA inibitória.	62

Figura 21	Avaliação dos níveis de GSH e da atividade das enzimas GPx e GR no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} .	64
Figura 22	Avaliação da atividade da enzima catalase e dos níveis de peroxidação lipídica (ensaio de TBARS) no córtex pré-frontal de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} .	65
Figura 23	Efeitos do probucol e do exercício físico voluntário nos níveis plasmáticos de lipídeos em camundongos LDLr ^{-/-} .	67
Figura 24	Efeitos do probucol e do exercício físico voluntário no teste da realocação do objeto e no campo aberto.	68
Figura 25	Efeitos do enriquecimento ambiental do nascimento até a adolescência no teste da realocação de objeto e no campo aberto em camundongos LDLr ^{-/-} .	70
Figura 26	Níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol não-HDL, colesterol HDL, triglicérides e glicose em camundongos <i>Swiss</i> de três meses alimentados por dois meses com dieta padrão para roedores ou dieta hipercolesterolêmica.	71
Figura 27	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica na cognição, locomoção espontânea, e comportamentos relacionados à depressão/ansiedade em camundongos <i>Swiss</i> .	72
Figura 28	Efeitos da dieta hipercolesterolêmica na atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos <i>Swiss</i> .	73

- Figura 29** Efeitos da dieta hipercolesterolêmica na densidade da proteína BACE-1e da proteína AQP-4 no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos *Swiss*. 75
- Figura 30** Efeitos do colesterol LDL na atividade da AChE, nos níveis de GSH, e nas atividades da GPx e GR em células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y. 76
- Figura 31** Exposição crônica ao MeHg induz dislipidemia em camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. 78
- Figura 32** Exposição crônica ao MeHg induz aumento da expressão da GFAP no cerebelo de camundongos LDLr^{-/-} e inibe a atividade da GPx no cerebelo de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. 79
- Figura 33** Efeitos da exposição crônica ao MeHg na atividade da GPx no cerebelo, nos níveis de colesterol plasmático, e na atividade motora vertical no campo aberto em camundongos C57Bl/6. 81

LISTA DE TABELAS

- | | | |
|-----------------|--|----|
| Tabela 1 | Evidências experimentais relacionando hipercolesterolemia a déficits cognitivos obtidas em estudos pré-clínicos. | 25 |
| Tabela 2 | Efeitos de uma dieta hipercolesterolêmica em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no córtex pré-frontal, hipocampo e fígado de camundongos. | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

24-OH – 24-hidroxicolesterol
27-OH – 27-hidroxicolesterol
ACAT – acil-CoA:colesterol aciltransferase
Acetil-Coa – acetilcoenzima A
AChE – acetilcolinesterase
ANOVA – Análise de variância
apoA – apolipoproteína A
apoB – apolipoproteína B
apoC – apolipoproteína C
apoE – apolipoproteína E
APP – Proteína precursora amiloide
AQP-4 – aquaporina 4
AVC – Acidente vascular cerebral
BACE-1 – β -secretase
BHE – Barreira hemato-encefálica
EROs – Espécies reativas do oxigênio
GPx – Glutathione peroxidase
GR – Glutathione redutase
GSH - Glutathione
GFAP – Proteína glial fibrilar ácida
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
i.c.v. – Intracerebroventricular
i.p. - Intraperitoneal
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDLr – Receptor da lipoproteína de baixa densidade
LRP-1 – Receptor relacionado à lipoproteína de baixa densidade
MeHg – Metilmercúrio
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
SH-SY5Y – Células de neuroblastoma humano
SNC – Sistema nervoso central
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VLDL – Lipoproteínas de muita baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Síntese, transporte e metabolismo do colesterol	02
1.2. Colesterol e o Sistema Nervoso Central	05
1.3. Definindo hipercolesterolemia: quão alto é realmente alto?	08
1.4. Hipercolesterolemia familiar	10
1.5. Modelos experimentais para o estudo da hipercolesterolemia	12
1.6. Hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares	13
1.7. Doença de Alzheimer	15
1.8. Hipercolesterolemia e doença de Alzheimer	20
1.9. Estudos epidemiológicos	22
1.10. Modelos experimentais de hipercolesterolemia e prejuízos cognitivos	24
1.11. Colesterol e a formação do peptídeo β -amiloide	26
1.12. Hipercolesterolemia e disfunção vascular	28
JUSTIFICATIVAS	33
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo Geral	35
2.2. Objetivos Específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Reagentes	37
3.2. Animais	37
3.3. Cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	37
3.4. Desenhos Experimentais	38
3.4.1. Bloco Experimental 1 – Camundongos LDLr ^{-/-} de meia-idade apresentam comprometimento cognitivo leve?	38
3.4.2. Bloco Experimental 2 – Estratégias hipolipemiantes revertem os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr ^{-/-} ?	39
3.4.3. Bloco Experimental 3 – O enriquecimento ambiental durante períodos críticos do desenvolvimento previne os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr ^{-/-} adultos?	40
3.4.4. Bloco Experimental 4 – Em busca de mecanismos bioquímicos iniciais que relacionam a hipercolesterolemia com prejuízos	41

	cognitivos.	
3.4.5.	Experimento 5 – Camundongos hipercolesterolêmicos são mais susceptíveis aos efeitos de neurotóxicos?	42
3.5.	Testes comportamentais	44
3.5.1.	Campo aberto	44
3.5.2.	Teste da realocação de objeto	45
3.5.3.	Esquiva inibitória do tipo step down	46
3.5.4.	Labirinto aquático	47
3.5.5.	Respostas de medo condicionado	47
3.5.6.	Labirinto em cruz elevado	48
3.5.7.	Nado forçado	49
3.6.	Determinação de lipídeos plasmáticos e glicose	49
3.7.	Experimentos bioquímicos	49
3.7.1.	Preparação de amostras de tecido cerebral	49
3.7.2.	Sistema antioxidante dependente de GSH	50
3.7.3.	Catalase	51
3.7.4.	Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS	51
3.7.5.	Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	51
3.8.	Imunodeteção de proteínas: <i>Western blotting</i>	52
3.9.	Dosagem de proteínas	52
3.10.	Imunofluorescência	53
3.11.	Investigação neuropatológica	53
3.12.	Ensaio <i>in vitro</i>	54
3.12.1.	Isolamento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana	54
3.12.2.	Ensaio utilizando cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	55
3.13.	Análises estatísticas	55
4.	RESULTADOS	57
4.1.	Experimento 1 – Camundongos LDLr ^{-/-} de meia-idade apresentam comprometimento cognitivo leve?	57
4.2.	Experimento 2 – Estratégias hipolipemiantes revertem os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr ^{-/-} ?	66

4.3.	Experimento 3 – O enriquecimento ambiental durante períodos críticos do desenvolvimento previne os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr ^{-/-} adultos?	69
4.4.	Experimento 4 – Em busca de mecanismos bioquímicos iniciais que relacionam a hipercolesterolemia com prejuízos cognitivos.	70
4.5.	Experimento 5 – Camundongos hipercolesterolêmicos são mais susceptíveis aos efeitos de neurotóxicos?	76
5.	DISCUSSÃO	83
6.	SUMÁRIO E CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

Lista de publicações relacionadas à tese:

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

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

Moreira EL, Aguiar AS Jr, de Carvalho CR, Santos DB, de Oliveira J, de Bem AF, Xikota JC, Walz R, Farina M, Prediger RD. Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia. **Neuroscience Letters**, 29:541-193, 2013.

Moreira EL, de Oliveira J, Prediger RD, Farina M, de Bem AF. Cholesterol levels and cognitive impairments. In: Martin CR e Preedy VR (Ed.). **Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline**. Taramani: Elsevier, *In press*.

Artigo submetido relacionado à tese:

Moreira EL, de Oliveira J, Engel DF, Walz R, de Bem AF, Farina M, Prediger RD. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? Submetido ao periódico **Journal of Neural Transmission**.

Outras publicações durante o período:

de Oliveira J, **Moreira EL**, Mancini G, Hort MA, Latini A, Ribeiro-do-Valle RM, Farina M, da Rocha JB, de Bem AF. Diphenyl diselenide prevents cortico cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. **Neurochem Res**, 2013. doi:10.1007/s11064-013-1110-4.

Aguiar AS Jr, Tristão FS, Amar M, Chevarin C, Glaser V, de Paula Martins R, **Moreira EL**, Mongeau R, Lanfumey L, Raisman-Vozari R, Latini A, Prediger RD. Six weeks of voluntary exercise don't protect C57Bl/6 mice against neurotoxicity of MPTP and MPP⁺. **Neurotox Res**, 2013. doi:10.1007/s12640-013-9412-5.

Dutra RC, **Moreira EL**, Alberti TB, Marcon R, Prediger RD, Calixto JB. Spatial reference memory deficits precede motor dysfunction in an experimental autoimmune encephalomyelitis model: the role of kallikrein-kinin system. **Brain Behav Immun**, 2013. doi:10.1016/j.bbi.2012.06.002.

Colle D, Santos DB, **Moreira EL**, Hartwig JM, dos Santos AA, Zimmermann LT, Hort MA, Farina M. Probucol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats. **PLoS one**, 8(6):e67658, 2013.

Aguiar AS Jr, **Moreira EL**, Hoeller AA, Oliveira PA, Córdova FM, Glaser V, Walz R, Cunha RA, Leal RB, Latini A, Prediger RD. Exercise attenuates levodopa-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine-lesioned mice. **Neuroscience**, 243:46-53, 2013.

Ribeiro RP, **Moreira EL**, Santos DB, Colle D, Dos Santos AA, Peres KC, Figueiredo CP, Farina M. Probucol affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Neurochem Res**, 38(3):660-668, 2013.

Santos DB, Peres KC, Ribeiro RP, Colle D, dos Santos AA, **Moreira EL**, Souza DO, Figueiredo CP, Farina M. Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. **Exp Neurol**, 233(2):767-775, 2011.

Aguiar AS, Castro AA, **Moreira EL**, Glaser V, Santos AR, Tasca CI, Latini A, Prediger RD. 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. **Mech Ageing Dev**, 132(11-12):560-567, 2011.

de Oliveira J, Hort MA, **Moreira EL**, Glases V, Ribeiro-do-Valle RM, Prediger RD, Farina M, Latini A, de Bem AF. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience**, 197:99-106, 2011.

Prediger RD, Aguiar AS, **Moreira EL**, Matheus FC, Castro FC, Walz R, de Bem AF, Latini A, Tasca CI, Farina M, Raisman-Vozari R. The intranasal administration of 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. **Curr Pharm Des**, 17:489-507, 2011.

Figueiredo CP, Antunes VL, **Moreira EL**, de Mello N, Medeiros R, Di Giunta G, Lobão-Soares B, Linhares M, Lin K, Mazzuco TL, Prediger RD, Walz R. Glucose-dependent insulinotropic peptide receptor expression in the hippocampus and neocortex of mesial temporal lobe epilepsy patients and rats undergoing pilocarpine induced status epilepticus. **Peptides**, 32: 781-789, 2010.

1. INTRODUÇÃO

Em tecidos animais, o colesterol é o mais abundante membro de uma família de compostos policíclicos conhecidos como esteróis (GOEDEKE; FERNANDEZ-HERNANDO, 2012). Ele foi, primeiramente, descrito como um componente dos cálculos biliares em 1770, e isolado a partir da gordura animal pelo químico francês Michel Chevreul em 1815. Contudo, foi somente no início do século XX que a estrutura química do colesterol foi completamente elucidada, fato que resultou no Prêmio Nobel de Química para o cientista alemão Heinrich Wieland em 1927. Curiosamente, durante a leitura do Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1986, Michael Brown e Joseph Goldstein levantaram a suposição de que o colesterol seria a “pequena” molécula mais condecorada na Biologia, uma vez que já haviam sido entregues, até o momento, treze Prêmios Nobel a cientistas que devotaram a maior parte de suas carreiras ao estudo do colesterol (BROWN; GOLDSTEIN, 1986).

“O colesterol tem exercido uma fascinação hipnótica para cientistas das mais diversas áreas da ciência e medicina. Químicos orgânicos têm se fascinado com o colesterol devido a sua complexa estrutura de quatro anéis. Bioquímicos tem se fascinado com o colesterol porque ele é sintetizado a partir de um simples substrato de dois carbonos, acetato, através da ativação de pelo menos trinta enzimas, muitas destas coordenadamente reguladas. Fisiologistas e biólogos celulares têm se fascinado pelo colesterol devido a suas funções essenciais nas membranas de células animais, aonde modula a fluidez e mantém uma barreira entre a célula e o ambiente, e porque o colesterol é a matéria-prima para a síntese de hormônios esteroides e ácidos biliares. Finalmente, médicos têm se fascinado porque elevados níveis de colesterol sanguíneo aceleram a formação de placas ateroscleróticas levando a ataques cardíacos e infartos. Os estudos do colesterol desta forma abraçam todas as disciplinas na biologia moderna. Se os papéis do colesterol na biomedicina devem ser elucidados, todas essas disciplinas devem ser empregadas (BROWN; GOLDSTEIN, 1986)”.

O colesterol é um importante constituinte de todas as membranas celulares, e é o precursor biossintético de ácidos biliares, vitamina D, e de hormônios esteroides (como, por exemplo, progesterona e aldosterona) (MAXFIELD; van MEER, 2010). Desta forma, é de

extrema importância que as células dos principais tecidos do corpo recebam um suprimento contínuo de colesterol (GOEDEKE; FERNANDEZ-HERNANDO, 2012). Por outro lado, a regulação do balanço corporal do colesterol apresenta uma complexa série de mecanismos de transporte, biossintéticos e regulatórios, sendo que o fígado se apresenta como elemento central. De maneira geral, o colesterol entra em seu *pool* hepático proveniente de uma série de fontes, incluindo o colesterol da dieta, o colesterol sintetizado pelos tecidos extra-hepáticos e a síntese de *novo* do colesterol pelo fígado (Figura 1). O colesterol é eliminado do fígado como colesterol inalterado na bile, como um componente das lipoproteínas do plasma enviadas aos tecidos periféricos, ou como sais biliares secretados na luz intestinal (HARVEY; FERRIER, 2012).

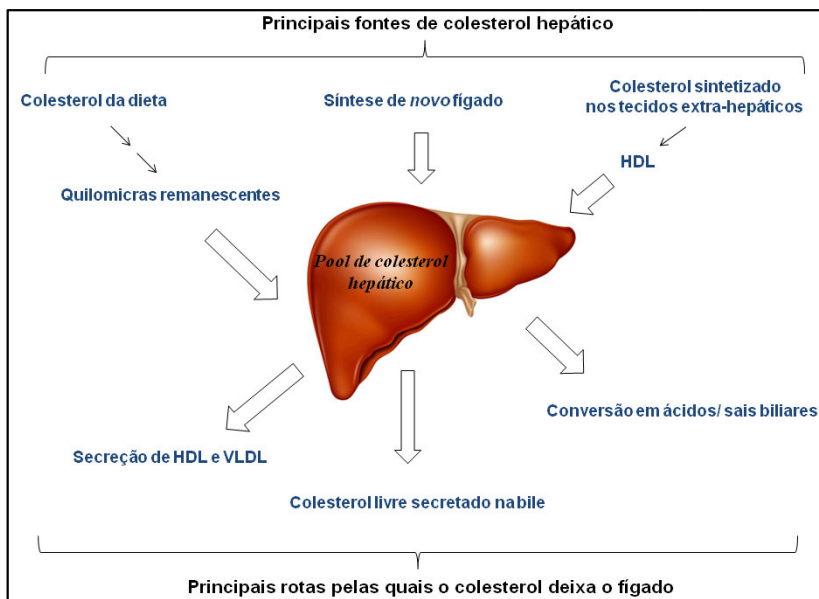


Figura 1. Fontes do colesterol hepático e rotas pelas quais o colesterol deixa o fígado (adaptado de Harvey e Ferrier, 2012).

1.1. Síntese, transporte e metabolismo do colesterol

Em geral, as células liberam e captam o colesterol para manter a homeostase deste componente essencial. Contudo, enquanto algumas células produzem o colesterol em excesso para suprir outras células;

outras necessitam de colesterol exógeno devido a sua limitada capacidade biossintética. Em condições normais, em torno de 60% do colesterol corporal é sintetizado (em torno de 700 mg/dia) e o restante é provido pela dieta. O fígado é responsável por, aproximadamente, 10% da síntese total em humanos, assim como o intestino delgado (LEONI et al., 2012).

A biossíntese do colesterol envolve uma série altamente complexa de, pelo menos, trinta reações enzimáticas, as quais foram reveladas pelos estudos de Konrad Bloch e Feodor Lynen, e que resultaram no Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1964 aos pesquisadores. Especificamente, todos os átomos de carbono do colesterol são fornecidos pelo acetato. O NADPH fornece os equivalentes redutores. A rota é dirigida pela hidrólise da ligação tioéster de alta energia da acetilcoenzima A (Acetil-CoA) e a ligação fosfato terminal do ATP. A síntese ocorre no citoplasma com enzimas do citosol e retículo endoplasmático (GOLDSTEIN; BROWN, 1990). Resumidamente, a síntese do colesterol pode ser dividida em cinco estágios: I) síntese do mevalonato a partir da Acetil-CoA; II) síntese de unidades isoprenoides a partir do mevalonato por meio da perda de CO₂; III) condensação de seis unidades isoprenoides para formar o esqualeno; IV) ciclização do esqualeno, formando lanosterol; V) formação do colesterol por rearranjo da molécula de lanosterol. A figura 2 ilustra as principais etapas na síntese do colesterol. O passo limitante da velocidade na síntese do colesterol é a conversão da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) em mevalonato, catalisada pela enzima HMG-CoA redutase (RODWELL et al., 1976). A atividade desta enzima é regulada por mecanismos de retroalimentação negativos, tanto em nível proteico quanto transcricional (GOEDEKE; FERNANDEZ-HERNANDO, 2012).

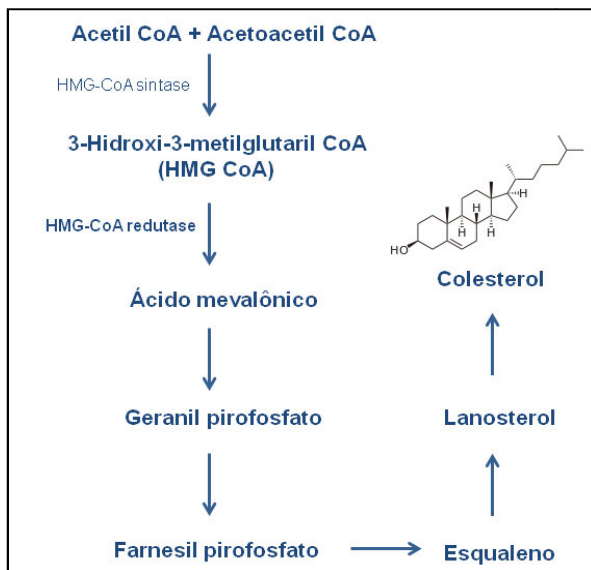


Figura 2. Principais etapas envolvidas na biossíntese do colesterol (adaptado de Harvey e Ferrier, 2012).

Os lipídios, por serem parcialmente insolúveis no meio aquoso, são transportados no organismo sob a forma de partículas denominadas lipoproteínas, as quais são formadas por uma “capa” hidrofílica constituída por fosfolipídios, colesterol livre e proteínas (apolipoproteínas), envolvendo um núcleo hidrofóbico que contém triglicerídeos e colesterol esterificado (MAXFIELD; van MEER, 2010).

O colesterol é captado no lúmen intestinal e transportado para o fígado por meio dos quilomícrons – as maiores e menos densas lipoproteínas, contendo uma alta proporção de triacilgliceróis (KANE et al., 1980). No fígado, o colesterol pode ser esterificado, convertido em ácidos biliares, secretado na bile ou coletado em lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) para ser transportado para os tecidos extra-hepáticos (EDGE et al., 1985). A VLDL pode ser remodelada pela ação da lipoproteína lipase que remove triacilgliceróis desta lipoproteína, transferindo a apolipoproteína A (apoA) e apolipoproteína C (apoC) da VLDL para a lipoproteína de alta densidade (HDL) e obtendo ésteres de colesterol. O produto desta remodelação é a lipoproteína de baixa densidade (LDL), a qual supre os tecidos periféricos com colesterol. A captação celular de LDL é regulada pelo receptor de LDL (LDLr) e pela apolipoproteína B (apoB) (GOLDSTEIN; BROWN, 2009). O influxo de

colesterol inibe a enzima HMG-CoA redutase e a síntese de colesterol, bem como estimula a esterificação do colesterol por meio do aumento da atividade da enzima acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT). A ACAT transfere um ácido graxo de um derivado de acil-CoA a um colesterol, produzindo um éster de colesterol que pode ser armazenado na célula (HARVEY; FERRIER, 2012).

O transporte reverso do colesterol, pelo qual as células dos diferentes tecidos eliminam o excesso de colesterol pelo fígado, é mediado pela HDL. As partículas de HDL contêm apoA1 e adquirem colesterol diretamente da membrana plasmática. Esta transferência é mediada por membros da família dos transportadores do cassete de ligação ao ATP (ABC). Em torno de 1 g de colesterol é eliminado do corpo a cada dia. Aproximadamente metade é excretada pelas fezes após a conversão em ácidos biliares; o restante é excretado como colesterol não metabolizado (inalterado). Os ácidos biliares formados apresentam um importante papel na solubilização e absorção de gorduras, colesterol, vitaminas e fármacos. Aproximadamente 95% dos ácidos biliares são reabsorvidos do intestino e chegam ao fígado pela veia porta (ciclo entero-hepático) (de GOMA; RADER, 2011).

1.2. Colesterol e o Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) corresponde a somente cerca de 2% de toda a massa corporal, todavia contém, aproximadamente, 25% de todo o colesterol livre do corpo (BJÖRKHEM et al., 1998). Contudo, uma vez que a barreira hemato-encefálica (BHE) impede a captação de colesterol da circulação para o cérebro (as lipoproteínas não atravessam a BHE) (BJÖRKHEM, MEANEY, 2004), o cérebro sintetiza essencialmente todo o colesterol necessário, não dependendo do colesterol periférico.

A meia-vida do colesterol no sistema nervoso central (SNC) é extremamente longa, estimada em 4 a 6 meses em roedores e até cinco anos em humanos (ANDERSSON et al., 1990; BJÖRKHEM et al., 1998). O colesterol cerebral apresenta um papel essencial na formação da mielina e a grande maioria do colesterol cerebral (mais de 70%) está presente nas bainhas de mielina. De fato, a maioria do colesterol cerebral é adquirida durante o processo de mielinização, o qual ocorre nas primeiras etapas do desenvolvimento (SPADY; DIETSCHY, 1983). O colesterol também é um componente estrutural das membranas das células da glia e neurônios. Em membranas neuronais, o colesterol está concentrado em microdomínios de membrana resistentes à solubilização

com detergentes, denominados “*lipid rafts*”. Estes “*lipid rafts*” definem propriedades funcionais de canais iônicos, fatores neurotróficos e receptores de neurotransmissores, assim como as suas localizações em sítios específicos nas membranas, desta forma, criando uma plataforma para iniciação, propagação e manutenção de eventos de transdução de sinal (PARATCHA; IBANEZ, 2002). Finalmente, o colesterol apresenta um importante papel no crescimento neurítico, na sinaptogênese, na manutenção da integridade das sinapses e na liberação de neurotransmissores. A síntese de colesterol também gera produtos intermediários, como os isoprenoides (precursores de moléculas envolvidas na sinalização e resposta inflamatória) e ubiquinonas (coenzima Q10, um componente da cadeia transportadora de elétrons envolvida na geração de energia na forma de ATP) (BJÖRKHEM, MEANEY, 2004).

Os neurônios sintetizam o colesterol durante os períodos de desenvolvimento, contudo, neurônios maduros perdem progressivamente esta propriedade, obtendo colesterol a partir de outras células, como os astrócitos. De acordo com Pfrieger e Ungerer (2011), no cérebro adulto, esta captação de colesterol em detrimento de síntese poderia permitir aos neurônios um foco na geração de atividade elétrica e poupar o alto custo energético dispensado na síntese de colesterol.

O transporte de colesterol dos astrócitos para os neurônios requer a ligação do colesterol a uma das variantes da apolipoproteína E (apoE) – o principal sistema de transporte de colesterol no SNC. O processo é controlado por membros da família dos transportadores do cassete de ligação ao ATP (ABCA1 e ABCG1). O complexo apoE-colesterol é captado por neurônios via endocitose por meio de receptores específicos pertencentes à família de receptores de LDL (como o próprio receptor de LDL ou a proteína relacionada ao receptor de LDL, LRP1). As lipoproteínas endocitadas, contendo colesterol, são hidrolisadas em lisossomos neuronais permitindo a liberação intracelular de colesterol livre (Figura 3). O colesterol livre retroalimenta vias regulatórias da expressão de enzimas relacionadas à síntese de colesterol e receptores de lipoproteínas. O colesterol livre é esterificado pela ACAT, e armazenado na célula (PFRIEGER; UNGERER, 2011).

O cérebro elimina o excesso de colesterol por meio da formação e excreção na circulação de oxisteróis, os quais apresentam um importante papel na regulação da homeostase de colesterol no SNC. Em células neuronais, o colesterol é, principalmente, convertido pela enzima colesterol 24-hidroxilase (CYP46A1) em 24-hidroxicolesterol (24-OH), o qual, ao contrário do colesterol, é capaz de transpassar a BHE. Após a

sua excreção do cérebro, o 24-OH, através da circulação sanguínea, alcança o fígado, aonde é captado e metabolizado. Além de ser um metabólito para a eliminação do colesterol, o 24-OH pode ser captado pelos astrócitos, onde age como uma molécula sinalizadora que regula a homeostase do colesterol por meio da ativação de receptores *liver X* (LXR). Estes receptores nucleares aumentam a expressão de elementos que aumentam a liberação de colesterol das células, incluindo transportadores ABC, apoA1 e apoE (PFRIEGER; UNGERER, 2011).

O 27-hidroxicolesterol é outro oxiesterol produzido no cérebro por meio da ação da enzima colesterol 27-hidroxilase (CYP27A1), contudo em quantidades menores que o 24-OH. O 27-OH também pode transpassar a BHE e alcançar o fígado, onde é eliminado (HAVERIN et al., 2005). Contudo, a maioria do 27-OH flui da circulação para o cérebro. Uma vez que há uma alta correlação entre os níveis de colesterol e 27-OH na circulação sanguínea, um aumento nos níveis de colesterol plasmático poderia levar a um aumento nos níveis de 27-OH no cérebro (BABIKER et al., 2005; MULDER, 2009).

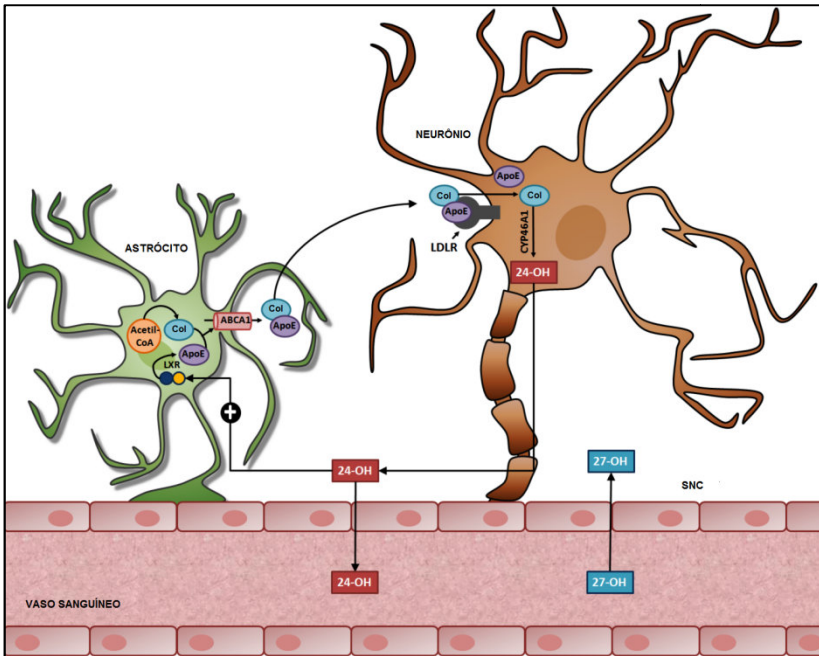


Figura 3. Homeostase do colesterol (Col) no SNC. Os astrócitos sintetizam essencialmente todo o colesterol necessário no cérebro adulto, não dependendo do colesterol periférico. O transporte de colesterol para os neurônios requer a ligação do colesterol a apoE. O processo é controlado por membros da família dos transportadores do cassete de ligação ao ATP (ABCA1 e ABCG1). O complexo apoE-colesterol é captado por neurônios via endocitose por meio de receptores específicos pertencentes à família de receptores de LDL. O cérebro elimina o excesso de colesterol por meio da formação e excreção na circulação de oxisteróis, como o 24-hidroxicolesterol (24-OH), o qual, ao contrário do colesterol, é capaz de transpassar a BHE. (Adaptado de Karasinska e Hayden, 2011).

1.3. Definindo hipercolesterolemia: quão alto é realmente alto?

Um dos principais fatores que limitaram o progresso no estudo da hipercolesterolemia foi o equívoco em como se definir o valor de referência “normal” no caso do colesterol sanguíneo. A prática quase universal em medicina clínica era (e ainda é) medir uma variável biológica (como, por exemplo, a concentração de sódio sanguíneo) em um grande número de indivíduos “saudáveis”, e determinar uma faixa que concentre um determinado percentual da população.

Especificamente, fixava-se um percentual de 95% e a faixa de referência consistiria em determinar o percentil de ordem 2,5 e 97,5 (Figura 4A). Por este critério, qualquer colesterol abaixo de 300 mg/dL deveria (e realmente era) ser considerado “normal”. A Figura 4B ilustra, com dados de colesterol plasmático obtidos de homens “saudáveis” do estudo *Framingham Heart Study*¹, que, de fato, um colesterol plasmático de 300 mg/dL se encontra abaixo do percentil de ordem 97,5, o que indicaria este valor como “normal”.

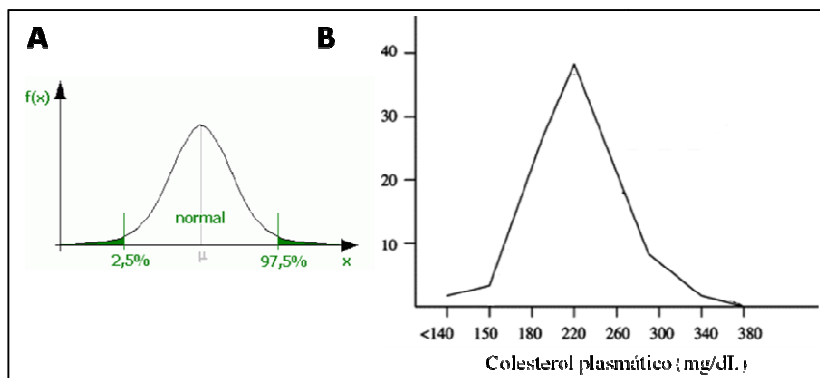


Figura 4. (A) Ilustração gráfica de distribuição normal e intervalo de referência, (B) Frequência de distribuição de níveis de colesterol plasmáticos de homens “saudáveis”. Dados obtidos no Framingham Heart Study (adaptado de Bellinger, 2004).

Atualmente, um colesterol plasmático igual ou maior que 240 mg/dL já é considerado muito alto, e associado com um aumento substancial no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo que este risco pode ser acentuadamente reduzido por meio da redução destes níveis (HEART PROTECTION STUDY COLLABORATIVE GROUP, 2002). De fato, o que acaba não sendo reconhecido é que os níveis de colesterol nas populações dos países ocidentais são “não saudavelmente” altos; ou seja, a curva de distribuição normal para toda a população é fortemente deslocada para a direita (STEINBERG, 2002). Especificamente no Brasil, um estudo conduzido em nove capitais e envolvendo 8.045 indivíduos com idade

¹ **Framingham Heart Study** estudo de coorte iniciado em 1948, com o objetivo de identificar fatores comuns e características que contribuem para a incidência de doenças cardiovasculares. O projeto é conduzido pelo National Heart, Lung, and Blood Institute, em conjunto com a Boston University.

média de 35 ± 10 anos, mostrou que 38% dos homens e 42% das mulheres possuem níveis de colesterol total acima de 200 mg/dL (SPOSITO et al., 2007). Segundo dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), 77 milhões de brasileiros têm níveis de colesterol elevados. Desta forma, e devido ao alto índice de mortes em decorrência de infartos e derrames (300 mil por ano), o governo brasileiro instituiu, em 2003, o dia 08 de agosto como o Dia Nacional do Controle do Colesterol. A figura 5 ilustra os valores de referência para o perfil lipídico em adultos de acordo com o Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue dos Estados Unidos.

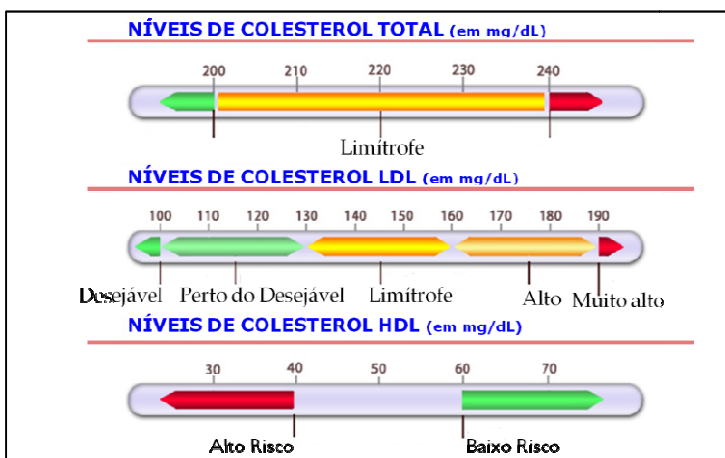


Figura 5. Valores de referência para o perfil lipídico em adultos de acordo com *Executive Summary of Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. The National Heart, Lung, and Blood Institute.* <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/index.htm>. Acesso em: 09 de junho de 2013.

1.4. Hipercolesterolemia familiar

A hipercolesterolemia familiar é uma doença genética do metabolismo das lipoproteínas cujo modo de herança é autossômico codominante e que se caracteriza por níveis muito elevados de colesterol plasmático (GOLDSTEIN; BROWN, 1978). O fenótipo clínico de hipercolesterolemia familiar é geralmente decorrente de defeitos no gene *LDLR*, que codifica o receptor de LDL, sede de mais de 1.600 mutações descritas até o momento. O fenótipo clínico de hipercolesterolemia

familiar também pode ser secundário a defeitos no gene *APOB*, que codifica a apolipoproteína B-100 (ApoB100), sendo que a apoB-100 defeituosa possui menor afinidade pelo receptor de LDL (SORIA et al., 1989). Salienta-se, ainda, um catabolismo acelerado do receptor de LDL, devido a mutações com ganho de função no gene *PCSK-9* (pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9), que codifica a proteína NARC-1, que participa do catabolismo do receptor de LDL (ABIFADEL et al., 2003).

Clinicamente, a hipercolesterolemia familiar pode se apresentar de duas formas. Destas, a heterozigótica se apresenta como a mais comum (1:500) e se caracteriza por apresentar níveis de colesterol entre 300 a 400 mg/dL, e níveis de triglicerídeos ligeiramente elevados. Pode ser detectada desde o nascimento, porém, na maioria dos casos, só são diagnosticados após algum evento vascular (LYANAGE et al., 2011). O risco de infarto do miocárdio e morte coronariana é aumentado em mais de dez vezes em indivíduos com hipercolesterolemia familiar heterozigótica e com menos de sessenta anos de idade (STONE et al., 1974). Nove em cada dez pacientes com hipercolesterolemia familiar heterozigótica morrem por doença cardíaca coronariana, em comparação a três em cada dez na população em geral (SANTOS et al., 2012). Desta forma, a expectativa média de vida de indivíduos com hipercolesterolemia familiar heterozigótica é em torno de dez anos menor do que a da população em geral. Por outro lado, a forma homozigótica da doença é mais rara (1:1.000.000), e se caracteriza por sinais como xantomas (lesões de acúmulo de gordura na pele ou sobre tendões) e arco corneano lipídico (halo esbranquiçado ao redor da córnea), além de níveis de colesterol acima de 500 mg/dL (LYANAGE et al., 2011).

Na hipercolesterolemia familiar, ocorrem defeitos genéticos afetando o receptor de LDL e que resultam em diminuição da endocitose da lipoproteína. As várias centenas de polimorfismos no gene do receptor de LDL podem afetar tanto a estrutura do receptor que liga a apoB-100 presente na LDL quanto outros domínios da lipoproteína, e, até mesmo, a recirculação dos receptores que, normalmente, são reciclados após a endocitose, voltando à membrana celular (LYANAGE et al., 2011). Defeitos na apoB-100, bem mais raros do que os do receptor de LDL, também são causa de hipercolesterolemia grave, mas a designação hipercolesterolemia familiar refere-se aos defeitos do receptor (SANTOS et al., 2012). Assim descrita, a hipercolesterolemia familiar é um defeito de remoção das LDL da circulação. Como as partículas de LDL circulam por mais tempo nos pacientes com

hipercolesterolemia familiar, essas estão mais sujeitas, por exemplo, à oxidação. Isso resulta na captação aumentada da LDL modificada (oxidada) pelos macrófagos, deflagrando mecanismos pró-aterogênicos (SANTOS et al., 2012).

1.5. Modelos experimentais para o estudo da hipercolesterolemia

Para a indução de hipercolesterolemia em animais, têm-se utilizado dietas contendo colesterol, as quais variam de rações comerciais suplementadas com níveis substancialmente diferentes de colesterol, assim como modificações nas porções de lipídeos e carboidratos (DORNAS et al., 2010). Muito dos trabalhos prévios envolvendo hipercolesterolemia e aterosclerose vieram de estudos utilizando coelhos. O modelo de coelho alimentado com colesterol é notável pelo rápido desenvolvimento de lesões aórticas e baixo custo para manutenção, sendo um regime típico para indução de aterosclerose envolvendo suplementação de 0,5% a 4% de colesterol por peso em, aproximadamente, 8 a 16 semanas. Nessas condições, coelhos tornam-se rapidamente hipercolesterolêmicos (com colesterol plasmático > 1.000 mg/dL) (DORNAS et al., 2010).

Por outro lado, ratos e camundongos, quando alimentados com uma dieta normal, com baixo teor de gordura, não desenvolvem aterosclerose naturalmente. Além disso, estas espécies, devido a um sistema metabólico bastante eficiente no que tange a mobilização e o metabolismo do colesterol, tendem a responder brandamente a dietas hipercolesterolêmicas, desenvolvendo hipercolesterolemia leve e apenas estrias gordurosas no arco aórtico (PAIGEN et al., 1990). Desta forma, destaca-se o surgimento de camundongos geneticamente modificados, os quais solucionaram muitos problemas relacionados ao estudo experimental da hipercolesterolemia e aterosclerose (OHASHI et al., 2004). Os camundongos com deleção gênica de apolipoproteína E (apoE^{-/-}) ou do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) são amplamente empregados na atualidade e ambos fornecem uma ferramenta prática para o estudo da hipercolesterolemia e suas consequências (ZADELAAR et al., 2007).

O camundongo LDLr^{-/-}, desenvolvido em 1991 por Ishibashi e colaboradores, é reconhecido como um modelo de hipercolesterolemia familiar humana (ZADELAAR et al., 2007). O camundongo LDLr^{-/-} apresenta hipercolesterolemia, caracterizada por níveis moderados de colesterol LDL quando submetidos a uma dieta padrão, podendo desenvolver lesões ateroscleróticas em longo prazo. Contudo, quando estes são alimentados com dieta rica em colesterol, tornam-se

severamente hipercolesterolêmicos com o desenvolvimento de intensa aterosclerose aórtica e xantomas subcutâneos (ISHIBASHI et al., 1993; KOWALA et al., 2000; DAUGHERTY, 2002). Algumas características deste modelo animal podem trazer vantagens para sua utilização, tais como: (1) semelhança à condição humana de hipercolesterolemia familiar, causada por mutações no gene para o receptor de LDL; (2) o perfil de lipoproteínas plasmáticas, que se assemelha ao de humanos, estando a maior parte do colesterol confinado na fração LDL; e (3) o grau de dislipidemia intermediário, desenvolvendo lesões menos avançadas do que os camundongos apoE^{-/-} (ZADELAAR et al., 2007).

1.6. Hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares

Em 1913, o patologista russo Nikolaj N. Anitschkow (1885-1964) observou que a adição de colesterol purificado à dieta de coelhos induzia lesões vasculares muito semelhantes às observadas na aterosclerose humana (ANITSCHKOW; CHALATOV, 1913; ANITSCHKOW, 1913). Esta descoberta estabeleceu uma nova época para os estudos acerca da aterosclerose, os quais, posteriormente, culminaram em uma série de ensaios clínicos de larga escala, que mostraram conclusivamente que a correção da hipercolesterolemia ocasiona uma redução significativa na morbidade e mortalidade por doença arterial coronariana (STEINBERG, 2002). Não surpreendentemente, a elucidação do papel do colesterol na patogênese da aterosclerose é frequentemente referida como uma das grandes descobertas do século XX (MEHTA; KHAN, 2002).

Contudo, até o final da década de 1980, estratégias para a correção da hipercolesterolemia apresentavam limitada eficácia. A essa época, as opções clínicas eram limitadas a mudanças na dieta, fármacos sequestradores de ácidos biliares², fibratos³ e o probucol⁴. Por exemplo, para reduzir o colesterol plasmático em indivíduos com hipercolesterolemia familiar, resinas sequestradoras de ácidos biliares eram usadas desde a década de 1970 (SIMONS; WILLIAMS, 1976),

² Estes agentes sequestram os ácidos biliares no intestino. Em consequência, ocorrem redução da absorção do colesterol exógeno e aumento do metabolismo do colesterol endógeno em ácidos biliares (RANG et al., 2003).

³ Os fibratos ou derivados do ácido fibrico aumentam a atividade da lipoproteína-lipase, aumentando a degradação dos quilomícrons e das VLDL no músculo e tecido adiposo, e intensificam a depuração das LDL pelo fígado (RANG et al., 2003).

⁴ Antioxidante poderoso. Contudo, diminui tanto os níveis de LDL quanto os de HDL. Seu mecanismo de ação não é totalmente elucidado e está associado a diversos efeitos colaterais (RANG et al., 2003).

porém seus efeitos são limitados a uma redução de cerca de 10% nos níveis de colesterol, pois a diminuição da reabsorção de ácidos biliares ocasiona uma concomitante indução da síntese de colesterol hepático.

Porém, no início da década de 1970, o microbiologista japonês Akira Endo, durante uma pesquisa com agentes microbiais, descobriu que culturas de fungos *Penicillium citrinum* produziam um potente inibidor da enzima limitante da velocidade da biossíntese do colesterol (HMG-CoA redutase) (ENDO et al., 1977). A partir dos estudos de Akira Endo, em 1978, no centro de pesquisas do Laboratório Merck, foi isolada a lovastatina (inibidor competitivo da enzima HMG-CoA redutase) a partir de culturas de fungos *Aspergillus terreus* (ALBERTS et al., 1980). A lovastatina foi aprovada para comercialização em 1987, permitindo aos médicos uma forma eficaz de redução nos níveis de colesterol plasmático dos pacientes. Como exemplo, a lovastatina, em uma dose diária de 80 mg, produz uma redução média do colesterol LDL de cerca de 40%; uma redução muito maior do que poderia se obter com qualquer outro tratamento disponível à época (LOVASTATIN STUDY GROUP IV. A MULTICENTER COMPARISON OF LOVASTATIN AND PROBUCOL FOR TREATMENT OF SEVERE PRIMARY HYPERCHOLESTEROLEMIA, 1990).

Diversos estudos clínicos de larga escala com estatinas têm mostrado que esta classe de fármacos é capaz de reduzir o risco de eventos cardíacos ou infarto em populações hipercolesterolêmicas (THE LONG-TERM INTERVENTION WITH PRAVASTATIN IN ISCHAEMIC DISEASE STUDY GROUP, 1994; NAKAMURA et al., 2006). A redução efetiva dos níveis de LDL por estatinas também foram demonstradas em indivíduos com hipercolesterolemia familiar heterozigótica (MABUCHI et al., 1981; HARADA-SHIBA et al., 2010). A partir do desenvolvimento da lovastatina, seguiu-se o desenvolvimento de outras estatinas pelas indústrias farmacêuticas, como a sinvastatina (derivado semissintético da lovastatina, aprovada para comercialização em 1988), a pravastatina (derivado da compactina, aprovada para comercialização em 1991), e estatinas totalmente sintéticas, como a fluvastatina (comercializada a partir de 1994), atorvastatina (1997), cerivastatina (1998) e a rosuvastatina (2003). A redução média dos níveis de colesterol LDL atingível com a dose máxima recomendada de diferentes estatinas varia de 35% até 55% (HAJAR, 2011). Não é surpreendente, desta forma, que as vendas de estatinas alcançaram faturamento recordes nos anos que sucederam aos seus lançamentos. Ilustrando, o faturamento de toda a classe de estatinas

foi de \$35,3 bilhões em todo o mundo em 2009 e de \$19,7 bilhões em 2012⁵.

As estatinas reduzem a mortalidade cardiovascular e a incidência de eventos isquêmicos coronários agudos, necessidade de revascularização do miocárdio e acidente vascular cerebral. De fato, a partir do advento da terapia com estatinas, a expectativa de vida de indivíduos com hipercolesterolemia familiar tem aumentado drasticamente (SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE ON BEHALF OF THE SIMON BROOME REGISTER GROUP. MORTALITY IN TREATED HETEROZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: IMPLICATIONS FOR CLINICAL MANAGEMENT, 1999).

Por outro lado, o avanço no tratamento de doenças associadas com uma alta mortalidade, como as doenças cardiovasculares, 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. De modo interessante, diversos estudos vêm se observando que muitos fatores de risco cardiovasculares, como a hipertensão, diabetes mellitus, e a própria hipercolesterolemia também são considerados fatores de risco para doenças neurodegenerativas, em especial, para a doença de Alzheimer (CASSERLY; TOPOL, 2004; BEACH et al., 2007). Ademais, estes fatores de risco vasculares podem ainda serem influenciados por fatores genéticos, como a presença do alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE*, o qual tem um papel bem estabelecido na doença arterial coronariana e no desenvolvimento da aterosclerose, mas que, mais recentemente, também foi associado com a doença de Alzheimer (STRITTMATTER et al., 1993).

1.7. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é a principal doença neurodegenerativa relacionada à idade e é caracterizada por um declínio progressivo e irreversível no número de neurônios colinérgicos que se projetam, principalmente, do prosencéfalo basal para áreas corticais e formação hipocampal, sendo a causa mais comum de prejuízos cognitivos em pessoas com mais de 65 anos de idade (GALLAGHER; COLOMBO,

⁵ Com o vencimento de patentes de muitas estatinas, como a da atorvastatina (Lipitor, Pfizer) em 2010, há o consequente desenvolvimento de medicamentos genéricos, alternativas mais econômicas, o que diminui o faturamento global na venda desta classe de fármacos.

1995; GOEDERT; SPILLANTINI, 2006). Clinicamente, esta neuropatologia é caracterizada por um severo prejuízo cognitivo, perda de memória e mudanças na personalidade (como, por exemplo, uma mistura de comportamento agressivo com delírios) (GALLAGHER; COLOMBO, 1995; GOEDERT; SPILLANTINI, 2006). O tratamento farmacológico utilizado atualmente na doença é representado, fundamentalmente, pela memantina (bloqueador de baixa afinidade do canal aberto de Ca^{2+} dos receptores N-metil-D-aspartato [NMDA]) e por inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) (como o donepezil e a galantamina) (GRUTZENDLER; MORRIS, 2001). Entretanto, estas representam alternativas basicamente paliativas, que proporcionam benefícios sintomáticos sobre a cognição e o comportamento dos pacientes acometidos. Cabe ressaltar que, embora alguns estudos tenham levantado a hipótese de efeitos neuroprotetores destas terapias (NORDBERG, 2006; WU et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2013), estes efeitos ainda não foram claramente demonstrados, permanecendo o debate científico (MANGIALASCHE et al., 2010). Desta forma, os esforços estão direcionados na identificação de terapias que modifiquem o curso da doença, sendo que, atualmente, muitos compostos estão em fase de testes (ensaios clínicos de fase 1 a 3) (ClinicalTrials.gov).

A idade (envelhecimento) é o principal fator de risco para a doença de Alzheimer. Esta doença pode ser clinicamente dividida como de início precoce (pacientes com menos de 65 anos) e de início tardio (pacientes com mais de 65 anos) (BRAAK; BRAAK, 1991), sendo a de início tardio responsável por 95% de todos os casos da doença (TANZI; BERTRAM, 2001). Ambas as formas da doença podem apresentar um componente genético. Neste sentido, mutações causais em, pelo menos, três genes foram identificadas nas formas precoces da doença (LEVY et al., 1990; GOATE et al., 1994; LEVY-LAHAD et al., 1995). Porém, com exceção de algumas famílias com herança autossômica dominante, o padrão de herança, na maioria dos casos da doença, não é claro, sendo, possivelmente, que esta doença seja causada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais. De fato, estudos com gêmeos mostraram que a hereditariedade de formas tardias da doença é um fator determinante em 58% a 78% dos casos, mostrando, desta forma, o envolvimento de fatores ambientais (GATZ et al., 2006). Por muitos anos, apenas um fator de risco, o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE*, estava fortemente implicado na doença de Alzheimer de início tardio. Contudo, avanços tecnológicos (como os estudos de associação genética em larga escala), já identificaram mais de dez fatores de risco genéticos para a doença de Alzheimer de início tardio (HAROLD et al., 2009;

HOLLINGWORTH et al., 2011; NAJ et al., 2011). Neste sentido, estes genes estão chamando a atenção para outras vias fisiológicas que podem estar associadas com a doença, como o metabolismo lipídico, o sistema imune e vias de funcionamento sináptico (BATTENS et al., 2013).

Neuropatologicamente, a doença de Alzheimer é caracterizada pelo acúmulo de emaranhados neurofibrilares intracelulares e placas amiloides extracelulares em determinadas regiões cerebrais (HARDY et al., 2006). As placas consistem em agregados extracelulares de pequenos filamentos de 8 nm denominados β -amiloide (MANN, 1989). Inicialmente, no curso da doença, regiões cerebrais específicas, como o hipocampo, amígdala e córtex entorrinal, são afetadas (BRAAK; BRAAK, 1997). O peptídeo β -amiloide é gerado por uma clivagem sequencial da proteína transmembrana precursora amiloide (APP) por grupos de enzimas denominadas α -, β -, e γ -secretase. A clivagem e o processamento da APP podem ser divididos nas vias *não-amiloidogênica e amiloidogênica*. Na via não-amiloidogênica, a APP é clivada pela α -secretase produzindo um grande ectodomínio (N)-terminal (sAPP α), o qual é secretado no meio extracelular (HAASS et al., 1993; LAFERLA et al., 2007). Devido a essa clivagem ocorrer dentro da região da β -amiloide, a formação deste peptídeo é inibida (LAFERLA et al., 2007). Na via amiloidogênica, a β -amiloide é gerada por uma clivagem inicial da APP na região (N)-terminal pela β -secretase (BACE), seguida de uma clivagem no domínio transmembrana pela γ -secretase. A γ -secretase é um complexo de enzimas compostas pela presenilina 1 e 2 (PS1 e PS2). A γ -secretase cliva a proteína β -amiloide nas posições 40 e 42 gerando o peptídeo β -amiloide-40 e β -amiloide-42, respectivamente. Aproximadamente 10% dos peptídeos existentes consistem na β -amiloide-42 enquanto que a β -amiloide-40 é predominantemente produzida. Entretanto, a β -amiloide-42 é a principal isoforma das placas amiloides devido a sua natureza fibrilar (LAFERLA et al., 2007).

Até o momento, a hipótese da cascata amiloide é a mais utilizada e aceita para explicar as alterações neuropatológicas observadas na doença de Alzheimer. Esta hipótese foi primeiramente proposta por Hardy e Higgins em 1992, os quais propuseram que a demência na doença de Alzheimer depende da morte neuronal causada pelas fibras amiloides, as quais são encontradas nas placas amiloides. De fato, durante muitos anos, as placas amiloides foram consideradas o achado fisiopatológico decisivo para a caracterização e desenvolvimento da doença de Alzheimer. Contudo, diversas evidências vêm demonstrando que estas placas se correlacionam fracamente com o declínio cognitivo

observado na doença (McLEAN et al., 1999; NASLUND et al., 2000). Ademais, foi demonstrado, em um modelo experimental da doença de Alzheimer, que a imunização passiva de camundongos com anticorpos monoclonais anti-peptídeo β -amiloide reverteu os déficits cognitivos dos animais, contudo, sem reduzir as placas amiloides, possivelmente através do aumento da remoção e/ou sequestro de espécies solúveis do peptídeo β -amiloide (DODART et al., 2002; KOTILINEK et al., 2002). Neste sentido, a hipótese da cascata amiloide foi aprimorada ao longo dos anos, propondo um mecanismo alternativo de perda de memória baseado no impacto de oligômeros pequenos e solúveis do peptídeo β -amiloide nas sinapses neuronais (HAASS; SELKOE, 2007; FERREIRA; KLEIN, 2011). Atualmente, tem sido proposto que o aumento gradual nos níveis do peptídeo β -amiloide (especialmente na forma de oligômeros solúveis de β -amiloide) na fenda sináptica promove inicialmente alterações na plasticidade sináptica, ativação de células gliais e liberação de mediadores inflamatórios, hiperfosforilação da proteína tau e formação de emaranhados neurofibrilares, e, finalmente, agregação de peptídeos β -amiloide e formação das placas amiloides ou senis. Estes eventos induzem a progressiva perda neuronal associada a múltiplas disfunções nos sistemas de neurotransmissores e déficit cognitivo (HAASS; SELKOE, 2007; FERREIRA; KLEIN, 2011). Especificamente, os déficits cognitivos observados nas fases iniciais da doença de Alzheimer são atribuídos a uma disfunção sináptica induzida pelos oligômeros do peptídeo β -amiloide, enquanto que em estágios mais tardios da doença, estes déficits são atribuídos à degeneração e morte celular induzida pelos oligômeros do peptídeo β -amiloide (FERREIRA; KLEIN, 2011).

A degeneração de neurônios e sinapses no cérebro de indivíduos com doença de Alzheimer é localizada, predominantemente, em regiões em que se projetam para e/ou em áreas que apresentam alta densidade de placas e emaranhados neurofibrilares. Entre as regiões severamente afetadas, se incluem o hipocampo, o córtex entorrinal, amígdala, neocórtex, e algumas regiões subcorticais, que incluem os neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe, e neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* (BRAAK; BRAAK, 1994; GEULA; MESULAM, 1994; DEKOSKY et al., 1996; KAR et al., 2004). Investigações bioquímicas a partir de biópsia e autópsia indicam que diversos neurotransmissores e moduladores, incluindo a acetilcolina, serotonina, noradrenalina e somatostatina, são diferentemente alterados no cérebro de indivíduos com doença de Alzheimer (GEULA; MESULAM, 1994; FRANCIS et

al., 1999). O evento primário, e mais consistentemente reproduzido, é uma profunda redução na atividade da enzima de síntese da acetilcolina, colina acetiltransferase (ChAT), no neocórtex, evento que se correlaciona positivamente com a severidade da demência (DAVIES; MALONET, 1976; PERRY et al., 1978; AULD et al., 2002). De fato, reduzida captação de colina, liberação de acetilcolina e perda de neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal indicam um déficit colinérgico pré-sináptico seletivo no hipocampo e neocórtex de indivíduos com doença de Alzheimer (KAR et al., 2004). Neste sentido, drogas que potencializam a função colinérgica central (como os inibidores da enzima acetilcolinesterase; enzima responsável por finalizar a neurotransmissão colinérgica ao rapidamente hidrolisar a acetilcolina) apresentam um importante efeito no tratamento sintomático da doença de Alzheimer (TRINH et al., 2003).

Os neurônios colinérgicos no SNC encontram-se, principalmente, no prosencéfalo basal e no tronco cerebral superior, além de interneurônios presentes no corpo estriado, núcleo accumbens, hipocampo, hipotálamo, neocórtex, e na medula espinhal (MARTINEZ-MURILLO; RODRIGO, 1995). Em 1983, Mesulam e colaboradores classificaram os neurônios colinérgicos do SNC do rato, de acordo com a localização do seu corpo celular, de Ch1 a Ch8. Especificamente, os neurônios presentes no prosencéfalo basal projetam-se para o neocórtex, hipocampo, bulbo olfatório e amígdala (grupos Ch1-Ch4). Os neurônios pontomesencefálicos projetam-se para o mesencéfalo (grupos Ch5-Ch6). Já os grupos Ch7 e Ch8 têm inervação limitada, que inclui o núcleo interpeduncular e o colículo superior. No neurônio pós-sináptico da neurotransmissão colinérgica, apresentam-se dois tipos de receptores, os nicotínicos (nAChRs) e os muscarínicos (mAChRs). Os nAChRs são receptores do tipo canal iônico que permitem a despolarização da membrana neuronal devido à sua permeabilidade à Na^+ , K^+ e Ca^+ . Os mAChRs são receptores metabotrópicos acoplados à proteína G e podem ser do tipo excitatório ou inibitório (VIZI; LAJTHA, 2008).

Há muito tempo, já se sabe que agentes como os alcaloides tropânicos, que hoje são conhecidos por bloquear o sítio muscarínico dos receptores colinérgicos, resultam em déficits de memória. O envolvimento do sistema colinérgico no aprendizado e na memória foi, primeiramente, postulado por Deutsch, em 1971, e, posteriormente, corroborado por estudos farmacológicos de Drachman e Leavitt (1974) que demonstraram que drogas anticolinérgicas prejudicavam o desempenho cognitivo de pacientes jovens e saudáveis a um nível similar a demência, enquanto que o aumento da transmissão colinérgica

umentava o desempenho cognitivo de pacientes idosos (DRACHMAN, 1977). Particularmente, projeções colinérgicas partem de núcleos do prosencéfalo basal, como (i) o núcleo septal medial e a porção vertical da banda diagonal, para o hipocampo, e (ii) do núcleo basal de Meynert para o neocórtex (WEVERS, 2011). Esta divisão anatômica do sistema colinérgico ao neocórtex e ao hipocampo medeia a modulação colinérgica na memória operacional (CROXSON et al., 2011) e em memórias espaço-temporais (DEIANA et al., 2011), respectivamente.

1.8. Hipercolesterolemia e doença de Alzheimer

Evidências acumuladas ao longo das duas últimas décadas apontam para uma associação entre a hipercolesterolemia e a patologia da doença de Alzheimer esporádica (SPARKS et al., 1990; SPARKS et al., 1994; KUO et al., 1998; SOLOMON et al., 2009). O primeiro relato de que o colesterol poderia estar envolvido na patogênese da doença de Alzheimer foi descrito há mais ou menos vinte anos a partir de um estudo pioneiro do patologista Larry Sparks e colaboradores, publicado em 1990 no periódico científico *Neurobiology of Aging*. Neste estudo, os autores observaram que em torno de 70% dos indivíduos que haviam falecido em decorrência de doença arterial coronariana também apresentavam placas amiloides em seus cérebros – uma das características patológicas que definem a doença de Alzheimer. 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, o que levou Sparks e seus colaboradores a suspeitarem de uma ligação entre os altos níveis de colesterol plasmático e a doença de Alzheimer.

Dois anos depois, a conexão entre o colesterol e a doença de Alzheimer ganhou um novo impulso em consequência de um estudo de ligação genética conduzido por Allen Roses e colaboradores, publicado no conceituado periódico científico *PNAS* em 1993. Este estudo identificou uma variante particular de um gene que codifica para a apoE como um fator de risco para a doença de Alzheimer. Em humanos, existem três alelos principais do gene *APOE*, decorrentes de apenas duas alterações no DNA, chamados de $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. A identificação da variante $\epsilon 4$ do gene *APOE*, como o fator de risco genético mais comum para a doença de Alzheimer de início tardio, sugeriu que o colesterol pode ter um papel direto na patogênese da doença, uma vez que a apoE é o principal transportador de colesterol no SNC, apresentando um importante papel na mobilização e redistribuição do colesterol, e outros

lipídeos cerebrais na reparação, crescimento e manutenção das células nervosas (KIVIPELTO et al., 2002). Não é surpreendente que este é um campo em rápido crescimento nas Neurociências, e, como mostrado na Figura 6, o número de artigos contendo os termos “*hypercholesterolemia*” e “*Alzheimer*” no título, resumo ou palavras-chave tem aumentado dramaticamente na última década (2000 – 2010).

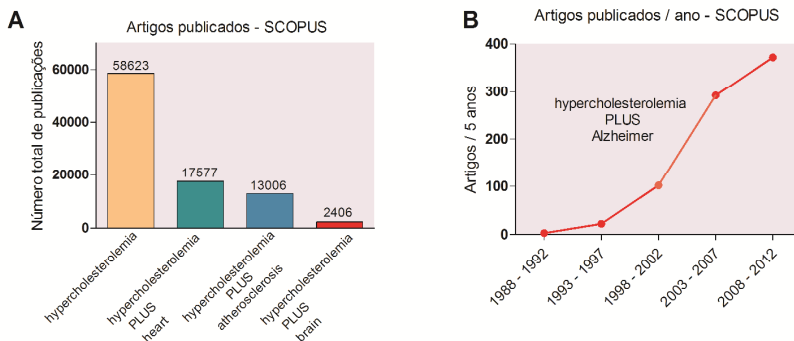


Figura 6. Painei A ilustra o número total de publicações (“todos os anos”) contendo as palavras “*hypercholesterolemia*”, “*hypercholesterolemia + heart*”, “*hypercholesterolemia + atherosclerosis*”, e “*hypercholesterolemia + brain*” na base de dados SCOPUS (resumo, título e palavras-chave). O painei B ilustra uma linha do tempo acerca das publicações contendo as palavras “*hypercholesterolemia + Alzheimer*” entre os anos de 1988 e 2012 no SCOPUS. Data de acesso: 12/07/2013.

Na sequência temporal dos estudos acerca da associação entre hipercolesterolemia e a doença de Alzheimer, o primeiro relato experimental também foi de Larry Sparks e colaboradores. Em um estudo publicado em 1994 no periódico *Experimental Neurology*, os pesquisadores mostraram que coelhos alimentados por, pelo menos, quatro semanas com uma dieta enriquecida com colesterol (2%) desenvolveram placas amiloides cerebrais e outros sinais patológicos relacionados à doença de Alzheimer. Ademais, em uma sequência elegante de experimentos, os pesquisadores demonstraram que a mudança da dieta hipercolesterolêmica para uma dieta padrão reduzia o número de placas amiloides cerebrais. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que a administração de probucol, uma droga hipolipemiante, era capaz de reduzir significativamente as placas amiloides em coelhos submetidos à dieta rica em colesterol (SPARKS et al., 1994).

Entretanto, o exato mecanismo pelo qual a hipercolesterolemia levaria a um aumento das placas amiloides cerebrais ainda não estava completamente entendido, principalmente porque o colesterol não é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica (DIETSCHY e TURLEY, 2001). O próprio Sparks e seu colaborador Wolfgang Streit tentaram se aproximar de uma resposta mais definitiva em um estudo publicado em 1997. Há época, já estava bem estabelecido o envolvimento da ativação de células microgliais na deposição da proteína β -amiloide (MRAK et al., 1995; GIULIAN et al., 1996). Nesse estudo publicado em 1997, Sparks e Streit notaram a ocorrência de uma alta ativação microglial no cérebro de pacientes com doença cardíaca em comparação a pacientes sem doença cardíaca. Ademais, as mesmas análises foram feitas em coelhos mantidos em uma dieta hipercolesterolêmica, e também revelaram um aumento da ativação microglial e infiltração de leucócitos ao SNC. Coletivamente, essas observações sugeriram que a hipercolesterolemia e a doença cardíaca acelerariam o processo de envelhecimento cerebral, e que a formação de placas senis poderia ser o resultado final da ativação microglial progressiva que ocorre com o envelhecimento.

Em uma análise retrospectiva, o que se pode observar é que, a partir dos estudos de Sparks e colaboradores, duas vertentes no estudo da interação entre hipercolesterolemia e doença de Alzheimer se abriram. A primeira caracteriza-se por estudos prospectivos, baseados em populações, com o objetivo de qualificar a hipercolesterolemia como um fator de risco para a doença de Alzheimer. A outra vertente é baseada em estudos com animais de laboratório e com objetivo de caracterizar os prejuízos cognitivos induzidos pela hipercolesterolemia, bem como avaliar os mecanismos moleculares subjacentes aos prejuízos cognitivos.

1.9. Estudos epidemiológicos

Em 1993, em um artigo publicado no periódico *Neurological Research*, o pesquisador Jack C. de la Torre propôs uma hipótese vascular para doença de Alzheimer esporádica (*Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease?*). Posteriormente, em um estudo publicado no periódico *Acta Neuropathologica* em 1999, de la Torre e colaboradores propuseram a associação entre envelhecimento e fatores de risco cardiovasculares (como, por exemplo, aterosclerose das artérias carótidas) como um gatilho primário levando à hipoperfusão

cerebral, a mudanças neurodegenerativas e ao eventual início da doença de Alzheimer.

Esta hipótese vascular da doença de Alzheimer esporádica proposta por de la Torre, somada às observações iniciais de Larry Sparks, contribuíram para a elaboração de diversos estudos epidemiológicos com o intuito de demonstrar a associação entre hipercolesterolemia e a doença de Alzheimer esporádica. Em especial, um estudo publicado por Kivipelto e colaboradores, em 2001, no periódico *BMJ*, demonstrou que indivíduos que apresentam elevados níveis de colesterol plasmático ($\geq 6,5$ mmol/L⁶) durante a meia-idade apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de comprometimentos cognitivos leves e doença de Alzheimer em idades mais avançadas. Este estudo utilizou dados de estudos anteriores (por exemplo, o Projeto Norte Karelia na Finlândia, feito na década de 1970, e que foi um grande programa de prevenção de doenças cardiovasculares), e convidou os participantes para uma reavaliação em 1998 (ao total, 1449 indivíduos participaram). De fato, como mostra a figura 7, estudos que visualizaram uma correlação positiva entre hipercolesterolemia e o desenvolvimento da doença de Alzheimer foram conduzidos com pacientes mais jovens. Contudo, estudos conduzidos com pacientes mais idosos mostraram uma correlação negativa ou nenhuma correlação; desta forma, qualificando a hipercolesterolemia como um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer décadas após (SOLOMON et al., 2007).

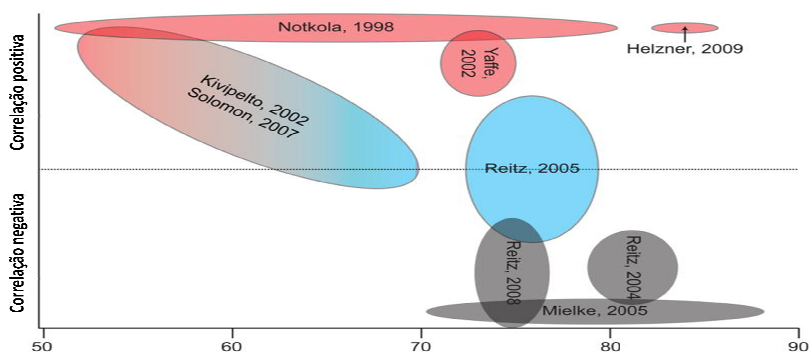


Figura 7. Relação entre a idade dos participantes e o resultado de estudos acerca dos efeitos da hipercolesterolemia no risco de

⁶ Os níveis de colesterol são medidos em miligramas (mg) de colesterol por decilitro (dL) de sangue nos Estados Unidos e no Brasil. No Canadá e na maioria dos países europeus, os níveis de colesterol são medidos em milimoles (mmol) por litro (L) de sangue. 6,5 mmol/L é igual a 251, 35 mg/dL.

desenvolvimento/progressão de demência (adaptado de Shepardson et al., 2011).

Curiosamente, estudos populacionais têm reportado uma prevalência significativamente menor de demência em idosos negros nigerianos quando comparados com idosos negros americanos (HANDRIE et al., 1995; HALL et al., 1996). Se existe uma origem genética comum entre os negros nigerianos e os negros americanos, diferenças em prevalência e manifestação de doenças poderiam ser explicadas por fatores ambientais. Interessantemente, negros nigerianos apresentam níveis de colesterol plasmáticos, bem como taxas de doença arterial coronariana, menores quando comparados com negros americanos (SEPEHRNIA et al., 1989; GILLUM et al., 1996). Ademais, um estudo prospectivo conduzido por Zambon e colaboradores, publicado em 2010 no periódico *The American Journal of Medicine*, utilizando 47 indivíduos com hipercolesterolemia familiar e 70 indivíduos sem hipercolesterolemia familiar com mais de 50 anos, demonstrou que pacientes com hipercolesterolemia familiar apresentam uma elevada incidência de comprometimento cognitivo leve em comparação a indivíduos sem hipercolesterolemia familiar.

O conceito comprometimento cognitivo leve é definido com a zona de transição entre o envelhecimento saudável e a demência leve (PETERSEN et al., 1999; MARIANI et al., 2007). Esta condição refere-se a indivíduos que têm algum grau de perda cognitiva quando comparados a pessoas normais da mesma faixa etária, mas que não preenchem critérios para demência, podendo representar, em alguns casos, um estágio de transição entre as alterações cognitivas que fazem parte do envelhecimento normal e os primeiros sintomas da doença de Alzheimer. Alguns estudos têm sugerido que o comprometimento cognitivo leve pode representar um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, tendo em vista a taxa de conversão para esta patologia, em torno de 10 a 15% ao ano, contrastando com a de indivíduos normais, em quem ela varia de 1 a 2% ao ano (BRUSCOLI; LOVESTONE, 2004).

1.10. Modelos experimentais de hipercolesterolemia e prejuízos cognitivos

A partir dos estudos preliminares de Larry Sparks, diversos grupos de pesquisa vêm avaliando os impactos da hipercolesterolemia sobre a função cognitiva de roedores com o uso de rações (dietas)

hipercolesterolêmicas. Além disso, alguns estudos têm utilizado estas dietas hipercolesterolêmicas em camundongos transgênicos utilizados como modelo experimental para a doença de Alzheimer. Mais recentemente, contudo, camundongos nocaute para o receptor de LDL e para a apoE estão sendo amplamente utilizados, sendo que alguns estudos têm caracterizado comportamentalmente essas linhagens, e outros estudos têm, ainda, avaliado os efeitos de dietas hipercolesterolêmicas sobre as funções cognitivas nesses animais. A tabela 1 resume algumas das principais evidências científicas relacionadas à hipercolesterolemia e a prejuízos cognitivos obtidas em estudos pré-clínicos.

Tabela 1. Evidências experimentais relacionando hipercolesterolemia a déficits cognitivos obtidas em estudos pré-clínicos.

Animais - Linhagem	Observação	Teste	Dieta	Duração da dieta	Aumento do colesterol	Ano	Autores
Camundongos apoE ^{-/-}	Prejuízo de memória espacial	Labirinto aquático de Morris	Dieta padrão	-	Não medido	1998	Zhou et al.
Camundongos LDLr ^{-/-}	Prejuízo de memória operacional	Alternância espontânea	Dieta padrão	-	Não medido	2004	Mulder et al.
Camundongos LDLr ^{-/-}	Prejuízo de memória espacial	Labirinto aquático de Morris	Dieta padrão	-	Não medido	2004	Mulder et al.
Camundongos (C57Bl/6)	Prejuízo de memória operacional	Labirinto aquático radial	1,25% coleste rol	2 meses	56%	2008	Thiruman galakudi et al.
Ratos (Sprague Dawley)	Prejuízo de memória espacial	Labirinto radial de 8 braços	5% coleste rol	5 meses	110%	2010	Ullrich et al.
Camundongos apoE ^{-/-}	Prejuízo de memória espacial	Labirinto radial de 8 braços	Dieta padrão	-	600%	2010	Evola et al.
Camundongos APP ^{OsK-Tg*}	Prejuízo de memória espacial	Labirinto aquático de Morris	2% coleste rol	1 mês	100%	2012	Umeda et al.

Contudo, os mecanismos moleculares que relacionam a hipercolesterolemia aos prejuízos ainda não foram completamente elucidados. Em especial, diversos estudos vêm avaliando a interação do colesterol da membrana plasmática e sua interação com a proteína precursora amiloide (APP), e conseqüente formação de peptídeos amiloides cerebrais. Por outro lado, outros estudos vêm avaliando a influência da hipercolesterolemia sobre a vasculatura cerebral, e que resulta em disfunção da BHE e neuroinflamação.

1.11. Colesterol e a formação do peptídeo β -amiloide

Em estudo publicado no periódico *Neurobiology of Disease* em 2000, Refolo e colaboradores corroboraram com os dados de Sparks (1994) ao demonstrarem que a exposição a uma dieta hipercolesterolêmica induz um aumento significativo nos níveis do peptídeo β -amiloide no SNC de camundongos PSAPP⁷ e que esse aumento se correlaciona fortemente com os níveis de colesterol plasmático. Ademais, este estudo mostrou que a hipercolesterolemia modula o processamento APP.

Uma possibilidade que vem sendo sugerida é que a enzima α -secretase, a qual previne a formação do peptídeo β -amiloide, necessita de membranas com menos colesterol, como os domínios fosfolipídicos ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, os quais são mais fluidos (KOJRO et al., 2001). De fato, um estudo de Simons e colaboradores, publicado no periódico *PNAS*, em 1998, demonstrou que a redução do colesterol da membrana (por meio de compostos extratores de colesterol, como a metil-beta-ciclodextrina) diminui a atividade da β -secretase, levando a uma diminuição na produção de β -amiloide. Por outro lado, o colesterol pode aumentar a atividade das enzimas β - e γ -secretase, as quais residem nos microdomínios lipídicos ricos em colesterol e aumentam a produção da β -amiloide (via amiloidogênica) (LAFERLA et al., 2007) (Figura 8). Corroborando com esta afirmação, um estudo de Kalvodova e colaboradores (2005) demonstrou que o colesterol estimula a atividade proteolítica da β -secretase. De fato, em experimentos utilizando cultivo primário de neurônios, quando estes foram tratados com estatinas, teve-se como resultado uma redução na formação do peptídeo β -amiloide (SIMONS et al., 1998).

⁷ Modelo de camundongo transgênico para doença de Alzheimer. Desenvolvem placas amiloides com o envelhecimento, semelhantes às observadas na doença de Alzheimer.

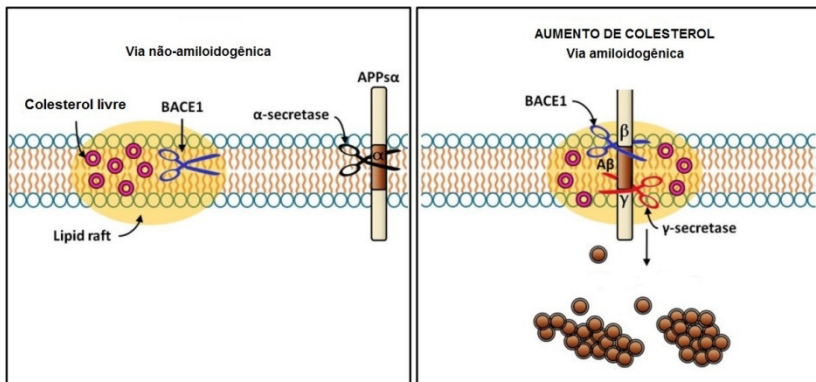


Figura 8. O aumento de colesterol nas membranas celulares pode afetar a produção do peptídeo β -amiloide cerebral. Em condições de aumento de colesterol celular, há uma associação da APP com a β -secretase (BACE-1) nos *lipid rafts*, estimulando a clivagem da APP no peptídeo β -amiloide (adaptado de DiPaolo e Kim, 2011).

Ademais, um crescente número de estudos vem investigando o papel do receptor de LDL e seu envolvimento com a formação do peptídeo β -amiloide. No cérebro, o receptor de LDL é predominantemente expresso nos astrócitos, neurônios e células endoteliais (BU, 2009). O ligante mais importante do receptor de LDL no SNC é a apoE, e, como esta apolipoproteína é o principal fator de risco genético da doença de Alzheimer de início tardio, pode-se supor, por consequência, uma importante ligação entre o receptor de LDL e a doença de Alzheimer (HOOIJMANS e KILIAAN, 2008). Nesta linha de evidência, um estudo de Cao e colaboradores, publicado no periódico *Neurobiology of Aging*, em 2006, utilizando camundongos Tg2576⁸, demonstrou que estes camundongos que também eram deficientes para o receptor de LDL desenvolviam amiloidose cerebral com a idade. Após a formação das placas, os camundongos Tg2576 deficientes para o receptor de LDL apresentavam prejuízos cognitivos significativamente maiores que os animais Tg2576 sem a deficiência nos receptores de LDL. Ademais, houve um aumento significativo na deposição amiloide. Estes mesmos resultados foram corroborados por um estudo de Katsouri e Georgopoulos publicado no periódico *Plos One* em 2011. Neste estudo, também se observou que a falta do receptor de LDL aumenta a

⁸ Modelo de camundongo transgênico para doença de Alzheimer. Desenvolvem placas amiloides com o envelhecimento, semelhantes às observadas na doença de Alzheimer.

deposição amiloide em um modelo da doença de Alzheimer em camundongos.

1.12. Hipercolesterolemia e disfunção vascular

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Acidente Vascular Cerebral (AVC) é definido como o desenvolvimento rápido de sintomas/sinais clínicos de um distúrbio focal (ocasionalmente global) da(s) função (ões) cerebral (ais), com duração superior a 24 horas ou que conduzam à morte, sem outra causa aparente para além da vascular (THE WHO MONICA PROJECT, 1988). O AVC contribui para o desenvolvimento de déficits cognitivos em, aproximadamente, 20% de pacientes idosos (MERINO; HACHINSKI, 2002; LINDEN et al., 2004; FEIGIN et al., 2010). Algumas características relacionadas ao AVC, como infartos múltiplos, lesões de matéria branca, infarto localizado no hemisfério esquerdo, atrofia e volume de tecido infartado, são associadas com um aumento no risco de demência após o AVC (RASQUIN et al., 2004). Neste sentido, anormalidades lipídicas vêm sendo implicadas na patogênese da doença cerebrovascular isquêmica⁹ (DEMCHUK et al., 1999; GOLDSTEIN, 2007). De fato, a hipercolesterolemia é associada com um aumento no risco de doença cerebrovascular isquêmica. Ademais, já foi demonstrado que a diminuição nos níveis de colesterol com o uso de estatinas diminui a incidência de AVC em populações de alto risco e em pacientes com ataque isquêmico transitório¹⁰ (AMARENCO et al., 2006).

Por outro lado, como mencionado anteriormente, Sparks e Streit (1997) foram os primeiros a observarem a ocorrência de uma alta ativação microglial no cérebro de pacientes com doença cardíaca em comparação a pacientes sem doença cardíaca. Embora evidências para um efeito direto da hipercolesterolemia no cérebro ainda estejam escassos, a estreita inter-relação entre hipercolesterolemia, dano vascular e estresse oxidativo já foi amplamente demonstrada (NOUROOZ-ZADEH et al., 2001; KNIGHT-LOZANO et al., 2002; BUSNELLI et al., 2009). Nesta linha de evidência, Hafezi-Moghadam e

⁹ O acidente vascular isquêmico consiste na oclusão de um vaso sanguíneo que interrompe o fluxo de sangue a uma região específica do cérebro, interferindo com as funções neurológicas dependentes daquela região afetada, produzindo uma sintomatologia ou déficits característicos. Em torno de 80% dos acidentes vasculares cerebrais são isquêmicos.

¹⁰ Por definição, os sintomas de Acidente Vascular Cerebral persistem, pelo menos, 24 horas, caso contrário, é usado o termo de Acidente Isquêmico Transitório (AIT). Pode-se definir um AIT como um distúrbio da circulação cerebral que produz um déficit neurológico por um período inferior a 24 horas (AMINOFF et al., 2005).

colaboradores (2007) mostraram que camundongos hipercolesterolêmicos apresentavam uma desestabilização da microcirculação cerebral levando a uma disfunção da barreira hematoencefálica (BHE).

Primariamente, a BHE¹¹ é vista como uma barreira de difusão seletiva ao nível das células endoteliais da microvasculatura cerebral, sendo caracterizada pela presença de junções íntimas (oclusivas) entre as células endoteliais adjacentes, e a ausência de fenestrações (HAWKINS; DAVIS, 2005). Esta barreira física regula a entrada e saída de moléculas do parênquima cerebral, desta forma, permitindo uma adequada composição do meio extracelular, garantindo o adequado funcionamento neuronal (BALLABH et al., 2004). Ademais, a BHE protege o SNC ao limitar a entrada de patógenos, de toxinas e do próprio sistema imune corporal ao tecido neural, o qual apresenta limitada capacidade regenerativa (ABBOTT et al., 2006). Não surpreende, desta forma, que existam diversas patologias onde a função da BHE é afetada (BALLABH et al., 2004).

De fato, evidências consideráveis vêm indicando que a hipercolesterolemia contribui para a disfunção da BHE (KALAYCI et al., 2009; TAKECHI et al., 2010; JEITNER et al., 2011). A disfunção da BHE, com conseqüente extravasamento de componentes séricos através das paredes de pequenos vasos cerebrais, pode levar a dano neuronal e glial, levando a uma persistente ativação da micróglia e dos astrócitos (RAPP et al., 2008) (Figura 9). Neste sentido, algumas linhas de evidência têm apontado para um ciclo oxidativo-inflamatório na vasculatura cerebral induzido pela hipercolesterolemia, o que poderia impactar determinadas regiões relevantes para a cognição (THIRUMANDALAKUDI et al., 2008; EVOLA et al., 2010).

¹¹ Em 1885, Paul Ehrlich observou que a administração endovenosa de corantes em animais experimentais corava a maioria dos tecidos, enquanto o cérebro permanecia não corado. Em 1913, Edwin Goldmann propôs a hipótese de que os capilares cerebrais proporcionariam a base anatômica para uma barreira fisiológica entre o cérebro e o resto do organismo, introduzindo o conceito barreira hematoencefálica (HAWKINS; DAVIS, 2005).

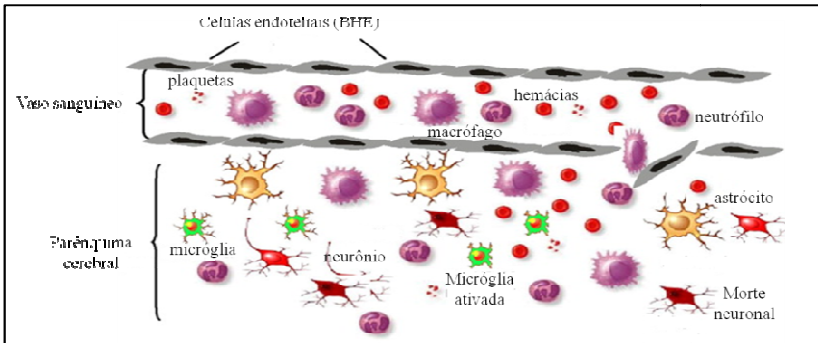


Figura 9. Disfunção da barreira hemato-encefálica (BHE), com conseqüente extravasamento de componentes séricos através das paredes de pequenos vasos cerebrais. A BHE é a interface física entre o parênquima cerebral e o sistema vascular. Ela consiste em células endoteliais justapostas, as quais regulam a passagem de células, moléculas, e íons para o tecido cerebral. Se a integridade da BHE estiver comprometida, há a infiltração de células sanguíneas no parênquima, permitindo uma comunicação entre as células imunes periféricas e residentes; essa comunicação é mediada pela liberação e troca de citocinas e outros fatores neurotóxicos. Alguns desses mediadores podem levar à ativação de células gliais, assim como à morte neuronal, enquanto outros promovem mecanismos regenerativos (adaptado de Ziebell e Morganti-Kossmann, 2009).

Particularmente, a neuroinflamação ocasiona um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), os quais são prejudiciais aos neurônios (WITTE et al., 2010). O SNC é especialmente susceptível ao estresse oxidativo, muito em parte devido ao alto conteúdo lipídico e peroxidável das bainhas de mielina, e à alta taxa de metabolismo oxidativo cerebral (HALLIWELL, 2006). Neste contexto, o estresse oxidativo tem sido implicado em muitos mecanismos de neurotoxicidade, desempenhando papel importante em diferentes patologias neurodegenerativas (MARKESBERY, 1996). Em condições fisiológicas, os níveis basais de EROs geradas são rapidamente eliminados por sistemas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutatona peroxidase (GPx), a glutatona redutase (GR), a glutatona (GSH), a vitamina E, a vitamina C, tiol peroxidases, entre outros (RHEE et al., 2005). Especificamente, o sistema antioxidante dependente da GSH é um dos principais sistemas antioxidantes endógeno, desempenhando um papel central na proteção celular contra oxidantes (DRINGEN et al., 2005). A GSH, um tripeptídeo formado pelos resíduos gama-glutamil, cisteinil e glicina está presente em todas as células animais. Durante a detoxificação de EROs,

a GSH está envolvida em dois processos básicos: (i) a GSH reage de forma não-enzimática com EROs e (ii) GSH atua como um doador de elétrons para reduzir os peróxidos na reação catalisada pela GPx (SINGH et al., 1996). Neste processo, H_2O_2 é reduzido a H_2O pela reação da GPx com a GSH, a qual é oxidada a GSH dissulfeto (GSSG). GSSG é então reduzida novamente a GSH, pela ação da flavoenzima GR à custa da oxidação do NADPH (DRINGEN et al., 1999).

JUSTIFICATIVAS

Enquanto a hipercolesterolemia tem sido reconhecida há décadas como um potencial fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, estudos mais recentes têm indicado uma associação entre a hipercolesterolemia e a patofisiologia da doença de Alzheimer esporádica. Especificamente diversas evidências têm apontado para uma associação não linear, em que apenas a hipercolesterolemia durante a meia-vida seria um fator de risco para comprometimentos cognitivos leves e doença de Alzheimer décadas após. Neste sentido, indivíduos com hipercolesterolemia familiar, os quais são expostos a elevados níveis de colesterol plasmático desde o nascimento, podem ser reconhecidos com um potencial grupo de risco para o desenvolvimento de déficits cognitivos na idade adulta.

Desta forma, a caracterização de comprometimento cognitivo leve em modelos experimentais de hipercolesterolemia familiar torna-se imperativa, visando tanto ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas e preventivas, quanto ao entendimento de mecanismos moleculares responsáveis pelo declínio cognitivo associado com a hipercolesterolemia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a relação entre hipercolesterolemia e prejuízos cognitivos em camundongos, utilizando uma combinação de abordagens genéticas e ambientais.

2.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar a presença de prejuízos cognitivos em camundongos $LDLr^{-/-}$, um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, de quatorze meses de idade (“meia-idade”). Se tais prejuízos forem observados, verificar se estes se relacionam com estresse oxidativo, e/ou características relacionadas à doença cerebrovascular, e/ou alterações na atividade da enzima acetilcolinesterase.

2. Verificar os efeitos de estratégias hipo-lipemiantes sobre a cognição de camundongos $LDLr^{-/-}$.

3. Verificar o efeito de manipulações ambientais durante o período de desenvolvimento sobre a cognição, na idade adulta, de camundongos $LDLr^{-/-}$.

4. Caracterizar a presença de prejuízos cognitivos em camundongos *Swiss* expostos a uma dieta hipercolesterolêmica. Se tais prejuízos forem observados, verificar se estes se relacionam com estresse oxidativo, e/ou alterações na atividade da enzima acetilcolinesterase, e/ou disfunção da barreira hemato-encefálica, e/ou alterações no processamento da proteína precursora amiloide.

5. Avaliar a susceptibilidade de camundongos $LDLr^{-/-}$, em comparação a camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem, a insultos neurotóxicos decorrentes da exposição a toxicantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Albumina de soro bovino, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida, Glutathione oxidada, Glutathione redutase, Glutathione reduzida, Peróxido de ter-butila, Probucof, Cloreto de metímercúrio, Iodeto de Acetilcolina, 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato, Triton X-100, Tween-20 foram adquiridos da empresa Sigma (St. Louis, EUA). A Tacrina foi obtida da empresa Tocris (Minneapolis, EUA). O isoflurano foi obtido da empresa Abbot Laboratórios do Brasil (RJ, Brasil). Os reagentes para eletroforese foram obtidos da Bio-Rad Laboratories (Hercules, EUA). Marcadores de peso molecular, membranas de nitrocelulose (Hybond ECL), reagente para quimiluminescência amplificado (ECL-PLUS) foram obtidos da empresa GE Healthcare. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Camundongos da linhagem C57Bl/6 do tipo selvagem e nocaute para o gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (designados LDLr^{-/-}), descritos previamente (ISGHIBASHI et al., 1993), foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil. Os progenitores foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA). Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm), com condição controlada de temperatura (23 ± 1°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 6:00 às 18:00 h), e com livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC), Processo 23080.037850/2010-04, PP00547, que segue normas internacionais de utilização de animais para pesquisa científica.

3.3. Cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ). As

células foram cultivadas em placas e frascos de cultura, contendo meio de cultura DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina. As culturas foram mantidas em estufa com 95% de umidade, 5% CO₂ a 37°C.

3.4. Desenhos Experimentais

3.4.1. Bloco Experimental 1 – Camundongos LDLr^{-/-} de meia-idade apresentam comprometimento cognitivo leve?

O primeiro desenho experimental foi utilizado para testar a hipótese de que camundongos LDLr^{-/-}, um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, apresentam comprometimento cognitivo leve na meia-idade, tal qual observado em indivíduos com hipercolesterolemia familiar de meia-idade por Zambón e colaboradores (2010).

Neste sentido, camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e camundongos LDLr^{-/-} de três e quatorze meses foram submetidos a diversos paradigmas de aprendizado e memória, de emocionalidade e de atividade locomotora, tais como o teste de realocação de objeto, labirinto aquático de Morris, medo condicionado ao som, esQUIVA inibitória do tipo step down e campo aberto (grupos independentes de animais foram usados em cada teste, 8-10 animais por grupo experimental). Após o teste de realocação de objeto, os animais foram anestesiados com isoflurano e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis plasmáticos de colesterol total, de colesterol HDL e de triglicerídeos. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, o córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados para a determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), da atividade das enzimas antioxidantes GR, GPx e catalase, para a quantificação dos níveis de GSH, e para a mensuração da peroxidação lipídica (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - ensaio de TBARS).

Após o teste do labirinto aquático, os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, i.p.) e perfundidos com paraformaldeído 4% para ensaios de histoquímica. Foi feita uma investigação neuropatológica para avaliar características relacionadas à doença cerebrovascular.

Em outro protocolo experimental, camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses foram tratados com um inibidor reversível da enzima AChE – tacrina – na dose de 1,5 mg/kg pela via intraperitoneal (i.p.) (ASSINI et al., 2009). Os animais do grupo controle receberam solução salina pela mesma via de administração. Trinta minutos após os tratamentos, oito animais de cada grupo experimental foram eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, o córtex pré-frontal foi dissecado para a determinação da atividade da enzima AChE. Paralelamente, outros oito animais de cada grupo experimental foram treinados no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step down* (item 3.5.3).

3.4.2. Bloco Experimental 2 – Estratégias hipolipemiantes reverterem os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr^{-/-}?

O segundo desenho experimental foi utilizado para avaliar os efeitos de estratégias hipolipemiantes sobre a cognição de camundongos LDLr^{-/-}. No presente estudo avaliamos os efeitos de estratégias hipolipemiantes farmacológicas (fármaco hipolipemiante probucol) e não farmacológicas (exercício físico voluntário), bem como a associação de ambas.

Neste sentido, camundongos LDLr^{-/-} de oito meses foram mantidos individualmente em gaiolas plásticas com livre acesso à (i) rodas de correr (modelo *Silent Spinner*, Pets International, Grove Village IL, EUA) ou à (ii) rodas bloqueadas, para evitar viés de enriquecimento ambiental. Concomitantemente, metade dos animais de cada grupo experimental (com ou sem exercício voluntário) foi tratada com o fármaco hipolipemiante probucol. O probucol foi adicionado na água de beber dos animais em uma concentração final de 17,5 mg/L, resultando em uma dose de aproximadamente 3,5 mg/kg/dia para cada animal. Deste modo, foi possível construir quatro grupos experimentais: (i) controle + água, (ii) controle + probucol, (iii) exercício voluntário em rodas de correr + água e, (iv) exercício voluntário em rodas de correr + probucol.

A duração do tratamento com probucol e exposição às rodas de correr foi de quatro semanas. Após este período, os animais foram avaliados no teste de realocação de objeto. Após os experimentos comportamentais, os animais foram anestesiados com isoflurano e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis de colesterol total, de colesterol HDL e de triglicérides (Figura 10).

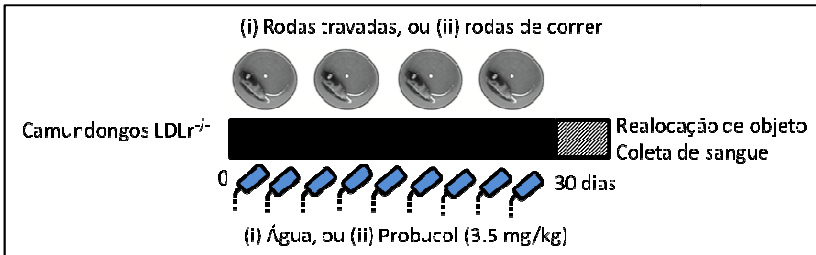


Figura 10. Desenho experimental 2: Estratégias hipolipemiantes revertem os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr^{-/-}?

3.4.3. Bloco Experimental 3 – O enriquecimento ambiental durante períodos críticos do desenvolvimento previne os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr^{-/-} adultos?

O terceiro desenho experimental foi utilizado para avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental durante o período de desenvolvimento sobre a cognição, na idade adulta, de camundongos LDLr^{-/-}.

O enriquecimento ambiental consiste em um modelo experimental no qual os animais são expostos a um ambiente que fornece uma variedade de estímulos cognitivos, sensoriais e motores (van PRAAG et al., 2000). Diversos estudos tem mostrado que a exposição ao enriquecimento ambiental promove benefícios fisiológicos, morfológicos, bem como alterações na plasticidade neuronal incluindo: aumento da arborização dendrítica, gliogênese, neurogênese, e modificações na expressão de genes ligados à plasticidade neuronal (LIU et al., 2012). Especialmente, a exposição precoce a condições de enriquecimento ambiental parece levar a um aumento no peso do cérebro, na espessura cortical, nas ramificações dendríticas, na densidade sináptica, e em mudanças na regulação da plasticidade neural (SIMONETTI et al., 2009).

Neste sentido, camundongos LDLr^{-/-} fêmeas prenhas foram randomicamente distribuídas entre o ambiente padrão ou um ambiente enriquecido em torno de 4-7 dias antes do nascimento dos filhotes. Um camundongo LDLr^{-/-} fêmea e sua ninhada foram mantidos em gaiolas plásticas padrão (30 cm x 13 cm x 13 cm), enquanto dois camundongos LDLr^{-/-} fêmeas e suas ninhadas foram mantidos em gaiolas plásticas contendo enriquecimento ambiental (45 cm x 30 cm x 13 cm). Os camundongos LDLr^{-/-} fêmeas foram mantidos com suas ninhadas até o período de desmame (do nascimento até o dia pós-natal 21), e então a

progenitora foi retirada das gaiolas e os camundongos machos e fêmeas foram separados em gaiolas independentes. Os animais foram expostos ao enriquecimento ambiental até a adolescência (dia pós-natal 45). No dia pós-natal 90, os animais foram testados cognitivamente no teste de realocação de objeto (Figura 11).

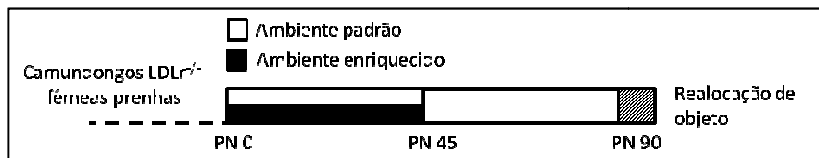


Figura 11. Desenho experimental 3: O enriquecimento ambiental durante períodos críticos do desenvolvimento previne os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr^{-/-} adultos?

O ambiente enriquecido consistia de uma gaiola plástica maior que o ambiente padrão (45 cm x 30 cm x 13 cm), contendo uma variedade de estímulos sensoriais, por exemplo: uma roda de correr, um túnel contorcido, escadas, chocalhos e brinquedos com bolas de diversas cores e texturas. Estes objetos eram lavados e as suas posições eram trocadas de lugar mudando a configuração espacial do ambiente enriquecido e a composição dos objetos duas vezes por semana.

3.4.4. Bloco Experimental 4 – Em busca de mecanismos bioquímicos iniciais que relacionam a hipercolesterolemia com prejuízos cognitivos.

No quarto desenho experimental foi modelado em camundongos *Swiss* uma hipercolesterolemia branda com o intuito de avaliar alterações bioquímicas iniciais que relacionam a hipercolesterolemia com prejuízos cognitivos.

Neste sentido, camundongos *Swiss* machos de três meses foram tratados por dois meses com dois tipos de dietas: (A) ração padrão para roedores (Nuvilab CR1, Nuvital; Quimtia Nutrientes, Colombo, PR, Brasil), e (B) ração hipercolesterolêmica (constituída por 20% de gordura saturada e 1,25% de colesterol, produzida na Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil). Após dois meses de tratamento com as dietas, os animais foram submetidos aos testes comportamentais realocação de objeto, nado forçado e labirinto em cruz elevado (grupos independentes de animais foram usados em cada teste, 8-10 animais por grupo experimental). Após o teste de realocação de

objeto, os animais foram anestesiados com isoflurano e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis de colesterol total, de colesterol HDL, de triglicerídeos e de glicose. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, o córtex pré-frontal, o hipocampo e o fígado foram dissecados para a determinação da atividade da enzima AChE, da atividade das enzimas antioxidantes GR, GPx, para a quantificação dos níveis de GSH, e para a mensuração da peroxidação lipídica (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - ensaio de TBARS).

Após o teste do labirinto em cruz elevado, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, o córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados para a determinação da densidade da proteína BACE-1 (marcador de processamento da APP) e da proteína aquaporina-4 (marcador de função da BHE) pela técnica de *western blott* (Figura 12).

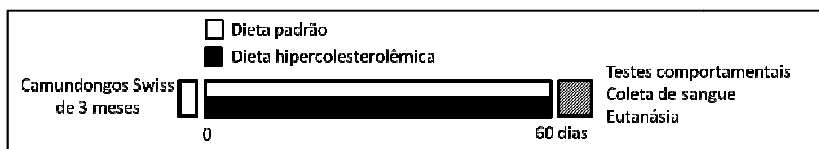


Figura 12. Desenho experimental 4: Em busca de mecanismos bioquímicos iniciais que relacionam a hipercolesterolemia com prejuízos cognitivos.

Ademais, em outro protocolo experimental, células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y foram expostas ao colesterol LDL nas concentrações de 50 e 100 µg/mL por 24 horas (HUI et al., 2012) e, subsequentemente, as atividades das enzimas AChE, GPx e GR foram medidas, bem como os níveis de GSH.

3.4.5. Bloco Experimental 5 – Camundongos hipercolesterolêmicos são mais susceptíveis aos efeitos de neurotóxicos?

O quinto desenho experimental foi utilizado para avaliar a hipótese de que camundongos hipercolesterolêmicos poderiam ser mais susceptíveis aos efeitos de neurotóxicos. No presente estudo o neurotóxico escolhido foi o metilmercúrio (MeHg). O MeHg foi selecionado pois sua neurotoxicidade parece exibir seletividade para algumas regiões cerebrais, particularmente se a exposição ocorrer na vida adulta (ATCHISON, 2005). As lesões patológicas induzidas pelo MeHg tipicamente ocorrem no lobo occipital e cerebelo (ETO;

TAKEUCHI, 1978; ATCHISON; HARE, 1994), sendo responsáveis pela disfunção motora relacionada à intoxicação com este metal. Desta forma, como a vasta maioria dos estudos vêm apontando para alterações no córtex pré-frontal e hipocampo induzidos pela hipercolesterolemia (THIRUMANDALAKUDI et al., 2008; ULLRICH et al., 2010; de OLIVEIRA et al., 2011), escolheu-se um neurotóxico que, *a priori*, apresenta-se especificidade por outras estruturas cerebrais.

O MeHg é um composto orgânico de mercúrio conhecido por seus efeitos neurotóxicos em animais e humanos (CLARKSON, 1983). As principais alterações neurológicas e neuropatológicas induzidas pela exposição ao MeHg incluem desmielinização, disfunção autônoma, atraso na condução nervosa, migração e divisão neuronal anormal (SPURGEON, 2006). Numerosas evidências sugerem que o principal local de deposição do MeHg no SNC são os astrócitos (ASCHNER, 1996, CHARLESTON et al., 1996), provocando inibição da captação de glutamato, de cistina e de cisteína, afetando de forma prejudicial o conteúdo intracelular de glutathione e o estado redox desta célula (SHANKER et al., 2001).

Neste sentido, camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e camundongos LDLr^{-/-} de três meses foram tratados com MeHg (40 mg/L de MeHg diluído na água de beber dos animais) (FRANCO et al., 2009). Após vinte e um dias de tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis plasmáticos de colesterol total, de colesterol HDL e de triglicerídeos. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, o cerebelo foi dissecado para a determinação da atividade da enzima antioxidante GPx. Em outro procedimento experimental idêntico, após vinte e um dias de tratamentos, os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, i.p.) e perfundidos com paraformaldeído 4% para ensaios de imunofluorescência. Foi analisada a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um marcador de diferenciação astrocitária (Figura 13).

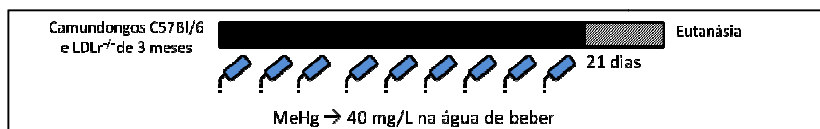


Figura 13. Desenho experimental 5a: Camundongos hipercolesterolêmicos são mais susceptíveis aos efeitos de neurotóxicos?

Ademais, em outro protocolo experimental, camundongos C57Bl/6 de três meses foram tratados com MeHg (40 mg/L de MeHg diluído na água de beber dos animais) (FRANCO et al., 2009), e, após sete, quatorze e vinte e um dias foi feito o teste do campo aberto para avaliação da atividade locomotora dos animais. Após o campo aberto em cada um dos três dias, oito animais de cada grupo experimental (MeHg e controle) foram anestesiados com isoflurano e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis plasmáticos de colesterol total. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, o cerebelo foi dissecado para a determinação da atividade da enzima antioxidante GPx (Figura 14).

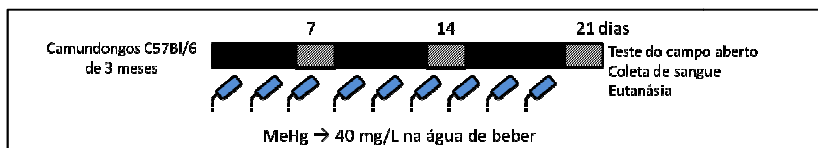


Figura 14. Desenho experimental 5b: Efeitos do MeHg sobre a atividade locomotora, níveis de colesterol plasmático e atividade de GPx cerebelar em camundongos C57Bl/6.

3.5. Testes comportamentais

Os animais foram transportados à sala de experimentos climatizada para ambientação 1 hora antes do início de todos os experimentos comportamentais, realizados durante a fase clara do ciclo (9:00-16:00h). Após cada experimento, os aparatos eram limpos com etanol 10%.

3.5.1. Campo aberto

O teste do campo aberto consiste de uma arena contendo uma área central aversiva e representa um modelo amplamente utilizado para a avaliação tanto da atividade motora como de comportamentos relacionados à ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). O aparelho feito de acrílico transparente com assoalho cinza foi dividido por linhas pretas em 25 quadrados (10 x 10 cm cada) e cercado por paredes elevadas em 40 cm de altura. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e as seguintes variáveis foram registradas por 5 minutos: número de quadrados periféricos (adjacentes às paredes) cruzados (locomoção periférica), número de quadrados centrais (longe das paredes) cruzados (locomoção central), porcentagem de locomoção central em relação à

locomoção total (locomoção periférica mais locomoção central). Um cruzamento foi registrado quando o animal atravessou o quadrado com as quatro patas.

3.5.2. Teste da realocação de objeto

A memória espacial de curto prazo dos camundongos foi avaliada no teste de realocação de objeto. Este teste, baseado na tendência espontânea de roedores, previamente expostos a dois objetos idênticos, a posteriormente, explorar um dos objetos (realocado para uma nova localização espacial) por um tempo maior que o objeto não deslocado, tem sido utilizado na avaliação de memórias dependentes do hipocampo (FERGUSON; SAPOLSKY, 2007; ASSINI et al., 2009). O aparelho utilizado para o teste da realocação de objeto foi o campo aberto. Os objetos eram dois retângulos plásticos idênticos (3 cm lado X 4,5 cm lado X 4,5 cm altura) os quais foram colados ao chão de maneira equidistante 7 cm de dois lados da caixa. O procedimento consistiu em uma sessão de habituação ao campo aberto com duração de 5 minutos, na qual o animal era colocado na caixa e explorava-a livremente. Após 24 horas, os animais eram reexpostos ao campo aberto por 5 minutos, contudo nesta apresentação (treino) dois objetos idênticos eram apresentados aos animais. Neste momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa. Depois do treino os animais retornavam a sua caixa moradia e aguardavam até o momento do teste, 180 minutos após o treino. No momento do teste, porém, um dos objetos era mudado de lugar no campo aberto (Figura 15). Neste momento registrava-se, novamente, o tempo de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Este tempo de exploração dos objetos foi utilizado para o cálculo do índice de localização de objetos, o qual foi utilizado como parâmetro de memória (ASSINI et al., 2009).

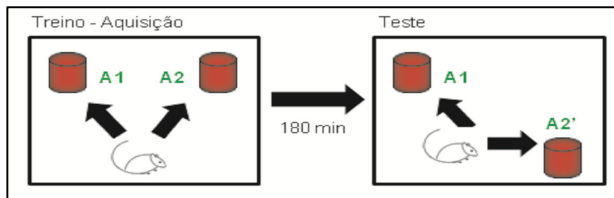


Figura 15. Representação esquemática do teste de realocação de objetos. Índice de localização do objeto = $[t(s) A2' \times 100 / \{t(s) A2' + t(s) A1\}]$.

3.5.3. Esquiva inibitória do tipo step down

A memória espacial de curto e longo prazo foi avaliada através do modelo de esquiva inibitória. Sendo que nesta tarefa, o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve choque aplicado nas patas. Com isso, numa segunda exposição à caixa de esquiva ele evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa. O aprendizado inerente à esquiva inibitória envolve vários estímulos, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade à dor, acompanhados de um componente emocional amplamente modulado por hormônios relacionados ao estresse. Diversas estruturas cerebrais estão envolvidas no aprendizado desta tarefa, incluindo o hipocampo, o córtex pré-frontal e a amígdala (JERUSALINSKY et al., 1992).

O teste foi realizado em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm³. Parte do chão do aparelho possui uma grade com barras de bronze com 1 mm de diâmetro, com espaçamento de 1 cm entre elas. Uma plataforma em acrílico com 10 cm² de superfície e 2 cm de altura foi colocada no centro do assoalho. O animal foi posto sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade (com as quatro patas) foi cronometrada. Na sessão de treino, imediatamente após o animal descer sobre a grade, ele é estimulado com um leve choque nas patas (0,3 mA) durante 2,0 segundos. Cada animal foi testado 1,5 h após o treino para avaliação de memória de curta duração e 24 h após o treino para avaliação de memória de longa duração, realizando-se o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo também cronometrado o tempo que o animal demora a descer da plataforma. O aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma, ou fazê-lo após um período de tempo maior que o observado quando desce da plataforma pela primeira vez (IZQUIERDO et al., 2002).

3.5.4. Labirinto aquático

Neste estudo, utilizamos a versão de memória operacional do labirinto aquático (AGUIAR et al., 2010). A memória operacional 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, 1986; IZQUIERDO e MEDINA, 1991). Diversas evidências apontam para um envolvimento crítico do córtex pré-frontal neste tipo de memória (FAW, 2003; PASSINGHAM; SAKAI, 2004).

O labirinto aquático utilizado neste estudo era circular e preenchido com cerca de 60 cm³ de água, temperatura ambiente, onde os animais foram condicionados a encontrar uma plataforma de escape (10 x 10 cm) submersa 0,5 cm da superfície. A navegação foi orientada espacialmente por quatro pistas visuais equidistantes (50 x 50 cm) fixadas nas paredes da sala experimental (NO, NE, SO, SE), 30 cm acima da borda do tanque. Os animais foram submetidos a quatro dias de teste, com quatro sessões diárias de condicionamento. Os quatro pontos de partida (N, S, L e O) foram distribuídos randomicamente em cada dia, sendo utilizado apenas uma vez por dia. A posição da plataforma permaneceu fixa durante as quatro sessões do dia, sendo alterada no dia seguinte, no centro de um quadrante diferente dos dias anteriores. As sessões de treinamento foram de no máximo 60 s, com 30 s de permanência na plataforma, de onde os animais retornavam imediatamente para o próximo ponto de partida. Nas falhas em encontrar a plataforma, os animais foram gentilmente guiados até a mesma. A latência de escape (s) das quatro sessões no labirinto aquático foi avaliada.

3.5.5. Respostas de medo condicionado ao som

O medo condicionado é um condicionamento pavloviano de um estímulo neutro (EN) (por exemplo, o ambiente, ou sinal sonoro ou luminoso) pareado a um estímulo incondicionado aversivo (EI) (por exemplo, choque elétrico) (KNAFO et al., 2009). No presente estudo, a memória de procedimento dos camundongos foi avaliada utilizando o protocolo do medo condicionado ao som, uma tarefa associativa baseada na associação pareada entre som e choque elétrico nas patas. Em contraste com o protocolo de medo condicionado ao contexto (principalmente dependente do hipocampo), o protocolo de medo condicionado ao som indiretamente requer a via estriado dorsal-

amígdala (FERREIRA et al., 2008), e a sua evocação após um dia é independente do hipocampo (KITAMURA et al., 2005).

Os camundongos foram posicionados no aparato A durante 2 minutos, seguido pelo condicionamento através de três pares de conjunto som-choque. Foram utilizados três pares de estímulos sonoros (20 s, 80 dB, 4 kHz) finalizados de modo simultâneo a choques elétricos (2 s, 0,5 mA) nas patas dos animais (gerador modelo EEF 342, Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP) em intervalos de 1 minuto (AGUIAR et al., 2010). Após o último choque elétrico, os animais permaneceram no aparato por mais 1 minuto, e depois retornaram às suas gaiolas. Na sessão de teste, realizada 24 h após o condicionamento, os animais foram colocados em uma caixa diferente (aparato B) com as mesmas dimensões da anterior (aparato A), em uma sala de experimento diferente daquela utilizada durante a sessão de condicionamento. Após 2 minutos, os animais receberam a estimulação sonora com a mesma configuração da sessão de condicionamento, mas com ausência do estímulo elétrico. O tempo (s) das respostas de congelamento foi obtido.

3.5.6. Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado com base na sua capacidade de detectar tanto efeitos do tipo-ansiolítico quanto do tipo-ansio gênico em camundongos (LISTER, 1987). O aparato, feito de madeira e fórmica, consiste de dois braços abertos (18 x 6 cm), opostos a dois braços fechados (18 x 6 cm), elevados 60 cm do chão. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) mede 6 x 6 cm. Os experimentos foram conduzidos em ambiente com baixa luminosidade (12 lux), sendo que os comportamentos dos animais no LCE foram registrados por uma câmera de vídeo acoplada a um gravador de DVD instalado na sala adjacente à sala de experimentos. Cada camundongo foi colocado na plataforma central de frente para um braço fechado. Os animais foram observados durante um período de 5 min. Foram analisados os seguintes parâmetros: o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o tempo de permanência nos braços abertos e nos fechados (foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estivessem no interior do braço). Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos [%EA: entradas nos braços abertos / (entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados) x 100]; porcentagem de permanência nos braços abertos [%TBA: tempo nos braços abertos / (tempo nos braços

abertos + tempo nos braços fechados) x100]. Além disso, foi utilizado o número total de entradas nos braços fechados como uma medida de locomoção.

3.5.7. Nado forçado

O teste do nado forçado é um método clássico para avaliação de desamparo comportamental em roedores (PORSOLT et al., 1977). Nos paradigmas de desespero comportamental, os animais mostram um presumido comportamento tipo-depressão quando submetidos a uma situação aversiva inescapável. O aparato consistiu em um tubo plástico (diâmetro 10 cm, altura 25 cm), preenchido com água a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ até 19 cm. Cada camundongo foi forçado a nadar no tubo por 6 min. O comportamento tipo depressão é o tempo de imobilidade, definido pela ausência de nado ativo, quando o animal faz apenas os movimentos necessários para manter a cabeça sobre a água.

3.6. Determinação de lipídeos plasmáticos e glicose

A quantificação do colesterol total (CT), fração HDL, triglicerídeos e glicose no plasma dos camundongos foi realizada utilizando reagentes comerciais (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as especificações do fabricante. A concentração plasmática de colesterol contida nas lipoproteínas (VLDL, LDL + IDL) foi determinada indiretamente através da diferença entre os níveis de CT e fração HDL. Os resultados foram expressos em mg/dL.

3.7. Experimentos bioquímicos

3.7.1. Preparação de amostras de tecido cerebral

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

3.7.2. Sistema antioxidante dependente de GSH

Os grupamentos tióis não proteicos (NPSH) nas amostras foram determinados usando reagente de Ellman, 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB). A amostra (100 μL do sobrenadante) foi misturada com 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 min. Os NPSH foram quantificados pela adição de 150 μL do sobrenadante em 425 μL de TFK 1 M, pH 7,0 e 25 μL de DTNB 10 mM. O monitoramento da concentração dos grupos tióis foi avaliado através da medida da absorbância em 412 nm devido ao produto resultante da reação da GSH com DTNB, que gerou o TNB de cor amarela (ELLMAN, 1959). A concentração de NPSH nas amostras foi obtida pela comparação das absorbâncias com a absorbância de uma curva padrão. Os dados foram expressos como nmol de NPSH/mg de proteína.

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

A GPx catalisa a redução de H_2O_2 , bem como outros lipoperóxidos, utilizando a glutatona reduzida (GSH) como co-substrato e produzindo GSSG. A GSSG é reduzida pela GR com o consumo de NADPH, que foi mensurado através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm (WENDEL, 1981). Para este ensaio, o meio de reação continha tampão fosfato 0,25 M, pH 7,0, 1 mM EDTA, GSH 100 mM, GR 5 U/mL e NADPH 0,1 mM. Adicionou-se, neste meio, a amostra para mensurar o consumo inespecífico de NADPH através de uma leitura por 2 minutos, a 340 nm. Ao adicionar o substrato (1 mM peróxido de *tert*-butila), a leitura foi realizada por mais 2 minutos. Ao decréscimo de absorbância (340 nm) por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas

diluições. Os dados foram expressos como nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

3.7.3. Catalase

A catalase é uma heme proteína cuja função é catalisar especificamente a decomposição do H_2O_2 em O_2 e H_2O (WINTERBOURN; STERN 1987). A atividade da enzima catalase foi determinada pelo método descrito por Aebi (1984). O princípio do método consiste no monitoramento do consumo direto de H_2O_2 pela enzima presente na amostra para formação de O_2 e H_2O . A atividade é determinada pela velocidade de consumo da H_2O_2 no primeiro minuto da reação medida em 240 nm (AEBI, 1984). O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($\epsilon = 39,4 M^{-1} cm^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. Os dados foram expressos como μmol de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína.

3.7.4. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS

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

3.7.5. Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi determinada de acordo com o método proposto por Ellman et al. (1961). O princípio do método de Ellman consiste na medida da velocidade da produção de tiocolina formada a

partir da hidrólise do iodeto de acetiltiocolina numa reação catalisada pela AChE. O grupamento tiol (-SH) da tiocolina reage com o ácido 5',5 - ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) formando o ânion ácido 2-nitro-5-mercaptopentano-2-carboxílico (TNB) com cor amarela, monitorado no espectrofotômetro em 412 nm. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do TNB ($\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. Os dados foram expressos como nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína.

3.8. Imunodeteção de proteínas: *Western blotting*

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e o córtex pré-frontal e o hipocampo dissecados, pesados e homogeneizados mecanicamente (1: 10 m:v) em tampão Tris-base 50 mM, EDTA 1 mM, 100 mM NaF, Na_2VO_4 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10%, pH 7, e coquetel inibidor de proteases (PMSF, leupeptina, aprotinina, pepstatina). Os lisados foram centrifugados (15.000 g, 20 minutos, 4° C) e os sobrenadantes foram diluídos 2:1 (v:v) em tampão Tris 100 mM, EDTA 4 mM, SDS 8%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 8%, pH 6,8. As amostras (50 μg de proteína) foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida (12%), sendo posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose. Depois, as membranas foram bloqueadas (1 h) com leite desnatado 5% em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,5), e, posteriormente, incubadas por 12 h (4°C) com anticorpos primários contra BACE-1 (sc-10053), aquaporina-4 (sc-9888), e β -actina (sc-97778, Santa Cruz Biotechnology, EUA) diluídos em TBS-T. Após as incubações com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBS-T (3 x 5 min) e incubadas por 1 h em temperatura ambiente com os anticorpos secundários específicos (ligados à peroxidase) com diluição 1: 5.000. Para detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas três vezes (5 min) com TBS-T e duas vezes com TBS, e as bandas imunorreativas foram visualizadas por meio de kit de aumento de quimiluminescência e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante. A densidade óptica das bandas foi quantificada utilizando a plataforma Quantity One[®] 1-D Analysis Software (Bio-Rad, EUA).

3.9. Dosagem de proteínas

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

3.10. Imunofluorescência

Após a perfusão, os encéfalos foram removidos do crânio, pós-fixados na solução de paraformaldeído 4% a temperatura ambiente por 4 horas e crioprotetidos por meio da imersão em soluções crescentes de sacarose (15 e 30%) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) 4°C até afundarem. Após, os encéfalos foram congelados através de uma breve imersão em isopentano e, em seguida, em nitrogênio líquido e guardados em freezer (-70°C) para posterior análise.

Cortes coronais seriados (40 µm) foram obtidos em criostato (Leica, Alemanha) em -20°C e coletados em tampão fosfato 0,1 M, NaCl 0,9%, pH 7,4. Os cortes (*free-floating*) foram bloqueados com albumina sérica bovina 2% diluída em tampão fosfato salina contendo Triton X-100 0,1% (TF-Tx 0,1%) por 30 minutos e incubados com o anticorpo GFAP. Os cortes do cerebelo foram incubados em anticorpo policlonal anti-GFAP produzido em coelho (Dako), diluído em 1: 3000 em TF-Tx 0,1% por 48 horas em 4° C. Após três lavagens em tampão fosfato salina, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário, anti IgG de coelho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluído 1: 500 em TF-Tx 0,1% por 1 h em temperatura ambiente. Após, os cortes foram lavados três vezes em tampão fosfato salina, montados em lâminas e cobertos com lamínulas.

As imagens foram obtidas com o microscópio Olympus IX-70 acoplado a uma câmera digital. Todas as condições de iluminação e aumento (200 vezes) foram mantidas constantes. Áreas retangulares de interesse (262 pixel²) foram definidas para as camadas do cerebelo (camada molecular, camada de células de Purkinje, e camada granulosa) e a imunofluorescência de cada área retangular foi mensurada com o software de imagem Cell M 2.6. Um total de dez imagens (uma imagem por sessão, formato TIFF) de cada animal foi mensurado e os dados foram expressos como unidades arbitrárias. Ademais, diversas imagens foram obtidas por meio de microscópio Confocal Olympus IX-81.

3.11. Investigação neuropatológica

Após a perfusão, os encéfalos foram removidos do crânio, pós-fixados na solução de paraformaldeído 4% a temperatura ambiente por 24 horas e álcool 70% posteriormente. Os cérebros foram processados com técnicas histológicas padrão, embebidos em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Os cortes

foram montados em lâminas, desparafinizados, corados com técnica padrão de hematoxilina-eosina e solução de violeta cresil 0,01% e ácido acético 0,01% e, posteriormente, analisados em por microscopia de luz (Nikon Eclipse 50i, Nikon Inc. Estados Unidos).

Foi procedida uma investigação neuropatológica para avaliar características associadas à doença cerebrovascular. As análises foram feitas no Centro de Neurociências Aplicadas (CeNAp) do Hospital Universitário da UFSC, em colaboração com o Prof. Dr. Roger Walz, e com o médico patologista, e doutor em Ciências Médicas, Dr. Jean Costa Nunes. Foi feita uma análise neuropatológica, com base na padronizada por Jellinger (2001), para a investigação de lesões cerebrovasculares sutis. As seguintes características neuropatológicas foram avaliadas: infartos cerebrais (incluindo infartos territoriais e infartos *borderzone* superficiais e profundos); infartos lacunares; micro infartos corticais; espaços perivasculares alargados; rarefação de matéria branca; alargamento ventricular; atrofia de matéria branca; atrofia granular cortical e necrose laminar cortical.

3.12. Ensaio *in vitro*

3.12.1. Isolamento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana

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

O isolamento da LDL foi realizado por ultracentrifugação de gradiente de densidade descontínua, conforme descrito por Silva et al. (1998). Ao plasma foi adicionado EDTA (1 mg/mL) e sacarose (concentração final de 0,5%) para evitar a agregação de LDL. Cinco mL de plasma-EDTA foi ajustado a uma densidade de 1,22 g/mL com KBr (0,326 g/mL) e em seguida foi adicionado NaCl (1,006 g/mL). A ultracentrifugação foi executada a 191.000 g por 2 horas a 4 °C em ultracentrífuga Hitachi Himac CP80WX, rotor 40ST. Após este processo, a camada contendo LDL (porção superior) foi coletada e dialisada (25 x 16 mm) durante 16 horas a 4°C em tampão fosfato 148 mM (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 136mm,

pH 7,4). O teor de proteína da LDL isolada foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951).

3.12.2. Ensaio utilizando cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

As células foram cultivadas em placas e frascos de cultura, contendo meio de cultura DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina. As culturas foram mantidas em estufa com 95% de umidade, 5% CO₂ a 37°C.

Durante os experimentos, as células foram plaqueadas em placas de seis poços em igual densidade (5 x 10⁵/poço) em meio DMEM/F12 suplementado com soro fetal bovino 10% por 24 h. Após, este meio foi trocado por meio DMEM/F12 suplementado com soro fetal bovino 1%, e as células foram incubadas com a LDL (50 e 100 µg/ml) ou PBS (HUI et al., 2012). Após 24 h das incubações, as células foram recolhidas com tampão HEPES (20 mM, pH 7,0) contendo Triton X-100 0,1%. As atividades das enzimas AChE, GR e GPx e os níveis de GSH foram determinados como descrito anteriormente.

3.13. Análises estatísticas

De modo geral, os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM). A exceção foi a latência para descer da plataforma no teste de esquiiva inibitória do tipo *step down* que foi expressa como mediana ± intervalo interquartil.

No teste de realocação de objeto, o teste t de *Student* foi utilizado para a determinação da mudança de desempenho no teste, ou seja, a avaliação se a % de tempo explorando o objeto trocado de lugar diferia significativamente de um valor teórico de 50%.

O tempo de latência no teste de esquiiva inibitória do tipo *step down* não obedece a uma distribuição normal e não preenche completamente a suposição de homocedasticidade com a imposição de um teto para a resposta sequente. Dessa forma, para análise dos dados contínuos de distribuição não normal realizamos uma análise não paramétrica através do teste Kruskal Wallis. Para comparação dos tempos de latência de descida da sessão treino versus o teste (medidas dependentes) envolvendo o mesmo animal, foi analisado pelo teste da

soma de postos de Wilcoxon, um teste não paramétrico equivalente ao teste t pareado.

As demais comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de *Student*, ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, ou para medidas repetidas quando necessário. Na sessão resultados, os testes estatísticos realizados estão explicitados de acordo com cada metodologia experimental. Quando significativa as ANOVAs, múltiplas comparações *post hoc* foram feitas utilizando os testes de Newman Keuls e de Dunnet. O nível de significância adotado em todos os experimentos foi $P < 0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica[®] (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1 – Camundongos LDLr^{-/-} de meia-idade apresentam comprometimento cognitivo leve?

A primeira hipótese do presente estudo foi que camundongos nocaute para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}), um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, apresentam comprometimento cognitivo leve na “meia-idade”, tal como fora observado por Zambon e colaboradores (2010) em pacientes com hipercolesterolemia familiar de meia-idade. Neste sentido, foram utilizados, no presente estudo, camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e camundongos LDLr^{-/-} jovens adultos (três meses) e de “meia-idade” (quatorze meses). Primeiramente, os níveis plasmáticos de colesterol total e não-HDL nas diferentes idades foram investigados. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias (genótipo, idade) e estão representados na figura 16. A análise indicou efeito do genótipo para os níveis de colesterol total [F(1,38)=630,56, p<0,05], e para os níveis de colesterol não HDL [F(1,38)=642,86, p<0,05]. Como esperado, camundongos LDLr^{-/-} (independente da idade) apresentaram níveis de colesterol total (figura 16A) e colesterol não-HDL (figura 16B) significativamente maiores quando comparados com os camundongos C57Bl/6 da mesma idade (p<0,05).

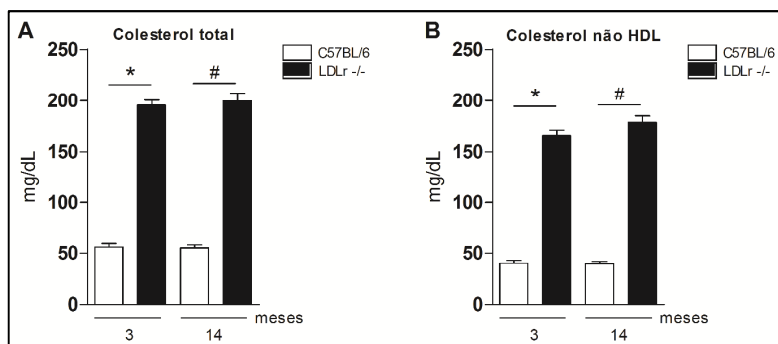


Figura 16. Hipercolesterolemia em camundongos nocaute para o receptor de LDL. Avaliação dos níveis plasmáticos de (A) colesterol total e (B) colesterol não-HDL em camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de 3 e 14 meses. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. *p<0,05 comparado com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de 3 meses. #p<0,05 comparado com camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls).

Posteriormente, a atividade locomotora espontânea dos animais foi avaliada no teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias indicou um efeito do genótipo para o número de cruzamentos totais no campo aberto [F(1,28)=8,66, $p<0,05$]. Camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses apresentaram um número de cruzamentos totais no campo aberto significativamente maior quando comparados com camundongos C57Bl/6 da mesma idade ($p<0,05$) (figura 17A). Ademais, a ANOVA de duas vias indicou um efeito da idade para a porcentagem de cruzamentos centrais no campo aberto [F(1,28)=4,76, $p<0,05$]. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (figura 17B). Em acordo com estas observações, Elder e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos LDLr^{-/-} de três meses apresentam hiperlocomoção no teste do campo aberto, todavia os pesquisadores não observaram alterações nos parâmetros de emocionalidade dos animais neste teste.

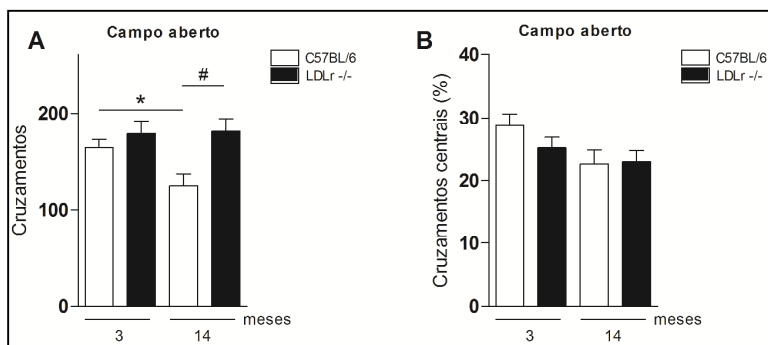


Figura 17. Avaliação do (A) número de cruzamentos totais e (B) da porcentagem de cruzamentos centrais em camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de 3 e 14 meses no teste do campo aberto. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. * $p<0,05$ comparado com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de 3 meses. # $p<0,05$ comparado com camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls).

Ademais, diversos tipos de memórias (de referência espacial, operacional e procedural) foram avaliados no presente estudo, como descritas anteriormente nos Materiais e Métodos. A memória operacional foi avaliada no teste do labirinto aquático. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias (genótipo, idade) com medidas repetidas e estão representados na figura

18A. A análise indicou efeito da idade [$F(1,124)=11,85$, $p<0,05$], da repetição [$F(3,372)=6,20$, $p<0,05$], e da interação entre repetição, genótipo e idade [$F(3,372)=3,51$, $p<0,05$]. Foram visualizadas diferenças nas latências de fuga no segundo e no quarto *trial* da tarefa entre os camundongos LDLr^{-/-} de três e quatorze meses ($p<0,05$). De fato, pode ser observado na figura 18A que os camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses não aprenderam a tarefa, uma vez que as latências de escape não diminuíram com as sessões de treino, indicando déficits de memória operacional.

A memória espacial de curta duração foi avaliada no teste de realocação de objeto. Como mostrado na figura 18B, apenas os camundongos C57Bl/6 de três meses investigaram o objeto deslocado por um tempo significativamente maior que o objeto não deslocado, como indicado pelo aumento significativo no índice de localização em comparação com 50% ($t=8,12$, $p<0,05$). Por outro lado, camundongos C57Bl/6 de quatorze meses e camundongos LDLr^{-/-} (independente da idade) não foram capazes de identificar a alteração espacial no campo aberto ($p>0,05$). O teste de realocação de objeto fornece um índice qualitativo (os animais discriminam ou não a mudança de localização do objeto), e, provavelmente por este motivo, não foram observadas diferenças de desempenho entre os camundongos LDLr^{-/-} de três e quatorze meses.

A memória espacial de curta e longa duração também foi avaliada no teste da esquiwa inibitória do tipo *step down*. Os resultados apresentados na figura 18C mostram que camundongos C57Bl/6 (independente da idade) e camundongos LDLr^{-/-} de três meses apresentaram aprendizado e memória na tarefa da esquiwa inibitória tanto no teste de curta quanto de longa duração. Contudo, análises estatísticas utilizando o teste da soma de postos de Wilcoxon, indicaram que não há diferenças estatísticas entre a latência para descida da plataforma no treino e nas sessões de teste de 1,5 h e 24 h ($p>0,05$) nos camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses. A memória de curta duração se refere a uma fase que independe de síntese de proteínas e dura em torno de 1-3 horas, enquanto que a memória de longa duração se refere a uma fase dependente de síntese proteica e dura dias, semanas ou até mais (BEKINSCHTEIN et al., 2007). Com estes dados, foram corroborados os achados clínicos que apontam para um maior desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve em pacientes com hipercolesterolemia familiar de meia-idade.

A memória de procedimento foi avaliada no teste de resposta de medo condicionado ao som. A ANOVA de duas vias indicou um efeito

do genótipo para o tempo total de congelamento no teste [F(1,38)=24,88, $p < 0,05$]. Camundongos LDLr^{-/-} (independente da idade) apresentaram menores tempos de congelamento em comparação com camundongos C57Bl/6 da mesma idade ($p < 0,05$) (figura 18D). Estes resultados sugerem, de maneira inédita, que camundongos LDLr^{-/-} apresentam prejuízos de memória procedural em relação aos camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem. Contudo, estes déficits de memória procedural não foram potencializados pelo envelhecimento.

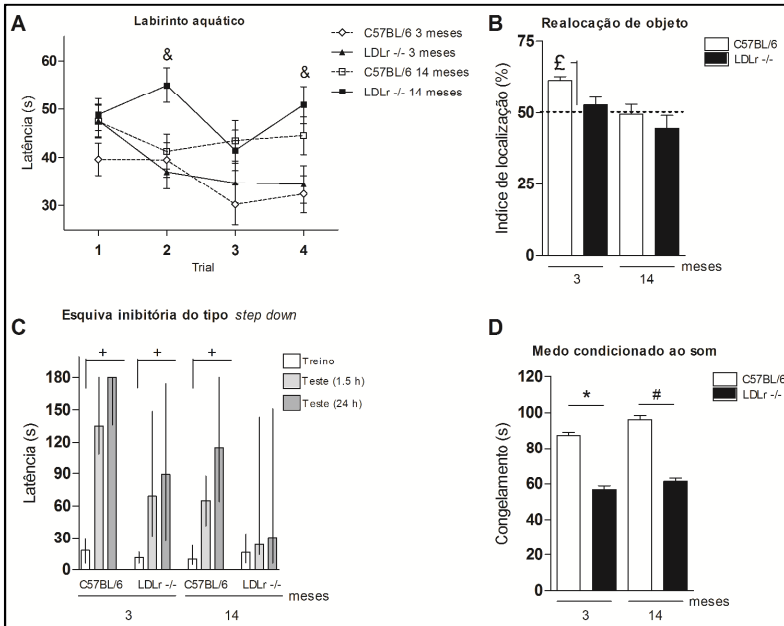


Figura 18. Déficits cognitivos em camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade”. Foram realizados os testes do (A) labirinto aquático, (B) da realocação de objeto, (C) da esquiva inibitória do tipo *step down*, e (D) do medo condicionado ao som. Os valores da esquiva inibitória estão expressos em mediana (intervalos interquartis). Os demais valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. & $p < 0,05$ comparado com camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls). $\epsilon p < 0,05$ versus 50% (teste *t*). + $p < 0,05$ comparado com as sessões de treino e teste do mesmo grupo (teste da soma de postos de Wilcoxon). * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de 3 meses. # $p < 0,05$ comparado com camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls).

Considerando que a diminuição da atividade colinérgica no prosencéfalo basal é comumente observada no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (DAVIES; MALONEY, 1976), e que a função da acetilcolina nos processos de aprendizado e memória é bem estabelecida (ROBINSON et al., 2011), no presente estudo foi, posteriormente, avaliada a atividade da enzima AChE como marcador da função do sistema colinérgico dos animais. A ANOVA de duas vias indicou um efeito do genótipo [$F(1,36)=52,88$, $p<0,05$] e da idade [$F(1,36)=15,41$, $p<0,05$] na atividade da AChE no córtex pré-frontal. Camundongos C57Bl/6 de quatorze meses e $LDLr^{-/-}$ (independente da idade) apresentaram um aumento significativo na atividade da AChE no córtex pré-frontal quando comparados com camundongos C57Bl/6 de três meses (figura 19A). Ademais, foi observado um aumento significativo na atividade da AChE no córtex pré-frontal de camundongos $LDLr^{-/-}$ de quatorze meses em comparação com camundongos $LDLr^{-/-}$ de três meses ($p<0,05$). Por outro lado, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos na atividade da AChE no hipocampo ($p>0,05$) (figura 19B).

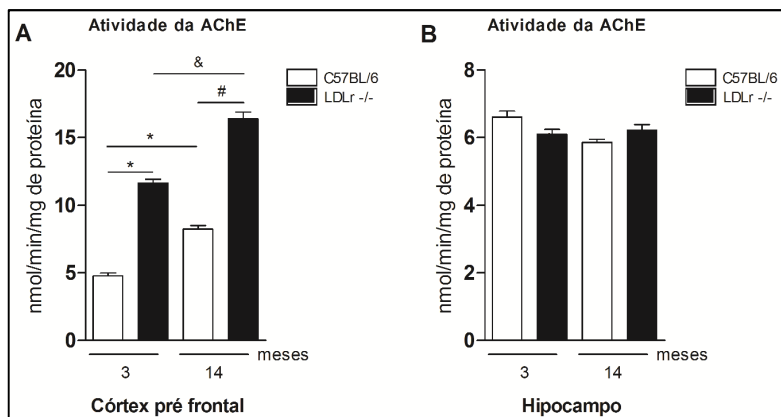


Figura 19. Avaliação da atividade da enzima AChE (A) no córtex pré-frontal e (B) no hipocampo de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e $LDLr^{-/-}$ de 3 e 14 meses. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p<0,05$ comparado com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de 3 meses. # $p<0,05$ comparado com camundongos $LDLr^{-/-}$ de 3 meses. & $p<0,05$ comparado com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de 14 meses. (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls).

Os efeitos da tacrina, um inibidor da enzima AChE, foram, então, avaliados em camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses no teste da esquiwa inibitória do tipo *step down* e na atividade da AChE no córtex pré-frontal. A tacrina (1,5 mg/kg, i.p.) foi administrada trinta minutos antes do treino na esquiwa inibitória do tipo *step down*. Contudo, análises estatísticas, utilizando o teste da soma de postos de Wilcoxon, indicaram que não houve diferenças estatísticas entre a latência para descida da plataforma no treino e nas sessões de teste de 1,5 h e 24 h ($p > 0,05$) nos camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses tratados com a tacrina (figura 20A). Após trinta minutos da administração da tacrina (no momento do treino na esquiwa inibitória), grupos independentes de animais foram eutanasiados para a mensuração da atividade da AChE no córtex pré-frontal. Análises estatísticas utilizando o teste t para amostras independentes indicaram uma inibição significativa (cerca de 30%) na atividade da AChE pela tacrina ($t = 3.82$, $p < 0,05$) (figura 20B).

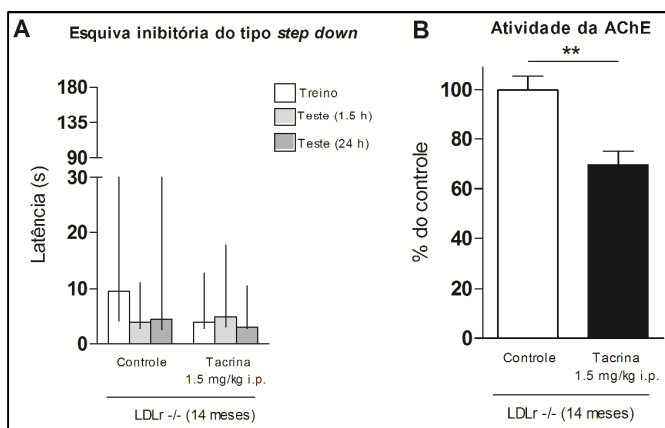


Figura 20. O tratamento com o inibidor da enzima AChE tacrina (1,5 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes do treino na esquiwa inibitória do tipo *step down* não alterou a performance de camundongos LDLr^{-/-} de 14 meses no teste (A), embora uma inibição de cerca de 30% na atividade da enzima foi visualizada no córtex pré-frontal no momento do treino (B). Os valores da esquiwa inibitória estão expressos em mediana (intervalos interquartis). Os demais valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. ** $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (teste t para amostras independentes).

O sistema antioxidante dependente da GSH é um importante sistema de proteção contra moléculas (pró)-oxidantes no SNC (DRINGEN; HIRRLINGER, 2003), sendo que a disfunção deste sistema

está envolvida em diversas condições neuropatológicas (LEE et al., 2010). Desta forma, no presente estudo, nós avaliamos as atividades da GPx, da GR e os níveis de GSH em homogenatos de córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de três e quatorze meses. Os resultados destes experimentos foram analisados por ANOVA de duas vias (genótipo, idade).

As análises indicaram um efeito da interação entre genótipo e idade na atividade da GPx [F(1,36)=15,34, p<0,05], da GR [F(1,36)=15,24, p<0,05] e nos níveis de GSH [F(1,36)=6,37, p<0,05] no córtex pré-frontal. Camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses apresentaram um aumento significativo nos níveis de GSH e nas atividades da GPx e GR no córtex pré-frontal em comparação a camundongos LDLr^{-/-} de três meses (p<0,05) (figura 21A-C).

As análises indicaram um efeito do genótipo na atividade da GPx no hipocampo [F(1,34)=5,18, p<0,05], e da interação entre genótipo e idade na atividade da GR [F(1,34)=4,53, p<0,05] e nos níveis de GSH [F(1,30)=4,36, p<0,05] no hipocampo. Camundongos C57Bl/6 de quatorze meses e camundongos LDLr^{-/-} (independente da idade) apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de GSH e nas atividades da GPx e GR no hipocampo em comparação a camundongos C57Bl/6 de três meses (p<0,05) (figura 21D-E).

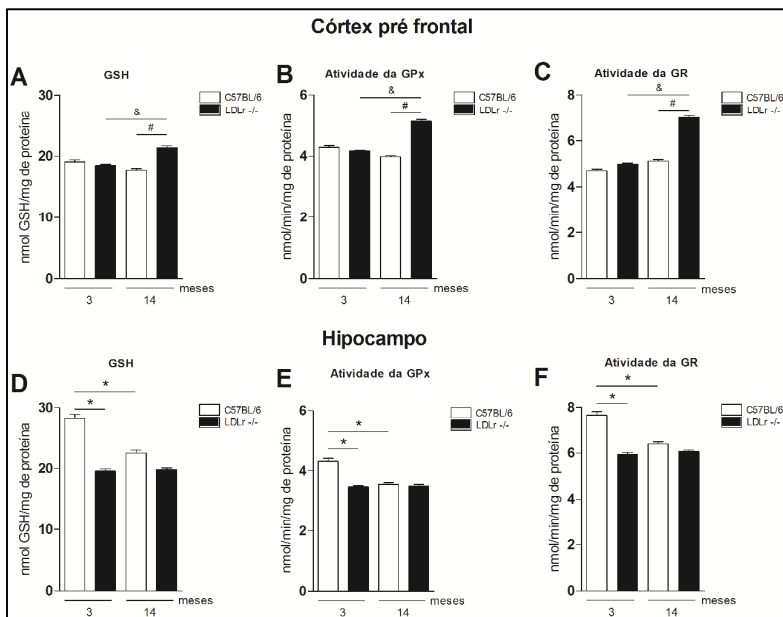


Figura 21. Avaliação dos níveis de GSH (A,D) e da atividade das enzimas GPx (B,E) e GR (C,F) no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de 3 e 14 meses. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de 3 meses. # $p < 0,05$ comparado com camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses. & $p < 0,05$ comparado com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de 14 meses. (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls).

A atividade da enzima antioxidante catalase e os níveis de peroxidação lipídica (ensaio de TBARS) também foram aferidos no córtex pré-frontal dos animais. A ANOVA de duas vias indicou um efeito da idade na atividade da catalase [F(1,36)=5,40, $p < 0,05$]. Camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses apresentaram um aumento significativo na atividade da catalase em comparação com camundongos LDLr^{-/-} de três meses ($p < 0,05$) (figura 22A). A ANOVA de duas vias indicou um efeito da idade nos níveis de TBARS [F(1,30)=4,60, $p < 0,05$]. Camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses apresentaram uma forte tendência de aumento nos níveis de peroxidação lipídica em comparação com camundongos LDLr^{-/-} de três meses ($p = 0,07$) (figura 22B).

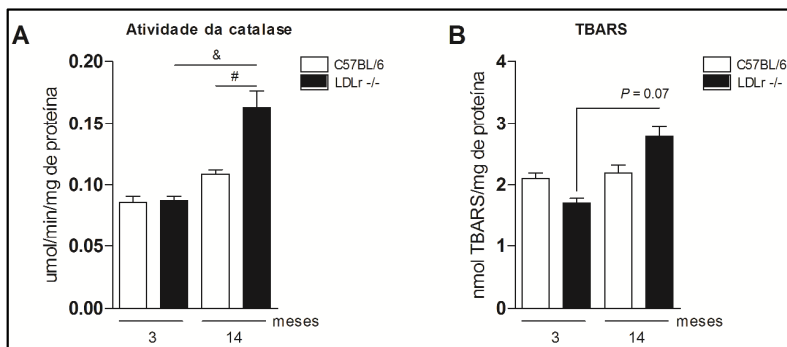


Figura 22. Avaliação (A) da atividade da enzima catalase e (B) dos níveis de peroxidação lipídica (ensaio de TBARS) no córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de 3 e 14 meses. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. #p<0,05 comparado com camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses. &p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem de 14 meses. (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls).

Alguns estudos apontam para a implicação de anormalidades lipídicas e a patogênese de doenças cerebrovasculares (DEMCHUK et al., 1999; GOLDSTEIN, 2007). O infarto cerebral contribui para o desenvolvimento de déficits cognitivos em, aproximadamente, 20% de pacientes idosos (LINDEN et al., 2004). Uma vez que o colesterol está envolvido na patogênese da aterosclerose, a qual, por sua vez, é associada com desregulação do fluxo sanguíneo cerebral e hipoperfusão, a associação entre hipercolesterolemia e déficits cognitivos poderia estar relacionada a mecanismos vasculares (HOFMAN et al., 1997). Desta forma, nós procedemos a uma investigação neuropatológica para avaliar se os prejuízos cognitivos associados à hipercolesterolemia nos animais LDLr^{-/-} estariam associados à infartos cerebrais. Foi feita uma análise neuropatológica, com base na padronizada por Jellinger (2001), para a investigação de lesões cerebrovasculares sutis. As seguintes características neuropatológicas foram avaliadas: infartos cerebrais (incluindo infartos territoriais e infartos *borderzone* superficiais e profundos); infartos lacunares; micro infartos corticais; espaços perivasculares alargados; rarefação de matéria branca; alargamento ventricular; atrofia de matéria branca; atrofia granular cortical e necrose laminar cortical. Entretanto, não foi observado nenhuma característica patológica relacionada a infarto cerebral nos animais LDLr^{-/-} de 14 meses, indicando que o comprometimento cognitivo observado nestes

animais parece não estar relacionado a doença cerebrovascular. Interessantemente, esses resultados estão de acordo com o estudo clínico de Zambon e colaboradores (2010), que demonstrou que o comprometimento cognitivo leve associado à hipercolesterolemia familiar não estava associado à patologia estrutural.

4.2. Experimento 2 – Estratégias hipolipemiantes revertem os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr^{-/-}?

A segunda hipótese do presente estudo foi que estratégias hipolipemiantes reverteriam os prejuízos cognitivos de camundongos nocaute para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) no teste da realocação de objeto. Este teste foi escolhido por propiciar um índice qualitativo, ou seja, o animal aprende ou não a tarefa (discrimina ou não a alteração espacial no campo aberto). Neste sentido, foram avaliados os efeitos do fármaco hipolipemiante probucol e do exercício físico voluntário, bem como a associação de ambas as estratégias.

Primeiramente, os efeitos do exercício físico voluntário e do probucol sobre os níveis de colesterol total, de colesterol HDL, de colesterol não-HDL e de triglicerídeos em camundongos LDLr^{-/-} foram investigados. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias (exercício, tratamento). A análise indicou efeito da interação entre exercício e tratamento para os níveis de colesterol total [F(1,15)=8,76, p<0,05], e para os níveis de colesterol não-HDL [F(1,15)=11,30, p<0,05]. Camundongos LDLr^{-/-} tratados com o probucol e/ou submetidos ao exercício físico apresentaram níveis de colesterol total e não-HDL significativamente menores em comparação com camundongos LDLr^{-/-} tratados com água e sedentários (p<0,05) (figura 23A-B). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de colesterol HDL e triglicerídeos entre os grupos experimentais (figura 23C-D).

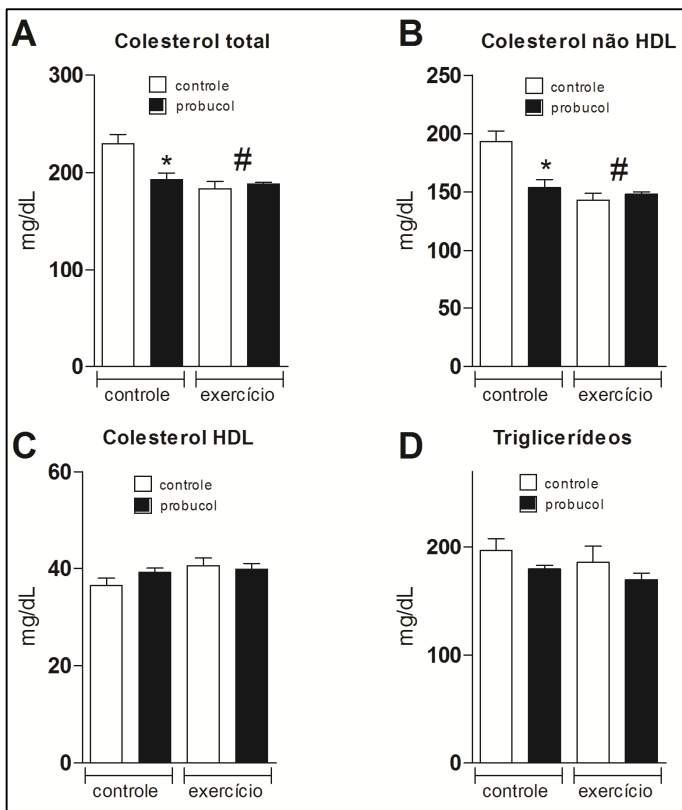


Figura 23. Efeitos do probucol e do exercício físico voluntário nos níveis plasmáticos de lipídeos em camundongos $LDLr^{-/-}$ de oito meses. (A) níveis de colesterol total, (B) níveis de colesterol não-HDL, (C) níveis de colesterol HDL, e (D) níveis de triglicerídeos. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com camundongos $LDLr^{-/-}$ controle/sedentários. # $p < 0,05$ comparado com camundongos $LDLr^{-/-}$ sedentários (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls).

Como ilustrado na figura 24B, apenas os camundongos $LDLr^{-/-}$ submetidos ao exercício físico voluntário (independente do tratamento com probucol) investigaram o objeto deslocado por um tempo significativamente maior que o objeto não deslocado, como indicado pelo aumento significativo no índice de localização em comparação com 50% ($t=6.00 + \text{água}$ e $t=6.85 + \text{probuco}$, $p < 0,05$). Cabe ressaltar que não houve preferência inata pelos objetos na sessão de treino, como pode ser observado na figura 24A.

Ademais, a ANOVA de duas vias indicou um efeito do exercício nos cruzamentos totais [$F(1,35)=17,93$, $p<0,05$] e na porcentagem de cruzamentos centrais [$F(1,35)=10,48$, $p<0,05$] no campo aberto. Camundongos $LDLr^{-/-}$ expostos ao exercício voluntário apresentaram uma diminuição da exploração total e um aumento na locomoção central no campo aberto ($p<0,05$) (figura 24C-D).

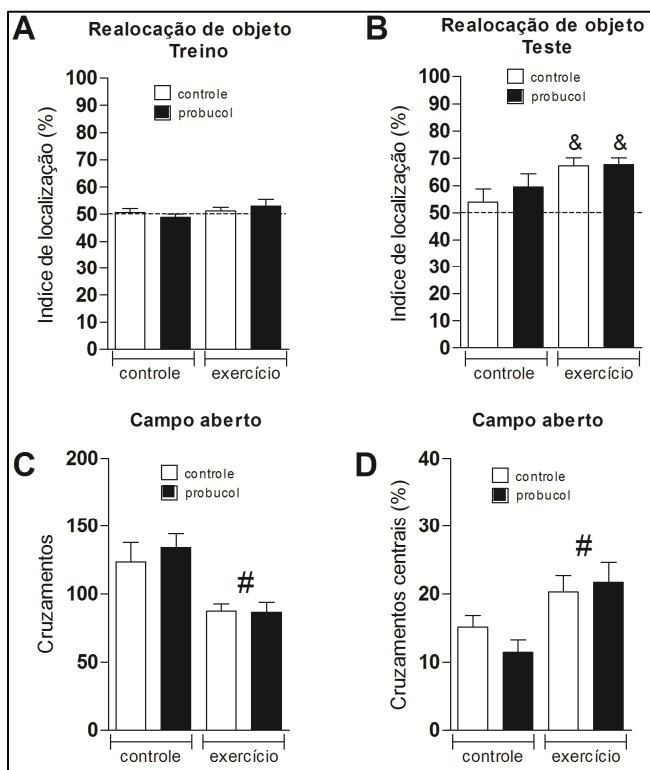


Figura 24. Efeitos do probucol e do exercício físico voluntário no teste da realocação do objeto e no campo aberto. (A) sessão de treino e (B) sessão de teste no teste da realocação de objeto. (C) número de cruzamentos totais e (D) porcentagem de cruzamentos periféricos no campo aberto. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. & $p<0,05$ versus 50% (teste t). # $p<0,05$ comparado com camundongos $LDLr^{-/-}$ sedentários (controle) (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls).

4.3. Experimento 3 – O enriquecimento ambiental durante períodos críticos do desenvolvimento previne os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr^{-/-} adultos?

A terceira hipótese do presente estudo foi que o enriquecimento ambiental durante os períodos críticos do desenvolvimento reverteriam os prejuízos cognitivos de camundongos nocaute para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) jovens adultos no teste da realocação de objeto. Novamente, este teste foi escolhido por propiciar um índice qualitativo de aprendizado. Todavia, quando avaliado os efeitos do enriquecimento ambiental (do nascimento até a adolescência) sobre os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr^{-/-} jovens adultos no teste de realocação de objeto não foi observado melhora (figura 25B). Camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas, de três meses, submetidos ao enriquecimento ambiental até a adolescência, não foram capazes de identificar a alteração espacial no campo aberto ($p > 0,05$).

Por outro lado, a exposição ao enriquecimento ambiental aumentou significativamente a porcentagem de locomoção central de camundongos LDLr^{-/-} machos ($t=3.16$, $p < 0,05$) e fêmeas ($t=3.23$, $p < 0,05$) no campo aberto. Não foram observadas diferenças na locomoção total no campo aberto entre os grupos ($p > 0,05$).

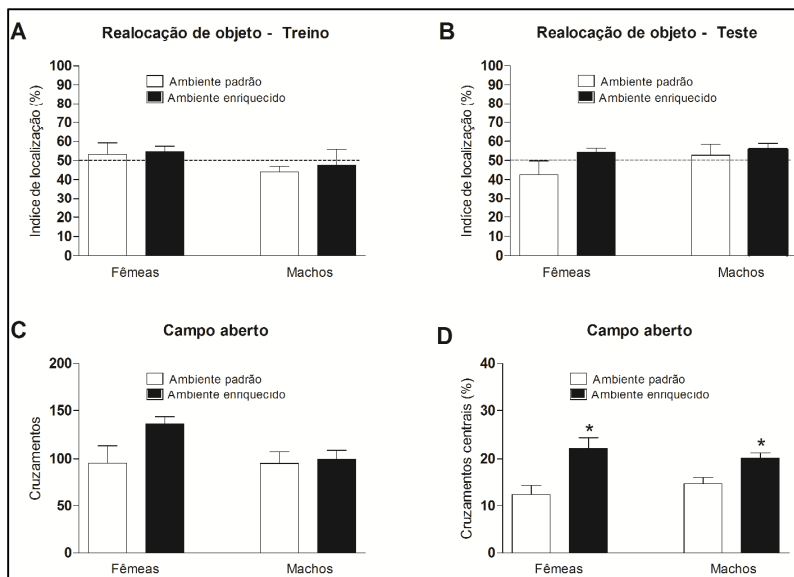


Figura 25. Efeitos do enriquecimento ambiental do nascimento até a adolescência (dia pós-natal 45) no teste da realocação de objeto e no campo aberto em camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas de 3 meses. (A) sessão de treino e (B) sessão de teste no teste da realocação de objeto. (C) número de cruzamentos totais e (D) porcentagem de cruzamentos periféricos no campo aberto. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. *p<0,05 comparado com camundongos LDLr^{-/-} controle (ambiente padrão) (teste t para amostras independentes).

4.4. Experimento 4 – Em busca de mecanismos bioquímicos iniciais que relacionam a hipercolesterolemia com prejuízos cognitivos.

No desenho experimental quatro, camundongos *Swiss* de três meses foram expostos a uma dieta hipercolesterolêmica por dois meses. O objetivo específico deste protocolo experimental foi avaliar a presença de prejuízos cognitivos nesses animais, e, posteriormente, procurar mecanismos bioquímicos subjacentes a estes déficits cognitivos. Especificamente, foi avaliado se os prejuízos cognitivos estariam relacionados com estresse oxidativo, e/ou alterações na função do sistema colinérgico, e/ou disfunção da barreira hemato-encefálica, e/ou alterações no processamento da proteína precursora amiloide. Os

resultados deste grupo experimental foram analisados por teste *t* para amostras independentes.

A dieta hipercolesterolêmica não alterou o ganho de peso dos animais em nenhum período durante os dois meses de exposição (dados não mostrados). Por outro lado, como mostrado na figura 26, a dieta hipercolesterolêmica induziu um aumento significativo nos níveis de colesterol total ($t=5.30$, $p<0,05$), de colesterol não HDL ($t=5.77$, $p<0,05$) e de colesterol HDL ($t=2.62$, $p<0,05$). Também foi observado um aumento significativo nos níveis plasmáticos de triglicerídeos ($t=2.88$, $p<0,05$). Por outro lado, os níveis plasmáticos de glicose não foram alterados ($t=1.26$, $p=0,23$).

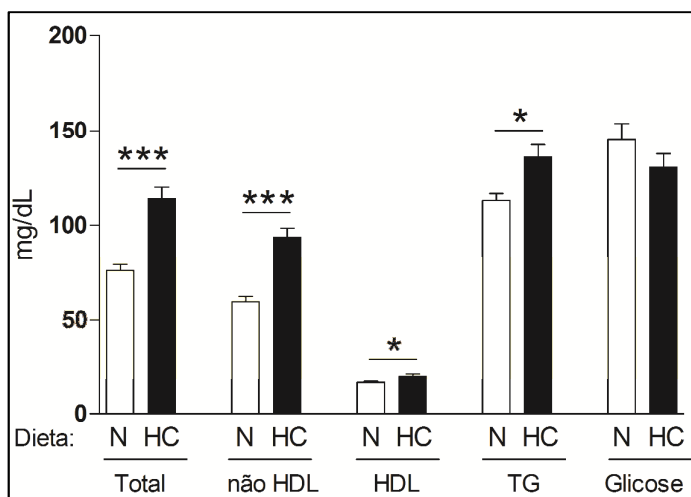


Figura 26. Níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol não-HDL, colesterol HDL, triglicerídeos (TG) e glicose em camundongos *Swiss* de três meses alimentados por dois meses com dieta padrão para roedores (N) ou dieta hipercolesterolêmica (HC). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p<0,05$, *** $p<0,0005$ comparado com camundongos controle (dieta normal) (teste *t* para amostras independentes).

A memória espacial de curta duração dos animais foi novamente avaliada no teste de realocação de objeto. Como mostrado na figura 27A, camundongos expostos à dieta hipercolesterolêmica não foram capazes de identificar a alteração espacial no campo aberto ($t=0,29$, $p=0,78$). Por outro lado, camundongos expostos à dieta padrão exploraram o objeto deslocado por um período de tempo significativamente maior, como indicado pelo aumento significativo no

índice de localização em comparação com 50% ($t=4,44$, $p<0,05$). Os prejuízos cognitivos dos camundongos expostos à dieta hipercolesterolêmica não foram relacionados à alteração no comportamento exploratório e/ou emocionalidade. Como mostrado na figura 27B, não foram visualizadas diferenças entre os grupos nos cruzamentos totais no campo aberto ($t=0,37$, $p=0,72$). As respostas do “tipo depressivas” foram avaliadas no teste do nado forçado. Como pode ser observado na figura 27C, não foram visualizadas alterações no tempo de imobilidade dos animais ($t=0,86$, $p=0,41$). Ademais, o comportamento do “tipo ansioso” dos animais foi avaliado no teste do labirinto em cruz elevado. Como mostrado na figura 27 (D-F), não foram visualizadas diferenças na porcentagem de entradas nos braços abertos ($t=0,23$, $p=0,82$) e na porcentagem de tempo nos braços abertos ($t=0,77$, $p=0,45$). Também não foram observadas diferenças no número total de entradas nos braços fechados ($t=0,55$, $p=0,59$), um índice de atividade locomotora no teste.

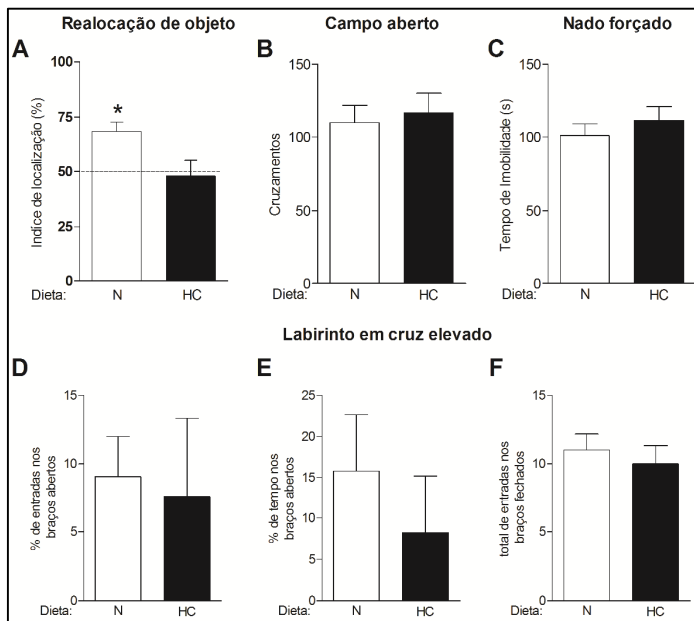


Figura 27. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica (HC) na cognição, locomoção espontânea, e comportamentos relacionados à depressão/ansiedade em camundongos *Swiss*. (A) teste de realocação de objeto, (B) campo aberto, (C) teste da natação forçada, (D-F) teste do labirinto em cruz elevado. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p<0,05$ versus 50% (teste *t*).

Da mesma forma que no protocolo experimental um, a atividade da enzima AChE foi avaliada como marcador da função do sistema colinérgico. Como mostrado na figura 28, a exposição à dieta hipercolesterolêmica induziu um aumento significativo na atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal ($t=2,26$, $p<0,05$) e no hipocampo ($t=2,38$, $p<0,05$) dos camundongos.

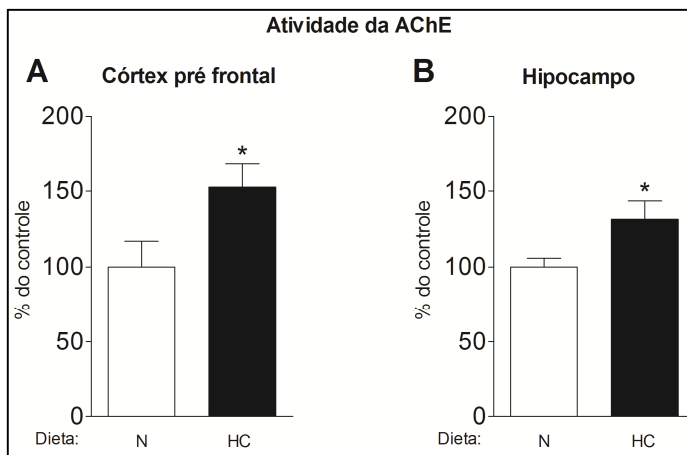


Figura 28. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica (HC) na atividade da enzima AChE no (A) córtex pré-frontal e (B) hipocampo de camundongos *Swiss*. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p<0,05$ comparado com o grupo controle (dieta normal) (teste t para amostras independentes).

Posteriormente, as atividades da GPx, da GR e os níveis de GSH foram avaliadas como biomarcadores de estresse oxidativo no córtex pré-frontal, hipocampo e fígado. Como mostrado na tabela 2, a exposição à dieta hipercolesterolêmica diminuiu significativamente a atividade da GPx no córtex pré-frontal dos camundongos ($t=2,24$, $p<0,05$). Contudo, não foram observadas outras diferenças entre os grupos nos níveis de GSH e atividade da GR e GPx no córtex pré-frontal e hipocampo. A tabela 1 sumariza os resultados e os valores de t e p . Por outro lado, a exposição à dieta hipercolesterolêmica aumentou significativamente a atividade da GPx ($t=4,88$, $p<0,05$) e da GR ($t=3,06$, $p<0,05$) no fígado, enquanto que os níveis de GSH não foram alterados ($t=0,51$, $p=0,62$). A peroxidação lipídica foi avaliada pelo ensaio de TBARS, contudo, conforme ilustrado na tabela 2, os níveis de

peroxidação lipídica no fígado, córtex pré-frontal e hipocampo não foram aumentados pela exposição à dieta hipercolesterolêmica.

Tabela 2. Efeitos de uma dieta hipercolesterolêmica em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no córtex pré-frontal, hipocampo e fígado de camundongos.

		<i>Dieta normal</i>	<i>Dieta hipercolesterolêmica</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Córtex pré-frontal	Níveis de GSH (%)	100 ± 4.78	103.7 ± 3.03	0.65	0.53
	Atividade da GPx (%)	100 ± 3.48	88.95 ± 3.44	2.24	*
	Atividade da GR (%)	100 ± 2.78	98 ± 2.72	0.51	0.62
	Níveis de TBARS (%)	100 ± 4.62	107.6 ± 9.59	0.68	0.51
Hipocampo					
Hipocampo	Níveis de GSH (%)	100 ± 13.39	75.96 ± 7.18	1.30	0.22
	Atividade da GPx (%)	100 ± 7.78	83.61 ± 9.44	1.66	0.13
	Atividade da GR (%)	100 ± 11.94	83.42 ± 4.86	1.28	0.23
	Níveis de TBARS (%)	100 ± 7.79	89.24 ± 5.91	1.10	0.30
Fígado					
Fígado	Níveis de GSH (%)	100 ± 16.81	90.86 ± 8.47	0.51	0.62
	Atividade da GPx (%)	100 ± 4.29	214.3 ± 20.52	4.88	***
	Atividade da GR (%)	100 ± 9.31	135.2 ± 6.77	3.06	*
	Níveis de TBARS (%)	100 ± 7.66	157.3 ± 32.51	1.72	0.11

GSH – glutatona (nmol/mg de proteína); GPx – glutatona peroxidase (nmol NADPH/min/mg de proteína); GR – glutatona redutase (nmol NADPH/min/mg de proteína); TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/mg de proteína). Dados calculados como porcentagem em relação ao grupo dieta normal e expressos como média ± EPM. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (teste “*t*” de Student).

As densidades da BACE-1 e da aquaporina-4 (AQP-4) foram mensuradas como biomarcadores do processamento da APP e da integridade da BHE, respectivamente. Como mostrado na figura 29, a exposição à dieta hipercolesterolêmica não alterou a densidade da BACE-1 no córtex pré-frontal ($t=0,69$, $p=0,51$) e no hipocampo ($t=0,05$, $p=0,96$). Ademais, a exposição à dieta hipercolesterolêmica também não alterou a densidade da AQP-4 no córtex pré-frontal ($t=0,82$, $p=0,44$) e no hipocampo ($t=0,69$, $p=0,53$).

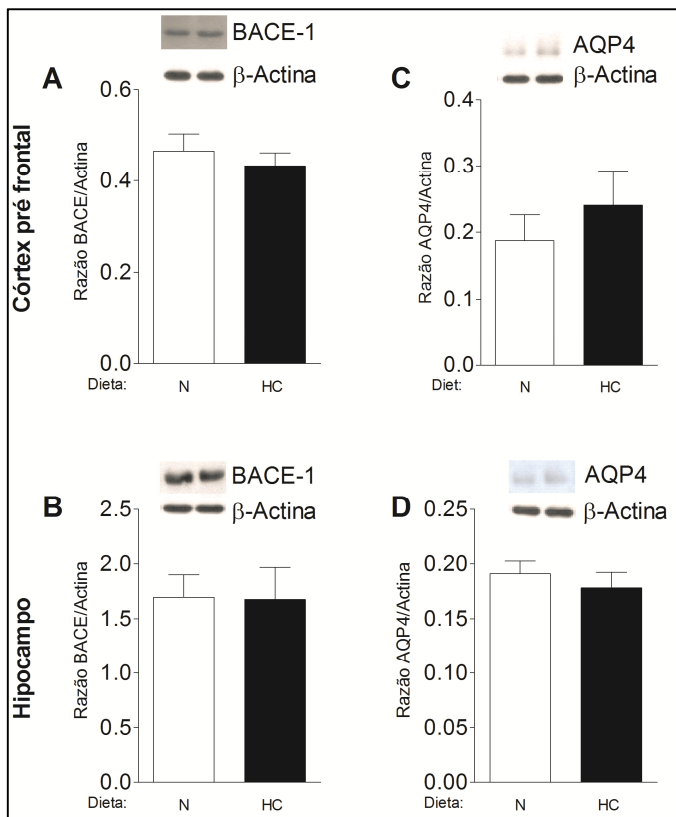


Figura 29. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica (HC) na densidade da proteína BACE-1 (A, B) e da proteína AQP-4 (C, D) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos *Swiss*. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média.

Ademais, com o intuito de manipular os níveis de colesterol celular, células da linhagem SH-SY5Y foram expostas ao colesterol LDL por 24 horas (GUILLAUMOT et al., 2010), e, posteriormente, as atividades da AChE, GPx, GR e os níveis de GSH foram mensurados. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via (tratamento). A ANOVA de uma via indicou efeito do tratamento na atividade da AChE [$F(2,9)=6,28$; $p<0,05$]. O teste de Dunnett's indicou que o colesterol LDL na dose de 100 $\mu\text{g/ml}$ aumentou significativamente a atividade da ACHE nas células SH-SY5Y (figura 30A). Por outro lado, não foram visualizados efeitos do tratamento nos níveis de GSH (figura 30B), e nas atividades da GPx (figura 30C) e da GR (figura 30D).

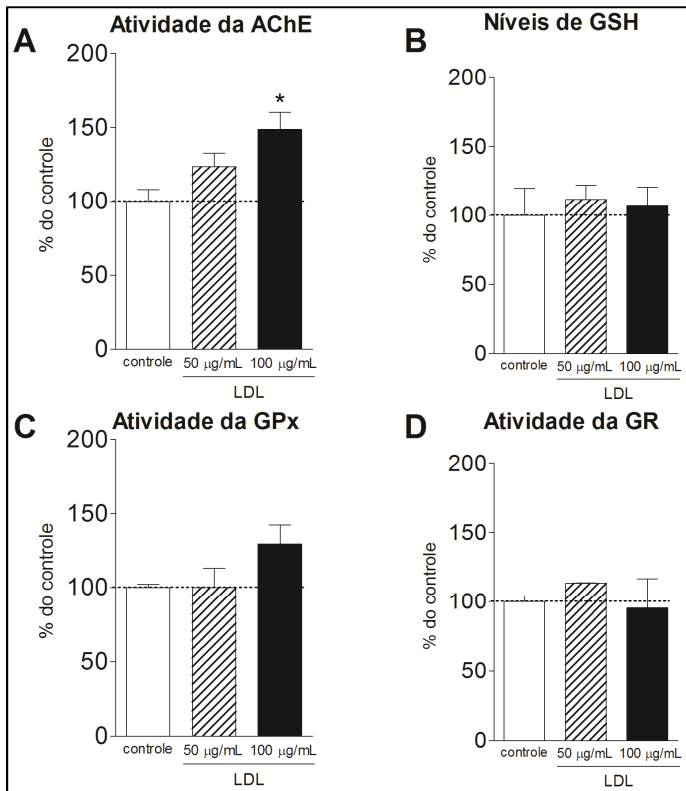


Figura 30. Efeitos do colesterol LDL na atividade da (A) AChE, (B) nos níveis de GSH, e nas atividades da (C) GPx e (D) GR em células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y. As células foram expostas ao colesterol LDL (50 ou 100 µg/ml) durante 24 horas. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com o controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnett's).

4.5. Experimento 5 – Camundongos hipercolesterolêmicos são mais susceptíveis aos efeitos de neurotóxicos?

Embora seja bem estabelecido que o MeHg induza neurotoxicidade devido aos seus efeitos diretos em neurônios, astrócitos e células gliais (FARINA et al., 2011), nós especulamos, no presente estudo, que efeitos indiretos, como a hipercolesterolemia, poderiam contribuir para os efeitos neurotóxicos do MeHg. Esta hipótese foi baseada em observações prévias do nosso grupo de pesquisa, as quais demonstraram alterações neuroquímicas e neurocomportamentais em

camundongos hipercolesterolêmicos, especialmente relacionadas a um desequilíbrio no sistema antioxidante vinculado a GSH (de OLIVEIRA et al., 2011).

Neste sentido, primeiramente, os efeitos da administração crônica de MeHg (40 mg/l na água de beber por 21 dias) sobre os níveis de colesterol total, de colesterol HDL, de colesterol não-HDL, e de triglicerídeos de camundongos C57Bl/6 e LDLr^{-/-} foram investigados. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias (genótipo, tratamento) e estão representados na figura 31. A análise indicou efeitos do genótipo e do tratamento para os níveis de colesterol total [F(1,24)=150,69, p<0.05; F(1,24)=33,91, p<0,05, respectivamente], para os níveis de colesterol HDL [F(1,24)=4,99, p<0.05; F(1,24)=13,82, p<0,05, respectivamente] e de colesterol não HDL [F(1,24)=148,84, p<0.05; F(1,24)=28,69, p<0,05, respectivamente]. Camundongos C57Bl/6 tratados com MeHg apresentaram um significativo aumento nos níveis plasmáticos de colesterol total e de colesterol não HDL em comparação com camundongos C57Bl/6 tratados com água (p<0,05). Estes resultados demonstram, de maneira inédita, que a exposição crônica ao MeHg induz hipercolesterolemia em camundongos. Ademais, camundongos LDLr^{-/-} tratados com MeHg também apresentaram um significativo aumento nos níveis plasmáticos de colesterol total, de colesterol HDL e colesterol não-HDL em comparação com camundongos LDLr^{-/-} tratados com água (p<0,05).

A análise indicou efeitos da interação genótipo e tratamento nos níveis plasmáticos de triglicerídeos [F(1,20)=6,41, p<0,05]. Camundongos LDLr^{-/-} tratados com MeHg apresentaram uma significativa diminuição nos níveis plasmáticos de triglicerídeos em comparação com camundongos LDLr^{-/-} tratados com água (p<0,05).

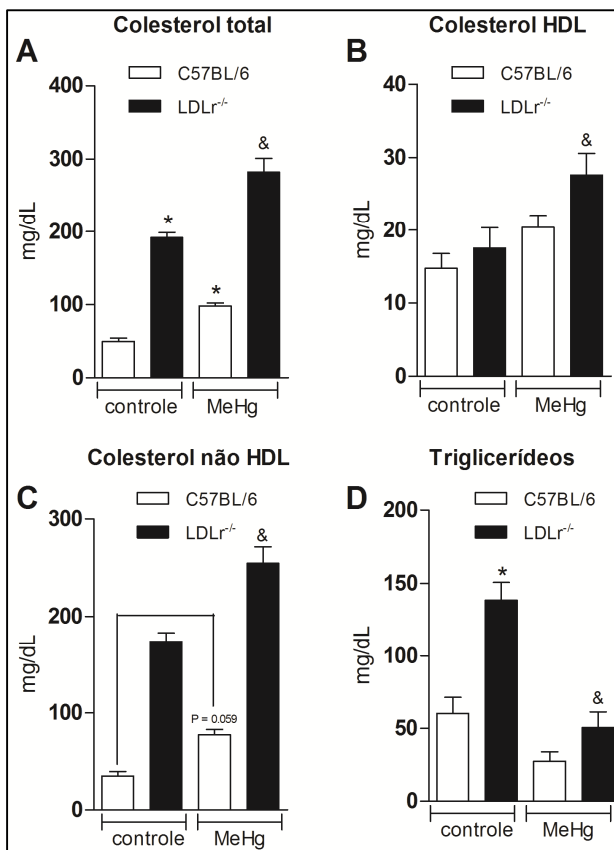


Figura 31. Exposição crônica ao MeHg (40 mg/l na água de beber por 21 dias) induz dislipidemia em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. Níveis de (A) colesterol total, (B) colesterol HDL, (C) colesterol não-HDL, e (D) triglicerídeos. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. *p<0,05 comparado com camundongos C57BL/6 controle. &p<0,05 comparado com camundongos LDLr^{-/-} controle (ANOVA de duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls).

Após 21 dias de exposição ao MeHg (40 mg/l na água de beber), a atividade da GPx no cerebelo e a ativação glial (imunomarcagem da GFAP) foram utilizadas como marcadores de neurotoxicidade. A ANOVA de duas vias indicou um efeito do MeHg [F(1,16)=13,75, p<0,05] na expressão de GFAP no cerebelo. Camundongos LDLr^{-/-} tratados com MeHg apresentaram um aumento significativo na expressão da GFAP em comparação com camundongos LDLr^{-/-} tratados

com água ($p < 0,05$) (figura 32A-B). Ademais, a ANOVA de duas vias indicou efeito do genótipo [$F(1,24)=5,53$, $p < 0,05$] e do tratamento [$F(1,24)=41,04$, $p < 0,05$] na atividade da GPx no cerebelo. Análises posteriores indicaram uma diminuição significativa na atividade da GPx em camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e $LDLr^{-/-}$ tratados com mercúrio em comparação com os respectivos grupos controles ($p < 0,05$) (figura 32C). Também foi observada uma redução significativa na atividade da GPx no cerebelo de camundongos $LDLr^{-/-}$ em comparação com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem ($p < 0,05$).

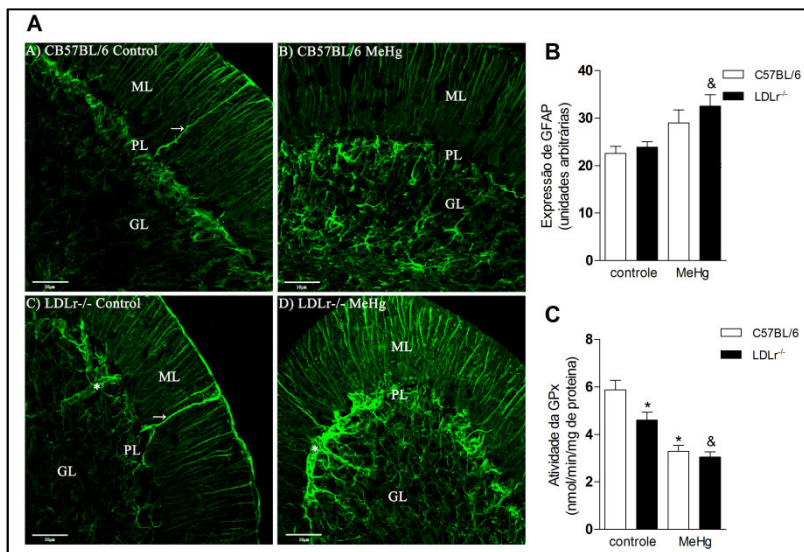


Figura 32. Exposição crônica ao MeHg (40 mg/l na água de beber por 21 dias) induz aumento da expressão da GFAP no cerebelo de camundongos $LDLr^{-/-}$ e inibe a atividade da GPx no cerebelo de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e $LDLr^{-/-}$. As imagens seriais de imunofluorescência para a proteína GFAP foram obtidas com um microscópio confocal Olympus FV-1000. As imagens mostram abundante astrogliose no cerebelo de animais $LDLr^{-/-}$ tratados com MeHg. ML: camada molecular, PL: camada de Purkinje, GL: camada granular. Ampliação de 40 vezes. → fibras de Bergmann, * vaso sanguíneo. Barras de escala = 50 mm. (B) quantificação da expressão de GFAP. (C) atividade da GPx no córtex pré-frontal. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com camundongos C57Bl/6 controle. & $p < 0,05$ comparado com camundongos $LDLr^{-/-}$ controle (ANOVA de duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls).

A inibição da atividade da enzima GPx é um evento chave envolvido na neurotoxicidade do MeHg (FRANCO et al., 2009). Uma vez que este foi o primeiro estudo a mostrar que a exposição crônica ao MeHg induz hipercolesterolemia, foi, posteriormente, avaliada a relação temporal entre o tratamento com MeHg, a inibição da GPx no cerebelo, prejuízos locomotores, e hipercolesterolemia. Estes três marcadores foram avaliados em camundongos C57Bl/6 após sete, quatorze e vinte um dias após o início da exposição ao MeHg (40 mg/l, na água de beber). O primeiro evento visualizado foi uma inibição significativa da atividade da GPx, sete dias após o início dos tratamentos com MeHg ($p < 0,05$) (figura 33A). Um aumento significativo nos níveis de colesterol plasmático foi observado após quatorze dias do início dos tratamentos ($p < 0,05$). Prejuízos locomotores no teste do campo aberto foram observados apenas vinte e um dias após o início dos tratamentos ($p < 0,05$), sendo o evento mais tardio a ser visualizado. Embora estes dados não permitam uma conclusão definitiva que a hipercolesterolemia contribui para a ocorrência dos prejuízos locomotores, eles sugerem que os efeitos do MeHg sobre a homeostase do colesterol plasmático precedem as alterações comportamentais associadas com a exposição à esse metal. Ademais, a análise de correlação de Pearson foi utilizada para analisar uma possível correlação entre a atividade da GPx no cerebelo e os níveis plasmáticos de colesterol nos animais expostos ao MeHg após sete, quatorze e vinte e um dias após o início dos tratamentos. Foi observado que a diminuição da atividade da GPx no cerebelo de camundongos tratados com MeHg se correlacionou negativamente com os níveis de colesterol plasmático (coeficiente de Pearson = $-0,759$, $p < 0,05$).

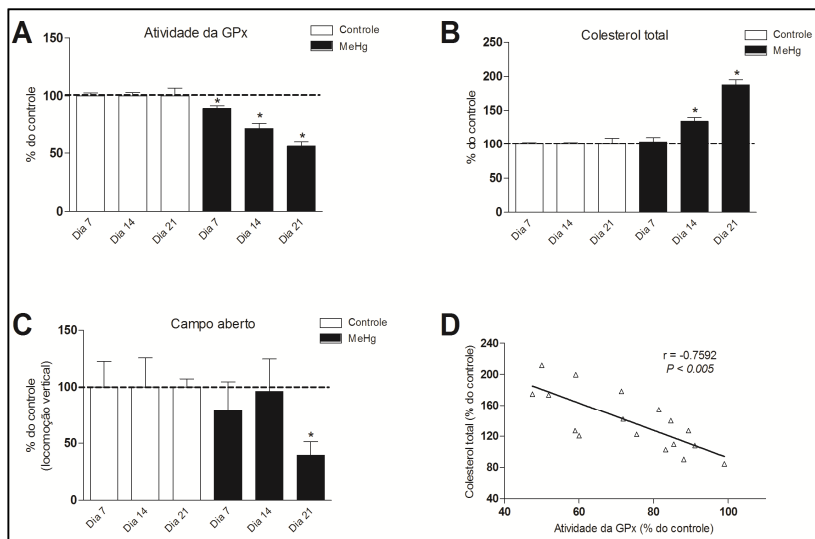


Figura 33. Camundongos C57Bl/6 foram expostos ao MeHg (40 mg/l na água de beber) e após sete, quatorze e vinte e um dias foram avaliados (A) a atividade da GPx no cerebelo, (B) os níveis de colesterol plasmático, e (C) atividade motora vertical no campo aberto. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (teste t para amostras independentes). (D) Correlação negativa entre os níveis de colesterol plasmático e a atividade da GPx no cerebelo (coeficiente de Pearson = $-0,7592$, $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O interesse na relação entre o colesterol e a doença de Alzheimer provém de uma observação inicial que identificou placas amiloides cerebrais em pacientes que morreram por doença arterial coronariana (SPARKS et al., 1990), indivíduos que apresentam níveis altos de colesterol plasmático. Desde então, diversos estudos vêm buscando elucidar a relação entre a hipercolesterolemia e a patogênese da doença de Alzheimer esporádica. Cabe ressaltar que, com base nesta observação em pacientes com doença arterial coronariana, o próprio grupo de pesquisa do patologista Larry Sparks demonstrou que coelhos alimentados por, ao menos, quatro semanas com uma dieta enriquecida com colesterol desenvolviam placas amiloides cerebrais (SPARKS et al., 1994). Essas duas observações direcionaram os estudos subsequentes, do final da década de 1990 e início da década de 2000, os quais buscaram, principalmente, entender a relação entre a hipercolesterolemia e o aumento na produção do peptídeo β -amiloide, e formação de agregados amiloides (SIMONS et al., 1998; REFOLO et al., 2000; KALVODOVA et al., 2005; CAO et al., 2006).

Todavia, estudos prospectivos, do início da década 2000, demonstraram que a relação entre a hipercolesterolemia e a doença de Alzheimer esporádica parece ser idade-dependente. Por um lado, os estudos que encontraram uma associação positiva mensuraram os níveis de colesterol plasmático em indivíduos mais novos (entre 40-45 anos de idade), e correlacionaram esses níveis com o desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer em idades mais avançadas (70-75 anos de idade) (NOTKOLA et al., 1998; KALMIJN et al., 2000; KIVIPELTO et al., 2002; PAPPOLLA et al., 2003; WHITMER et al., 2005; KIVIPELTO; SOLOMON, 2006). Por outro lado, os estudos que não encontraram associação, ou encontraram associação negativa, examinaram grupos de pessoas em idades mais avançadas e por um período de observação menor, e concluíram que não havia associação entre o declínio cognitivo e a hipercolesterolemia (MIELKE et al., 2005; REITZ et al., 2005). Desta forma, as evidências sugerem que a hipercolesterolemia é um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer décadas após (SOLOMON et al., 2007).

Neste sentido, a hipercolesterolemia familiar é uma condição que propicia uma observação única acerca da relação entre a hipercolesterolemia e o posterior desenvolvimento da doença de

Alzheimer: os pacientes afetados por esta condição são expostos a altos níveis de colesterol desde o nascimento. Nessa linha de evidência, um estudo, publicado em 2010, demonstrou que pacientes com hipercolesterolemia familiar de meia-idade apresentaram uma elevada incidência de comprometimento cognitivo leve em comparação com indivíduos sem hipercolesterolemia familiar (ZAMBON et al., 2010). Com base nos resultados deste estudo, é possível supor que a exposição precoce a elevados níveis de colesterol plasmático contribui para a disfunção cognitiva nos indivíduos com hipercolesterolemia familiar. Esta conjectura permite especular, ainda, que mecanismos similares possam estar envolvidos no declínio cognitivo de indivíduos sem hipercolesterolemia familiar (mas com hipercolesterolemia esporádica na idade adulta e/ou meia-idade).

Neste contexto, a caracterização de comprometimento cognitivo leve em modelos experimentais de hipercolesterolemia familiar torna-se imperativa, visando tanto ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas e preventivas, quanto ao entendimento de mecanismos moleculares responsáveis pelo declínio cognitivo associado com a hipercolesterolemia. Neste sentido, alguns estudos vêm utilizando os camundongos nocaute para o receptor de LDL, um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, e avaliando estes animais em testes de aprendizado e memória (MULDER et al., 2004; THIRUMANGALAKUDI et al., 2008). Estes estudos observaram déficits cognitivos em camundongos $LDLr^{-/}$ de três meses, utilizando testes de memória operacional e espacial de referência. No presente estudo, nós estendemos estas observações ao demonstrar, também, prejuízos de memória procedural em camundongos $LDLr^{-/}$ de três meses. Todavia, até então, os efeitos do envelhecimento sobre a função cognitiva de camundongos $LDLr^{-/}$ não haviam sido descritos. *Camundongos $LDLr^{-/}$ são mais susceptíveis ao declínio cognitivo associado ao envelhecimento em comparação com camundongos do tipo selvagem?*

O presente estudo foi, desta forma, desenhado na tentativa de responder a esta pergunta. Para avaliar os efeitos do envelhecimento na função cognitiva de animais C57Bl/6 do tipo selvagem e $LDLr^{-/}$, diversos testes de aprendizado e memória foram realizados em camundongos de três e quatorze meses. Em alguns testes, como na realocação de objeto, foram observados prejuízos cognitivos associados ao envelhecimento em camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem. Em outros testes, como no medo condicionado ao som, bem como na realocação de objeto, foram observados prejuízos cognitivos em

camundongos LDLr^{-/-} jovens adultos. Todavia, os camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses apresentaram prejuízos cognitivos em todos os testes realizados (testes de memória operacional, de referência espacial e procedural). Em termos “qualitativos”, é possível afirmar que estes animais não aprenderam a tarefa da realocação de objeto, do labirinto aquático e da esquiva inibitória do tipo *step down*. Cabe ressaltar, no entanto, que estes animais não apresentaram alterações no comportamento exploratório e “emocional”.

De acordo com Pepeu (2004), as características que devem definir um modelo experimental de comprometimento cognitivo leve em animais são: avanço da idade (envelhecimento), déficits de memória, mudanças neuropatológicas leves, e mudanças no sistema colinérgico. Estas alterações devem ocorrer em animais com comportamento motor e alimentar normal. Com base nessa definição, é possível considerar que os dados do presente estudo corroboraram os achados clínicos que apontam para um maior desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve em pacientes com hipercolesterolemia familiar. Digno de nota, durante o processo de submissão dos dados do presente estudo para publicação em periódico científico, Ramirez e colaboradores (2011) propuseram os camundongos apoB100/LDLr^{-/-} de “meia-idade” como um modelo experimental de comprometimento cognitivo leve. Estes dados, em conjunto com os do presente estudo, sugerem os camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade” como ferramentas experimentais para o estudo do declínio cognitivo associado com a hipercolesterolemia.

Considerando o comprometimento cognitivo leve em camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade” confirmado pelos experimentos comportamentais iniciais, o próximo objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos bioquímicos subjacentes aos prejuízos cognitivos associados com a hipercolesterolemia. Conforme apresentado na Introdução, embora evidências para um efeito direto da hipercolesterolemia no cérebro ainda estejam escassos, a estreita inter-relação entre hipercolesterolemia, dano vascular e estresse oxidativo já foi amplamente demonstrada em estudos com foco na aterosclerose (NOUROOZ-ZADEH et al., 2001; KNIGHT-LOZANO et al., 2002; BUSNELLI et al., 2009). Neste sentido, algumas linhas de evidência têm apontado para um ciclo oxidativo-inflamatório na vasculatura cerebral induzido pela hipercolesterolemia, o que poderia impactar regiões cerebrais envolvidas em processos de aprendizado e memória (THIRUMANDALAKUDI et al., 2008; EVOLA et al., 2010). Em especial, a neuroinflamação leva a um aumento na produção de EROs,

os quais são prejudiciais aos neurônios (WITTE et al., 2010). Desta maneira, no presente estudo, enzimas antioxidantes foram utilizadas como biomarcadores funcionais.

O sistema antioxidante dependente da GSH é um importante sistema que medeia a proteção contra moléculas pró-oxidante no SNC (DRINGEN; HIRRLINGER, 2003). Neste sentido, diversas evidências têm sugerido que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial podem contribuir para a neurodegeneração vista na doença de Alzheimer. De fato, dano oxidativo e depleção de antioxidantes, como a GSH, foram demonstrados no cérebro de indivíduos com doença de Alzheimer (MANDAL *et al.*, 2012; ANSARI; SCHEFF, 2010). Todavia, as alterações em marcadores oxidantes e antioxidantes em função do envelhecimento, bem como as diferenças específicas entre diferentes regiões cerebrais e sua contribuição para a neurodegeneração na doença de Alzheimer ainda não estão completamente estabelecidas (VENKATESHAPPA et al., 2012). No presente estudo, foi observado um desequilíbrio, associado ao envelhecimento, no sistema antioxidante dependente da GSH no hipocampo de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem, como demonstrado pela diminuição nos níveis de GSH, e nas atividades das enzimas GPx e GR. Ademais, este mesmo desequilíbrio no sistema da GSH também foi observado em camundongos LDLr^{-/-} jovens adultos em comparação com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem jovens adultos. Todavia, não foram observados efeitos associados ao envelhecimento nos animais LDLr^{-/-}, uma vez que não foram visualizadas diferenças entre os marcadores relacionados ao sistema da GSH entre camundongos LDLr^{-/-} jovens adultos e de “meia-idade”. Por outro lado, no córtex pré-frontal, foi observado apenas um efeito do envelhecimento nos camundongos LDLr^{-/-}, como demonstrado pelo aumento nos níveis de GSH, e nas atividades das enzimas GPx e GR em camundongos de “meia-idade”. O sistema antioxidante dependente da GSH é reconhecido por ser *up*-regulado em situações de estresse celular, incluindo estresse oxidativo (ARUMUGAM et al., 2006).

Analisados em conjunto, contudo, estes dados permitem interpretar que, em comparação com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem, camundongos LDLr^{-/-} jovens adultos são mais vulneráveis a alterações na homeostase do sistema antioxidante dependente da GSH no hipocampo; enquanto que camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade” são mais susceptíveis a alterações no córtex pré-frontal. Esta maior vulnerabilidade de camundongos LDLr^{-/-} a um desequilíbrio no sistema antioxidante da GSH, tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo,

poderia tornar estas estruturas cerebrais mais propensas a insultos oxidativos. De fato, no presente estudo, foi observado um aumento na peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade”. Neste sentido, cabe ressaltar que estudos conduzidos com mitocôndrias isoladas de vários tecidos (cérebro, fígado e rim) de camundongos LDLr^{-/-} demonstraram um baixo conteúdo de nucleotídeos piridinas no estado reduzido (NADPH) (OLIVEIRA et al., 2005; PAIM et al., 2008). Especificamente, os níveis de NADPH estariam diminuídos em camundongos LDLR^{-/-} devido à lipogênese aumentada (OLIVEIRA et al., 2005), uma vez que as células destes camundongos apresentam deficiência na captação de colesterol da circulação (ISHIBASHI et al., 1991). Os processos de lipogênese/esteroidogênese consomem grande quantidade de equivalentes redutores do NADPH, uma vez que a biossíntese de um mol de colesterol oxida 24 mols de NADPH (GAYLOR, 2002). Como muitos dos sistemas de remoção de EROs, o sistema antioxidante dependente da GSH utiliza os equivalentes redutores do NADPH como uma fonte redox, desta forma, quantidades insuficientes destes equivalentes redutores podem prejudicar a reconstituição dos sistemas enzimáticos antioxidantes (VERCESI et al., 2007).

De fato, diversos estudos vêm mostrando uma relação entre a exposição a dietas hipercolesterolêmicas e o estresse oxidativo no SNC de roedores (CRISBY et al., 2004; MONTILLA et al., 2006; de OLIVEIRA et al., 2011). Por outro lado, alguns estudos utilizando modelos experimentais da doença de Alzheimer, ou envelhecimento, demonstraram que antioxidantes, como as vitaminas C e E, são capazes de reverter os déficits de aprendizado e memória dos animais (HARRISON et al., 2009a; HARRISON et al., 2009b). Ademais, resultados de um estudo de meta-análise sugerem que dietas ricas em vitaminas E e C, bem como β-caroteno, diminuem o risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer (LI et al., 2012). Cabe ressaltar, também, que estudos epidemiológicos sugerem que um aumento na ingestão de antioxidantes reduz o risco de doença arterial coronariana (KUSHI et al., 1996; RIMM et al., 1993), sendo que a combinação de terapias hipolipemiantes e antioxidantes parecem atuar sinergicamente (ANDERSON et al., 1995; NEUNTEUFL et al., 1998). De forma geral, esta conjectura permite considerar a utilização de antioxidantes como terapia auxiliar na prevenção do comprometimento cognitivo leve em pacientes com hipercolesterolemia familiar.

Por outro lado, um estudo de Ullrich e colaboradores (2010), utilizando ratos expostos a uma dieta com 5% de colesterol por cinco

meses, demonstrou um prejuízo de memória espacial nos animais, o qual se correlacionou com uma redução significativa no número de neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert, e com uma diminuição nos níveis de acetilcolina no córtex cerebral. Como mencionado na Introdução, o sistema colinérgico é um sistema de neurotransmissão crítico para os processos de aprendizado e memória, e a perda de função colinérgica contribui para prejuízos de aprendizado e déficits de memória associados com demências relacionadas à idade e à doença de Alzheimer (PERRY et al., 1999). Neste sentido, para avaliar os efeitos da hipercolesterolemia sobre o sistema colinérgico, no presente estudo, foi avaliada a atividade da enzima AChE. A AChE é expressa no córtex (GEULA et al., 1995) e no hipocampo (AUBERT et al., 1994), em que se correlaciona com aprendizado e memória. O papel fundamental desta enzima nas sinapses colinérgicas é finalizar a neurotransmissão por, rapidamente, hidrolisar a acetilcolina (MASSOULIE, 2002). Uma diminuição na atividade da AChE pode diminuir a taxa de catálise da acetilcolina, o que pode ser útil para manter as funções de aprendizado e memória. De fato, inibidores desta enzima têm sido utilizados para tratar a doença de Alzheimer (GIACOBINI, 2003). De modo interessante, no presente estudo, foi demonstrado um aumento significativo na atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal de camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses, embora, em menor grau, também foi observado um aumento na atividade da AChE no córtex pré-frontal de camundongos LDLr^{-/-} de três meses e de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de quatorze meses. Cabe ressaltar que estudos prévios já demonstraram que inibidores da enzima AChE melhoram a cognição de camundongos nos testes da realocação de objeto (MURAI et al., 2007; ASSINI et al., 2009), do labirinto aquático (VAM DAM et al., 2005; 2008) e da esquiiva inibitória do tipo *step down* (YOSHIDA et al., 1992; SMITH et al., 1997). Com base nessas observações, uma associação entre o aumento (progressivo) na atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal e os déficits cognitivos observados nos camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de quatorze meses (teste da realocação de objeto), LDLr^{-/-} de três meses (teste da realocação de objeto), e LDLr^{-/-} de quatorzes meses (testes da realocação de objeto, labirinto aquático e esquiiva inibitória) poderia ser considerada.

Considerando que o tratamento com inibidores da enzima AChE melhora a cognição de pacientes com doença de Alzheimer (TARIOT et al., 2000), assim como melhora o aprendizado e a memória de camundongos em diversos paradigmas comportamentais (SMITH et al., 1997; VAM DAM et al., 2005; MURAI et al., 2007), os efeitos da

administração aguda de tacrina, um inibidor da enzima AChE, foram avaliados em camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step down*. A administração aguda de tacrina, em doses entre 0,3 e 3 mg/kg (i.p.), já foi demonstrada capaz de melhorar os processos cognitivos em camundongos (KIEFER-DAY; el-FAKAHANY, 1992). No presente estudo, contudo, a administração de tacrina (1,5 mg/kg; i.p.), trinta minutos antes do treino, não mitigou os prejuízos cognitivos dos camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step down*. Uma possível interpretação deste resultado “negativo” seria a presença de uma disfunção pronunciada no sistema colinérgico nestes animais. Neste sentido, diversos estudos têm demonstrado que os efeitos de inibidores da enzima AChE sobre a cognição são potencializados pela repetição do tratamento (RIEKKINEN et al., 1991; CUTULI et al., 2009). Desta forma, em condições extremas, em que o aumento na atividade da AChE é mais intenso e persistente, a administração aguda de inibidores da enzima pode não ser suficiente para levar a atividade desta de volta a níveis considerados normais (basais). De fato, no presente estudo, foi observada uma redução de 30% na atividade da enzima após a administração de tacrina em camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses, enquanto que a atividade desta enzima no córtex pré-frontal destes animais estava aumentada em cerca de 240% em comparação com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de três meses, e, em torno de 100%, em comparação com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem de quatorze meses. Desta forma, é possível postular que um tratamento crônico com a tacrina poderia atenuar os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade”.

Considerando os mecanismos pelos quais a hipercolesterolemia estaria desencadeando um aumento na atividade da AChE no córtex pré-frontal, pode se destacar um estudo de Khadrawy e colaboradores (2011), o qual demonstrou um aumento na atividade da enzima AChE durante eventos oxidativos no SNC. De fato, um estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou um aumento na atividade da AChE no hipocampo de camundongos após a infusão i.c.v. do peptídeo β -amilóide, sendo que este fenômeno foi associado com estresse oxidativo (SANTOS et al., 2012). Contudo, no presente estudo, não foram observadas alterações na atividade da AChE no hipocampo de camundongos LDLr^{-/-} (independente da idade), mesmo na presença de um desequilíbrio no sistema antioxidante dependente da GSH. Desta maneira, com o intuito de melhor caracterizar o aumento na atividade da AChE induzido pela hipercolesterolemia, bem como sua relação com os

prejuízos cognitivos observados, após, em outro protocolo experimental, camundongos *Swiss* foram expostos a uma dieta hipercolesterolêmica (1,25% de colesterol) por dois meses. O objetivo desta abordagem experimental foi modelar um quadro de hipercolesterolemia branda nos animais, de forma a permitir a observação de alterações bioquímicas primárias que relacionem a hipercolesterolemia com prejuízos cognitivos.

Neste sentido, foi observado que camundongos *Swiss* expostos à dieta hipercolesterolêmica apresentaram prejuízo cognitivo no teste da realocação de objeto. Este resultado demonstrou que, mesmo uma elevação leve nos níveis de colesterol plasmático (em torno de 50%), e por um período relativamente curto (dois meses), é capaz de induzir déficits cognitivos em camundongos. De modo interessante, foi observado um aumento significativo na atividade da AChE no córtex pré-frontal e no hipocampo dos camundongos expostos à dieta hipercolesterolêmica. Cabe ressaltar que um estudo de Assini e colaboradores (2009) demonstrou que o antagonista dos receptores colinérgicos muscarínicos, escopolamina, prejudicou a memória de camundongos *Swiss* no teste da realocação de objeto de uma maneira dose-dependente, e que, de forma recíproca, o inibidor da atividade da AChE, tacrina, melhorou a memória neste teste quando administrada antes do treino. Com base nestas observações, pode-se supor que o aumento na atividade da AChE no córtex pré-frontal e no hipocampo induzido pela hipercolesterolemia poderia contribuir para os prejuízos cognitivos observados nos animais. Ademais, o aumento na atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo induzido pela exposição à dieta hipercolesterolêmica parece ser um evento inicial associado com os prejuízos cognitivos. De fato, não foram observadas alterações na densidade da enzima BACE-1 no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais expostos à dieta hipercolesterolêmica. A BACE-1, como referido antes, é uma enzima essencial na produção do peptídeo β -amiloide (COLE; VASSAR, 2007). Estudos prévios utilizando coelhos (GHRIBI et al., 2006) e camundongos (THIRUMANGALAKUDI et al., 2008) demonstraram um aumento na densidade cortical da BACE-1 em condições de hipercolesterolemia. Além disso, não foram observadas alterações na densidade cortical e hipocampal da AQP-4, um marcador de integridade da BHE. A AQP-4 é o principal canal de água expresso no SNC e é primariamente expresso em células da glia (NAGELHUS et al., 2004). A localização da AQP-4 nos prolongamentos de astrócitos que envolvem células endoteliais é consistente com a função de astrócitos no desenvolvimento, na função e na integridade da interface

entre o parênquima cerebral e o espaço perivascular, e entre o cérebro e o fluido cerebroespinal (NICCHIA et al., 2004). Neste sentido, Tomás-Camardiel e colaboradores (2005) demonstraram que os primeiros sinais de disfunção da BHE coincidem com um aumento significativo na síntese de RNAm para a AQP-4 em células perivascularres.

Ademais, como supramencionado, diversos estudos têm sugerido que um ciclo oxidativo/inflamatório na vasculatura cerebral induzido pela hipercolesterolemia poderia impactar áreas cerebrais relevantes para a cognição (THIRUMANGALAKUDI et al., 2008; EVOLA et al., 2010). Contudo, no protocolo experimental utilizando camundongos *Swiss* expostos a uma dieta hipercolesterolêmica, não foram observados sinais de desequilíbrio oxidativo e/ou dano oxidativo no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos hipercolesterolêmicos. Em conjunto, estes dados permitem considerar que o aumento na atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal e hipocampo é um evento inicial associado com os prejuízos cognitivos induzidos pela hipercolesterolemia em camundongos. Estes dados ganham uma relevância particular tendo em vista um estudo de Borroni e colaboradores (2003), o qual sugeriu que os níveis de colesterol plasmático modulam a eficácia em longo prazo de inibidores da enzima AChE utilizados na doença de Alzheimer. Neste estudo, mais de 120 pacientes com doença de Alzheimer foram avaliados antes e após um ano de tratamento com o donepezil (5-10 mg/dia). Os pacientes passaram por uma avaliação cognitiva (*Mini-Mental State Examination*, MMSE) antes e após um ano de tratamentos, e as diferenças de desempenho foram medidas. Especificamente, os autores demonstraram que elevados níveis de colesterol plasmático (>220 mg/dL) afetam de forma negativa a eficácia em longo prazo do tratamento com inibidores da AChE (como o donepezil) no declínio progressivo da função cognitiva de pacientes com doença de Alzheimer. Neste sentido, pode-se considerar uma relação causal entre tais eventos, nomeados o aumento na atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo pela hipercolesterolemia em camundongos, e a modulação da eficácia de inibidores da AChE pelos níveis de colesterol em pacientes com doença de Alzheimer. Desta forma, seria interessante avaliar os efeitos de uma associação entre um inibidor da AChE (como o donepezil) e um fármaco hipolipemiante (como uma estatina) em pacientes com doença de Alzheimer. Ademais, esta conjectura permite considerar que, embora a hipercolesterolemia seja um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer apenas décadas após (SOLOMON et al., 2007), é importante a manutenção do colesterol em níveis “normais” em

indivíduos com comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer.

Contudo, não está claro, ainda, como o colesterol plasmático poderia afetar as funções cerebrais, uma vez que colesterol não transpassa a BHE (DIETSCHY; TURLEY, 2001). Por outro lado, oxisteróis, derivados oxigenados do colesterol, são capazes de transpassar membranas lipofílicas (BJÖRKHEM et al., 2002). Especificamente, o 27-hidroxicolesterol é capaz de transpassar a BHE (HEVERIN et al., 2005), e, devido à direta correlação entre os níveis de colesterol e de 27-hidroxicolesterol na circulação sanguínea (BABIKER et al., 2005), é provável que o aumento nos níveis de colesterol plasmático resulte em um aumento na captação cerebral de 27-hidroxicolesterol (SHAFATI et al., 2011). É de se notar que foram observados níveis elevados de 27-hidroxicolesterol no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (BJÖRKHEM et al., 2006). Neste sentido, Prasanthi e colaboradores (2009) demonstraram que a exposição de células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y ao 27-hidroxicolesterol aumentou de maneira significativa os níveis de β -amiloide-42, os quais foram associados com um aumento na densidade da enzima BACE-1. Alterações nos níveis de colesterol na membrana plasmática ocasionam alterações na fluidez e permeabilidade desta, influenciando a atividade de proteínas de membrana (LEDESMA et al., 2006). Em especial, nas células, o colesterol é associado com domínios da membrana (*lipid rafts*) responsáveis por modular a atividade de proteínas da membrana (MASON et al., 2003). Desta forma, tem sido demonstrado que alterações no conteúdo do colesterol na membrana lipídica podem modular a atividade de enzimas (ONER et al., 1991; HOWLAND et al., 1998), como, por exemplo, a BACE-1 (KALVODOVA et al., 2005).

Uma possibilidade, então, seria uma modulação na atividade da AChE ocasionada por mudanças no conteúdo de colesterol na membrana plasmática. Neste sentido, a AChE está presente em diferentes formas moleculares no organismo, a globular e a assimétrica, dependendo da sua conformação espacial (ALDUNATE et al., 2004). A forma globular apresenta-se como uma montagem homomérica de subunidades catalíticas que aparecem como monômeros, dímeros ou tetrâmeros originando, respectivamente, as seguintes formas globulares (G): G1, G2 e G4. As formas globulares podem ser solúveis ou ancoradas à membrana por sequências de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou de um glicofosfolípídeo acoplado (ALDUNATE et al., 2004). As formas globulares são encontradas com predomínio no SNC,

enquanto as formas assimétricas são encontradas, sobretudo, no músculo e no sistema nervoso periférico (RAKONCZAY et al., 2005). Cabe ressaltar que a maior parte da AChE encontrada no SNC é do tipo G4, ligada à membrana (MASSOULIÉ et al., 1993; XIE et al., 2007). Especificamente, a AChE está ancorada na membrana celular por meio de ligação à âncora de membrana rica em prolina (PRiMA), como uma forma globular tetramérica (CHEN et al., 2010). De modo interessante, existem evidências de que pelo menos parte da AChE ligada ao PRiMA está integrada aos *lipid rafts* na membrana (XIE et al., 2010). Com estas evidências como base, no presente estudo, células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y foram expostas ao colesterol LDL em uma tentativa de manipular o conteúdo celular de colesterol. Foi observado que o colesterol LDL aumentou de maneira significativa, e dose-dependente, a atividade da AChE nas células SH-SY5Y. Esse fenômeno parece não estar relacionado ao estresse oxidativo, uma vez que não foram observadas alterações significativas no sistema antioxidante dependente da GSH. O mecanismo bioquímico pelo qual o colesterol LDL aumentou a atividade da AChE ainda precisa ser elucidado, contudo, pode-se especular na possibilidade de que alterações no conteúdo de colesterol na membrana plasmática possam modular a atividade catalítica da AChE.

Em conjunto, as evidências levantadas ao longo desta Tese apontam para a hipercolesterolemia como um fator de risco modificável para a prevenção de comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer. De fato, estas evidências levantam a questão de o quanto agentes hipolipemiantes, como as estatinas, poderiam ser úteis como agentes preventivos na doença de Alzheimer. Em 2011, dois artigos foram publicados no periódico *Archives of Neurology* revisando as evidências de estudos epidemiológicos, pré-clínicos, e clínicos relacionando os níveis de colesterol, o uso de estatinas e a doença de Alzheimer (SHEPARDSON et al., 2011a; 2011b). Em especial, os resultados dos estudos pré-clínicos são encorajadores, e têm demonstrado que estatinas são capazes de diminuir os níveis do peptídeo β -amiloide e reverter prejuízos cognitivos em modelos experimentais da doença de Alzheimer (CHAUHAN et al., 2004; LI et al., 2006). Todavia, os resultados de estudos observacionais e de estudos clínicos controlados randomizados têm sido contraditórios, com alguns reportando nenhum benefício das estatinas na progressão de sintomas em indivíduos com doença de Alzheimer leve (HAAG et al., 2009; FELDMAN et al., 2010; SANO et al., 2011), enquanto outros têm reportado melhoras substanciais (SPARKS et al., 2005; CRAMER et al.,

2008; HAAG et al., 2009). Por exemplo, um estudo observacional demonstrou que pessoas com mais de cinquenta anos que estavam em tratamento com estatinas apresentaram um menor risco de desenvolvimento de demência (JICK et al., 2000). Por outro lado, um ensaio clínico controlado randomizado demonstrou que o declínio cognitivo de pacientes com doença de Alzheimer leve a moderada não foi alterado com o tratamento com atorvastatina por setenta e duas semanas (FELDMAN et al., 2010). Em suma, ainda não foi demonstrado que as estatinas podem influenciar no curso da doença de Alzheimer em estudos controlados (SHEPARDSON et al., 2011b). Todavia, uma possível explicação para estes resultados negativos é que estes estudos clínicos são conduzidos em indivíduos com mais de sessenta e cinco anos, e, como mencionado antes, a hipercolesterolemia parece ser um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer décadas após (SOLOMON et al., 2007).

Por outro lado, mudanças no estilo de vida, como exercício físico ou hábitos alimentares, são associadas com um aumento no bem-estar e na qualidade de vida (ELINDER et al., 2010). A dieta e a atividade física afetam diversos mecanismos biológicos comuns a doenças, como pressão arterial, níveis de lipídeos, glicose, inflamação e obesidade (DING; BU, 2010). Não surpreende, então, que o sedentarismo e a má alimentação sejam em comum associados com uma vasta gama de doenças crônicas, incluindo a hipertensão, diabetes do tipo II, doença arterial coronariana e doença cerebrovascular (KROMHOUT, 2001; WILMOT et al., 2012). Neste sentido, por exemplo, o exercício físico regular pode prevenir, ou, mesmo, reverter a progressão da aterosclerose e o desenvolvimento de doença arterial coronariana (HAMBRECHT et al., 2000; SOFI et al., 2008). Cabe ressaltar, ainda, que o exercício físico regular tem sido relacionado com a melhora da função cognitiva em roedores (CHEN et al., 2007; KRAMER et al., 2009; AGUIAR et al., 2011). Sobretudo, tem se demonstrado os efeitos do exercício físico na plasticidade sináptica (AGUIAR et al., 2011; VIVAR et al., 2013), incluindo neurogênese e aumento da sobrevivência neuronal no hipocampo (van PRAAG et al., 2005), crescimento de capilares e, aumento do fluxo vascular no cerebelo e córtex motor (LAUFS et al., 2004), aumento da expressão de neurotrofinas em diversas áreas cerebrais, e aumento do aprendizado e memória dependente do hipocampo (van PRAAG et al., 1999; MARLATT et al., 2012).

No presente estudo, foi demonstrado que tanto o exercício físico voluntário quanto a administração de um fármaco hipolipemiante (probucol) durante trinta dias foram capazes de diminuir de maneira

similar os níveis de colesterol plasmático de camundongos LDLr^{-/-}. Não obstante os efeitos hipolipemiantes de ambas as estratégias, foi demonstrado que apenas o exercício físico foi capaz de mitigar os prejuízos cognitivos dos animais LDLr^{-/-} no teste de realocação de objeto. Desta forma, pode-se supor que os benefícios do exercício físico contra os prejuízos cognitivos dos animais LDLr^{-/-} estão relacionados com suas ações já estabelecidas sobre a cognição, e não consequência de suas propriedades hipolipemiantes. Cabe ressaltar que o receptor de LDL parece apresentar um papel importante na manutenção da proliferação celular e formação sináptica no hipocampo (MULDER et al., 2007). Uma vez que o colesterol é necessário para a proliferação celular (SINGH et al., 2013), a diminuição da captação do colesterol em camundongos nocaute para o receptor de LDL pode ocasionar uma diminuição na proliferação celular. Neste sentido, Mulder e colaboradores (2007) relacionaram os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr^{-/-} a uma diminuição da densidade sináptica no hipocampo.

Desta forma, na sequência, foi avaliado se a exposição ao ambiente enriquecido durante as primeiras semanas após o período pós-natal, o qual é caracterizado por um significativo desenvolvimento do SNC (WATSON et al., 2006), poderia prevenir/atenuar os prejuízos cognitivos observados em camundongos LDLr^{-/-} jovens adultos. O enriquecimento ambiental desde o nascimento afeta as habilidades de aprendizado de camundongos na vida adulta, reforçando a importância de estímulos positivos no período crítico do desenvolvimento e maturação cerebral (SIMONETTI et al., 2009). Em especial, a exposição pós-natal ao enriquecimento ambiental pode promover aumento do peso cerebral, na espessura cortical (KRECH et al., 1960; ROSENZWEIG et al., 1962), na ramificação dendrítica, e da densidade sináptica (FAHERTY et al., 2003; LI et al., 2006). Funcionalmente, o enriquecimento ambiental resulta em melhora nas capacidades cognitivas (KAZLAUCKAS et al., 2011), acompanhado de um aumento nos marcadores de plasticidade e transmissão sináptica (KEMPERMANN et al., 1997; LIU et al., 2012). Neste sentido, foi demonstrado, no presente estudo, que a exposição ao enriquecimento ambiental do nascimento até a adolescência induziu alterações comportamentais duradouras nos camundongos LDLr^{-/-}, como demonstrado pelos efeitos do “tipo-ansiolítico” apresentados no teste do campo aberto. Todavia, foi demonstrado que a exposição ao enriquecimento ambiental não mitigou os prejuízos cognitivos dos camundongos LDLr^{-/-} adultos no teste da realocação de objeto. Este

resultado está em oposição a prévios estudos que demonstraram que experiências nos primeiros períodos da vida pós-natal apresentam um efeito duradouro, e impactam o desempenho de roedores em testes de aprendizado e memória na vida adulta (ISO et al., 2007; SIMONETTI et al., 2009). Levando-se em consideração que estudos anteriores demonstraram uma plasticidade neuronal reduzida em camundongos LDLr^{-/-} devido a uma diminuição na captação de colesterol por neurônios (MULDER et al., 2007), pode-se supor que sejam necessárias manipulações contínuas e regulares na plasticidade sináptica, como as induzidas pelo exercício físico, para conter os prejuízos cognitivos observados em camundongos LDLr^{-/-} jovens adultos.

Por fim, foi avaliado se a hipercolesterolemia poderia modular/potencializar o efeito de neurotóxicos, como o MeHg. Neste sentido, camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} foram expostos cronicamente ao MeHg. O MeHg é um composto orgânico de mercúrio conhecido por seus efeitos neurotóxicos em animais e humanos (CLARKSON et al., 2003). A exposição ao MeHg ocorre, sobretudo, por meio do consumo de peixes provenientes de águas contaminadas com este elemento, em que o mercúrio inorgânico é metilado por bactérias presentes no ecossistema aquático e entra na cadeia alimentar sob a forma de MeHg (HINTELMANN, 2010), atingindo níveis elevados em peixes predadores (CLARKSON et al., 2003). De modo surpreendente, foi demonstrado no presente estudo que a exposição crônica ao MeHg aumentou de forma significativa os níveis de colesterol plasmático dos camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem. Estes dados foram replicados, após, em camundongos *Swiss* e em ratos *Wistar* (dados não mostrados nesta Tese; MOREIRA et al., 2012). Neste sentido, algumas evidências têm demonstrado que a exposição crônica ao MeHg também apresenta efeitos cardiotoxicos (CHOI et al., 2009). Entre estas, cita-se infarto do miocárdio (RISSANEN et al., 2000), aumento da pressão arterial, alterações na frequência cardíaca e aterosclerose (SALONEN et al., 2000). Todavia, os mecanismos mediando a disfunção do sistema cardiovascular mediada pelo MeHg não estão completamente elucidados. Algumas evidências apontam para alterações na função autonômica cardiovascular, secundária à neurotoxicidade do MeHg no tronco cerebral (GRANDJEAN et al., 2004; MURATA et al., 2004). Ainda foram demonstrados eventos pró-oxidativos levando à oxidação da LDL (JIN et al., 2012), diminuição na produção de óxido nítrico endotelial (de MARCO et al., 2010) e do fator de relaxamento derivado do endotélio (OHNO et al., 1995). Desta forma, os dados do presente estudo estendem estas evidências ao relatar

alterações na homeostase lipídica induzidas pela exposição crônica ao MeHg.

Ademais, neste estudo, foi demonstrado que os efeitos do MeHg sobre a homeostase do colesterol plasmático precedem as alterações comportamentais associadas com a exposição a esse metal. Estas observações, somadas ao fato de a hipercolesterolemia aumentar a produção de EROs (MULZEL et al., 2010) e induzir dano oxidativo no SNC (AYTAN et al., 2008), levantam a questão de o quanto a própria hipercolesterolemia induzida pelo MeHg poderia contribuir para a neurotoxicidade induzida por este metal. Esta questão poderia ser “facilmente” respondida por meio da avaliação dos efeitos protetores de fármacos hipolipemiantes contra a neurotoxicidade induzida pelo MeHg. De fato, poder-se-ia supor que a hipercolesterolemia induzida pelo MeHg contribui para a neurotoxicidade induzida por este metal se fármacos hipolipemiantes apresentassem efeitos neuroprotetores contra os efeitos do MeHg. Contudo, esta questão apresenta alguns vieses experimentais, uma vez que fármacos hipolipemiantes, como as estatinas e o probucol, apresentam outras propriedades farmacológicas que não aquelas relacionadas apenas aos efeitos redutores dos níveis de colesterol. Por exemplo, as estatinas apresentam várias propriedades pleiotrópicas (GREENWOOD et al., 2006), as quais já foram mostradas benéficas em doenças neurodegenerativas (MIIDA et al., 2007). O probucol, por sua vez, apresenta uma potente propriedade antioxidante, a qual poderia prevenir a neurotoxicidade do MeHg, mesmo na ausência de efeitos hipolipemiantes. De fato, Farina e colaboradores (2009) demonstraram efeitos protetores do probucol contra a neurotoxicidade induzida pelo MeHg, os quais foram associados aos seus efeitos antioxidantes e não aos seus efeitos hipolipemiantes. Desta forma, dada a complexidade inerente à discriminação entre os efeitos hipolipemiantes *versus* efeitos pleiotrópicos de estatinas e do probucol, é de difícil confirmação a hipótese de que a hipercolesterolemia induzida pelo MeHg possa contribuir com a neurotoxicidade induzida por este metal. De qualquer forma, no presente estudo, foi demonstrado que o MeHg induziu uma ativação astrocitária mais acentuada nos camundongos LDLr^{-/-} do que nos camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem. Ademais, foi observada uma correlação negativa entre a atividade da GPx no cerebelo e os níveis de colesterol plasmático. Tendo em vista que (i) a inibição da GPx é um evento-chave na neurotoxicidade induzida pelo MeHg (FRANCO et al., 2009), e (ii) estudos prévios apontam para uma diminuição na atividade da GPx em diversos tecidos de camundongos hipercolesterolêmicos (SILVA et al.,

1995; de OLIVEIRA et al., 2011), pode-se supor uma relação aditiva entre estes dois fenômenos.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

- Camundongos LDLr^{-/-} de quatorze meses apresentaram prejuízos de memória operacional, de referência espacial e de procedimento. Também foi observado um aumento na atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal, bem como a um desequilíbrio no sistema antioxidante dependente da GSH no córtex pré-frontal e hipocampo.
- O fármaco hipolipemiante probucol e o exercício físico voluntário diminuíram significativamente os níveis de colesterol plasmático de camundongos LDLr^{-/-} adultos. Todavia, apenas o exercício físico voluntário foi capaz de atenuar os prejuízos cognitivos dos animais LDLr^{-/-} no teste da realocação de objeto.
- O enriquecimento ambiental do nascimento à adolescência não atenuaram os prejuízos cognitivos de camundongos LDLr^{-/-} adultos no teste da realocação de objeto.
- Camundongos *Swiss* expostos à dieta hipercolesterolêmica apresentaram prejuízo cognitivo no teste da realocação de objeto. Também foi observado um aumento na atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal e hipocampo.
- Células de neuroblastoma humano da linhagem SH-5Y6Y expostas ao colesterol LDL apresentaram um aumento significativo na atividade da enzima AChE.
- A exposição crônica ao MeHg aumentou de maneira significativa os níveis de colesterol plasmático de camundongos C57Bl/6.
- O MeHg aumentou a expressão cerebelar de GFAP de modo mais acentuado em camundongos LDLr^{-/-} do que em camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem.
- Foi observado uma correlação negativa entre a atividade da GPx no cerebelo e os níveis de colesterol plasmático em camundongos C57Bl/6 expostos ao MeHg.

Em conclusão, os resultados do presente estudo permitem considerar a presença de comprometimento cognitivo leve em camundongos LDLr^{-/-} de “meia idade”, tal como observado em pacientes com hipercolesterolemia familiar de meia-idade. Ademais, os resultados do presente estudo encorajam estudos adicionais para investigar o valor terapêutico do exercício físico regular no controle do comprometimento cognitivo leve em pacientes com hipercolesterolemia familiar, bem como a associação de fármacos hipolipemiantes com inibidores da enzima AChE no tratamento da doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

A multicenter comparison of lovastatin and probucol for treatment of severe primary hypercholesterolemia. The Lovastatin Study Group IV. **Am J Cardiol**, v. 18, p. 22B-30B, 1990.

Blood pressure, cholesterol, and stroke in eastern Asia. Eastern Stroke and Coronary Heart Disease Collaborative Research Group. **Lancet**, v. 352, n. 9143, p. 1801-7, Dec 5 1998.

Cholesterol, diastolic blood pressure, and stroke: 13,000 strokes in 450,000 people in 45 prospective cohorts. Prospective studies collaboration. **Lancet**, v. 346, n. 8991-8992, p. 1647-53, Dec 23-30 1995.

Geographical variation in the major risk factors of coronary heart disease in men and women aged 35-64 years. The WHO MONICA Project. **World Health Stat Q.**, v. 41, p. 115-40, 1988.

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

MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 360, n. 9326, p. 7-22, Jul 6 2002.

Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. **N Engl J Med**, v. 339, p. 1249-57, 1998.

ABBOTT, N. J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 1, p. 41-53, Jan 2006.

ABIFADEL, M. et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. **Nat Genet**, v. 34, n. 2, p. 154-6, Jun 2003.

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984.
- AGUIAR, A. S., JR. et al. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. **Neuroscience**, v. 171, n. 4, p. 1216-27, Dec 29 2010.
- AGUIAR, A. S., JR. 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. **Mech Ageing Dev**, v. 132, n. 11-12, p. 560-7, Nov-Dec 2011.
- ALBERTS, A. W. et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 7, p. 3957-61, Jul 1980.
- ALDUNATE, R. et al. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 47, n. 1-3, p. 96-104, Dec 2004.
- AMARENCO, P. et al. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. **N Engl J Med**, v. 355, n. 6, p. 549-59, Aug 10 2006.
- ANDERSON, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chem Biol Interact**, v. 111-112, p. 1-14, Apr 24 1998.
- ANDERSON, T. J. et al. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. **N Engl J Med**, v. 332, n. 8, p. 488-93, Feb 23 1995.
- ANDERSSON, M. et al. Rates of cholesterol, ubiquinone, dolichol and dolichyl-P biosynthesis in rat brain slices. **FEBS Lett**, v. 269, n. 1, p. 15-8, Aug 20 1990.
- ANITSCHKOW, N.; CHALATOW, S. Ueber experimentelle Cholesterinsteatose and ihre Bedeutung fuer die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. **Zentrbl Allg Pathol Pathol Anat**, v.24, p.1-9, 1913.

ANSARI, M. A.; SCHEFF, S. W. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 69, n. 2, p. 155-67, 2010.

ARUMUGAM, T. V. et al. Hormesis/preconditioning mechanisms, the nervous system and aging. **Ageing Res Rev**, v. 5, n. 2, p. 165-78, May 2006.

ASCHNER, M. Methylmercury in astrocytes--what possible significance? **Neurotoxicology**, v. 17, n. 1, p. 93-106, Spring 1996.

ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behav Brain Res**, v. 204, n. 1, p. 206-11, Dec 1 2009.

ATCHISON, W. D. Is chemical neurotransmission altered specifically during methylmercury-induced cerebellar dysfunction? **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 11, p. 549-57, Nov 2005.

ATCHISON, W. D.; HARE, M. F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. **FASEB J**, v. 8, n. 9, p. 622-9, Jun 1994.

AUBERT, I. et al. Multiple cholinergic markers are unexpectedly not altered in the rat dentate gyrus following entorhinal cortex lesions. **J Neurosci**, v. 14, n. 5 Pt 1, p. 2476-84, May 1994.

AULD, D. S. et al. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. **Prog Neurobiol**, v. 68, n. 3, p. 209-45, Oct 2002.

AYTAN, N. et al. Oxidative stress related changes in the brain of hypercholesterolemic rabbits. **Biofactors**, v. 33, n. 3, p. 225-36, 2008.

BABIKER, A. et al. Patients with atherosclerosis may have increased circulating levels of 27-hydroxycholesterol and cholestenic acid. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 65, n. 5, p. 365-75, 2005.

BADDELEY, A. et al. Dementia and working memory. **Q J Exp Psychol A**, v. 38, n. 4, p. 603-18, Nov 1986.

BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiol Dis**, v. 16, n. 1, p. 1-13, Jun 2004.

BEACH, T. G. et al. Circle of Willis atherosclerosis: association with Alzheimer's disease, neuritic plaques and neurofibrillary tangles. **Acta Neuropathol**, v. 113, n. 1, p. 13-21, Jan 2007.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, n. 2, p. 261-77, Jan 18 2007.

BJORKHEM, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? **J Clin Invest**, v. 110, n. 6, p. 725-30, Sep 2002.

BJORKHEM, I. et al. Oxysterols and Alzheimer's disease. **Acta Neurol Scand Suppl**, v. 185, p. 43-9, 2006.

BJORKHEM, I. et al. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. **J Lipid Res**, v. 39, n. 8, p. 1594-600, Aug 1998.

BJORKHEM, I.; MEANEY, S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 5, p. 806-15, May 2004.

BORRONI, B. et al. Serum cholesterol levels modulate long-term efficacy of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. **Neurosci Lett**, v. 343, n. 3, p. 213-5, Jun 12 2003.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathol**, v. 82, n. 4, p. 239-59, 1991.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder. **Neurobiol Aging**, v. 15, n. 3, p. 355-6; discussion 379-80, May-Jun 1994.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. **Neurobiol Aging**, v. 18, n. 4, p. 351-7, Jul-Aug 1997.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34-47, Apr 4 1986.

BRUSCOLI, M.; LOVESTONE, S. Is MCI really just early dementia? A systematic review of conversion studies. **Int Psychogeriatr**, v. 16, n. 2, p. 129-40, Jun 2004.

BUSNELLI, M. et al. Pathogenetic role of hypercholesterolemia in a novel preclinical model of vascular injury in pigs. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 2, p. 384-90, Dec 2009.

CAO, D. et al. Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice. **Neurobiol Aging**, v. 27, n. 11, p. 1632-43, Nov 2006.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-90, 1985.

CASSERLY, I.; TOPOL, E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. **Lancet**, v. 363, n. 9415, p. 1139-46, Apr 3 2004.

CHARLESTON, J. S. et al. Changes in the number of astrocytes and microglia in the thalamus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical methylmercury exposure. **Neurotoxicology**, v. 17, n. 1, p. 127-38, Spring 1996.

CHAUHAN, N. B.; SIEGEL, G. J.; FEINSTEIN, D. L. Effects of lovastatin and pravastatin on amyloid processing and inflammatory response in TgCRND8 brain. **Neurochem Res**, v. 29, n. 10, p. 1897-911, Oct 2004.

CHEN, T. G. et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptotic insults to mouse cerebral endothelial cells via a Bax-mitochondria-caspase protease pathway. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 219, n. 1, p. 42-53, Feb 15 2007.

CHEN, V. P. et al. The PRiMA-linked cholinesterase tetramers are assembled from homodimers: hybrid molecules composed of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase dimers are up-regulated during development of chicken brain. **J Biol Chem**, v. 285, n. 35, p. 27265-78, Aug 27 2010.

CHOI, A. L. et al. Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in Faroese whaling men. **Environ Health Perspect**, v. 117, n. 3, p. 367-72, Mar 2009.

CLARKSON, T. W. Mercury. **Annu Rev Public Health**, v. 4, p. 375-80, 1983.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G. J. The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. **N Engl J Med**, v. 349, n. 18, p. 1731-7, Oct 30 2003.

COLE, S. L.; VASSAR, R. The Basic Biology of BACE1: A Key Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. **Curr Genomics**, v. 8, n. 8, p. 509-30, Dec 2007.

CRAMER, C. et al. Use of statins and incidence of dementia and cognitive impairment without dementia in a cohort study. **Neurology**, v. 71, n. 5, p. 344-50, Jul 29 2008.

CRISBY, M. et al. Effects of high cholesterol diet on gliosis in apolipoprotein E knockout mice. Implications for Alzheimer's disease and stroke. **Neurosci Lett**, v. 369, n. 2, p. 87-92, Oct 14 2004.

CROXSON, P. L.; KYRIAZIS, D. A.; BAXTER, M. G. Cholinergic modulation of a specific memory function of prefrontal cortex. **Nat Neurosci**, v. 14, n. 12, p. 1510-2, Dec 2011.

CUTULI, D. et al. Cognitive performances of cholinergically depleted rats following chronic donepezil administration. **J Alzheimers Dis**, v. 17, n. 1, p. 161-76, 2009.

DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. **Am J Med Sci**, v. 323, n. 1, p. 3-10, Jan 2002.

DAVIES, P.; MALONEY, A. J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 2, n. 8000, p. 1403, Dec 25 1976.

DE LA TORRE, J. C. Critical threshold cerebral hypoperfusion causes Alzheimer's disease? **Acta Neuropathol**, v. 98, n. 1, p. 1-8, Jul 1999.

DE LA TORRE, J. C.; MUSSIVAND, T. Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease? **Neurol Res**, v. 15, n. 3, p. 146-53, Jun 1993.

DE MARCO, K. C. et al. Environmental exposure to methylmercury is associated with a decrease in nitric oxide production. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 106, n. 5, p. 411-5, May 2010.

DE OLIVEIRA, J. et al. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience**, v. 197, p. 99-106, Dec 1 2011.

DEGOMA, E. M.; RADER, D. J. Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. **Nat Rev Cardiol**, v. 8, n. 5, p. 266-77, May 2011.

DEIANA, S.; PLATT, B.; RIEDEL, G. The cholinergic system and spatial learning. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2, p. 389-411, Aug 10 2011.

DEKOSKY, S. T.; SCHEFF, S. W.; STYREN, S. D. Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. **Neurodegeneration**, v. 5, n. 4, p. 417-21, Dec 1996.

DEMCHUK, A. M. et al. Is cholesterol a risk factor for stroke?: Yes. **Arch Neurol**, v. 56, n. 12, p. 1518-20; discussion 1524, Dec 1999.

DEUTSCH, J. A. The cholinergic synapse and the site of memory. **Science**, v. 174, n. 4011, p. 788-94, Nov 19 1971.

DI PAOLO, G.; KIM, T. W. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 5, p. 284-96, May 2011.

DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Cholesterol metabolism in the brain. **Curr Opin Lipidol**, v. 12, n. 2, p. 105-12, Apr 2001.

DODART, J.C. et al. Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. **Nat Neurosci**, v. 5, p. 452-457, 2002.

DORNAS, W. C. et al. Experimental atherosclerosis in rabbits. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n. 2, p. 272-8, Aug 2010.

DRACHMAN, D. A. Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? **Neurology**, v. 27, n. 8, p. 783-90, Aug 1977.

DRACHMAN, D. A.; LEAVITT, J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? **Arch Neurol**, v. 30, n. 2, p. 113-21, Feb 1974.

DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biol Chem**, v. 384, n. 4, p. 505-16, Apr 2003.

DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P. G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. **J Neurosci Res**, v. 79, n. 1-2, p. 157-65, Jan 1-15 2005.

DRINGEN, R.; PFEIFFER, B.; HAMPRECHT, B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. **J Neurosci**, v. 19, n. 2, p. 562-9, Jan 15 1999.

ELDER, G. A. et al. Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **Behav Brain Res**, v. 191, n. 2, p. 256-65, Aug 22 2008.

ELINDER, L. S. et al. Promoting a healthy diet and physical activity in adults with intellectual disabilities living in community residences: design and evaluation of a cluster-randomized intervention. **BMC Public Health**, v. 10, p. 761, 2010.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-7, May 1959.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-95, Jul 1961.

ENDO, A. et al. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **Eur J Biochem**, v. 77, n. 1, p. 31-6, Jul 1 1977.

ETO, K.; TAKEUCHI, T. A pathological study of prolonged cases of Minamata disease. With particular reference to 83 autopsy cases. **Acta Pathol Jpn**, v. 28, n. 4, p. 565-84, Jul 1978.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Central cholinergic systems and cognition. **Annu Rev Psychol**, v. 48, p. 649-84, 1997.

EVOLA, M. et al. Oxidative stress impairs learning and memory in apoE knockout mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 96, n. 2, p. 181-6, Aug 2010.

FAHERTY, C. J.; KERLEY, D.; SMEYNE, R. J. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 141, n. 1-2, p. 55-61, Mar 14 2003.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 256, n. 3, p. 405-17, Nov 1 2011.

FARINA, M. et al. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. **Toxicol Sci**, v. 112, n. 2, p. 416-26, Dec 2009.

FARINA, M.; ROCHA, J. B.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sci**, v. 89, n. 15-16, p. 555-63, Oct 10 2011.

FAW, B. Pre-frontal executive committee for perception, working memory, attention, long-term memory, motor control, and thinking: a tutorial review. **Conscious Cogn**, v. 12, n. 1, p. 83-139, Mar 2003.

FEIGIN, V. L. et al. Auckland Stroke Outcomes Study. Part 1: Gender, stroke types, ethnicity, and functional outcomes 5 years poststroke. **Neurology**, v. 75, n. 18, p. 1597-607, Nov 2

FELDMAN, H. H. et al. Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. **Neurology**, v. 74, n. 12, p. 956-64, Mar 23 2010.

FERGUSON, D.; SAPOLSKY, R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. **J Neurosci**, v. 27, n. 30, p. 8046-52, Jul 25 2007.

FERREIRA, S. T.; KLEIN, W. L. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, p. 529-43, 2011.

FERREIRA, T. L. et al. The indirect amygdala-dorsal striatum pathway mediates conditioned freezing: insights on emotional memory networks. **Neuroscience**, v. 153, n. 1, p. 84-94, Apr 22 2008.

FIGUEIREDO, C. P. et al. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight A β oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. **J Neurosci**, v. 33, p. 9626-34, 2013.

FRANCO, J. L. et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 4, p. 449-57, Aug 15 2009.

GALLAGHER, M.; COLOMBO, P. J. Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. **Curr Opin Neurobiol**, v. 5, n. 2, p. 161-8, Apr 1995.

GATZ, M. et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, n. 2, p. 168-74, Feb 2006.

GAYLOR, J. L. Membrane-bound enzymes of cholesterol synthesis from lanosterol. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 292, n. 5, p. 1139-46, Apr 19 2002.

GEULA, C.; GREENBERG, B. D.; MESULAM, M. M. Cholinesterase activity in the plaques, tangles and angiopathy of Alzheimer's disease does not emanate from amyloid. **Brain Res**, v. 644, n. 2, p. 327-30, May 2 1994.

GEULA, C. et al. Postnatal development of cortical acetylcholinesterase-rich neurons in the rat brain: permanent and transient patterns. **Exp Neurol**, v. 134, n. 2, p. 157-78, Aug 1995.

GHRIBI, O. et al. High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. **Exp Neurol**, v. 200, n. 2, p. 460-7, Aug 2006.

GIACOBINI, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. **Neurochem Res**, v. 28, n. 3-4, p. 515-22, Apr 2003.

GILLUM, R. F. The epidemiology of cardiovascular disease in black Americans. **N Engl J Med**, v. 335, n. 21, p. 1597-9, Nov 21 1996.

GIULIAN, D. et al. Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. **J Neurosci**, v. 16, n. 19, p. 6021-37, Oct 1 1996.

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

GOEDEKE, L.; FERNANDEZ-HERNANDO, C. Regulation of cholesterol homeostasis. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 6, p. 915-30, Mar 2012.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Familial hypercholesterolemia: pathogenesis of a receptor disease. **Johns Hopkins Med J**, v. 143, n. 1, p. 8-16, Jul 1978.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, n. 6257, p. 425-30, Feb 1 1990.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 4, p. 431-8, Apr 2009.

GOLDSTEIN, L. B. Statins for stroke prevention. **Curr Atheroscler Rep**, v. 9, n. 4, p. 305-11, Oct 2007.

GRANDJEAN, P. et al. Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. **J Pediatr**, v. 144, n. 2, p. 169-76, Feb 2004.

GREENWOOD, J.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 5, p. 358-70, May 2006.

GRUTZENDLER, J.; MORRIS, J. C. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Drugs**, v. 61, n. 1, p. 41-52, 2001.

GUILLAUMOT, P. et al. Pdro, a protein associated with late endosomes and lysosomes and implicated in cellular cholesterol homeostasis. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e10977, 2010.

HAAG, M. D. et al. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 13-7, Jan 2009.

HAASS, C.; SELKOE, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 2, p. 101-12, Feb 2007.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, Jun 2006.

HAMBRECHT, R. et al. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 342, n. 7, p. 454-60, Feb 17 2000.

HARADA-SHIBA, M. et al. Impact of statin treatment on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia. **J Atheroscler Thromb**, v. 17, n. 7, p. 667-74, Jul 30 2010.

HARDY, J. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. **J Alzheimers Dis**, v. 9, n. 3 Suppl, p. 151-3, 2006.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184-5, Apr 10 1992.

HAROLD, D. et al. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet**, v. 41, p. 1088-93, 2009.

HARRISON, F. E. et al. Antioxidants and cognitive training interact to affect oxidative stress and memory in APP/PSEN1 mice. **Nutr Neurosci**, v. 12, n. 5, p. 203-18, Oct 2009.

HARRISON, F. E. et al. Vitamin C reduces spatial learning deficits in middle-aged and very old APP/PSEN1 transgenic and wild-type mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 93, n. 4, p. 443-50, Oct 2009.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. *Bioquímica Ilustrada*. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2012.

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

HENDRIE, H. C. et al. Prevalence of Alzheimer's disease and dementia in two communities: Nigerian Africans and African Americans. **Am J Psychiatry**, v. 152, n. 10, p. 1485-92, Oct 1995.

HEVERIN, M. et al. Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. **J Lipid Res**, v. 46, n. 5, p. 1047-52, May 2005.

HINTELMANN, H. Organomercurials. Their formation and pathways in the environment. **Met Ions Life Sci**, v. 7, p. 365-401, 2010.

HOLLINGWORTH, P. et al. Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 26, n. 8, p. 793-802, Aug 2011.

HOOIJMANS, C. R.; KILIAAN, A. J. Fatty acids, lipid metabolism and Alzheimer pathology. **Eur J Pharmacol**, v. 585, n. 1, p. 176-96, May 6 2008.

HOWLAND, D. S. et al. Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. **J Biol Chem**, v. 273, n. 26, p. 16576-82, Jun 26 1998.

HUI, L.; CHEN, X.; GEIGER, J. D. Endolysosome involvement in LDL cholesterol-induced Alzheimer's disease-like pathology in primary cultured neurons. **Life Sci**, v. 91, n. 23-24, p. 1159-68, Dec 10 2012.

ISHIBASHI, S. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J Clin Invest**, v. 92, n. 2, p. 883-93, Aug 1993.

ISO, H.; SIMODA, S.; MATSUYAMA, T. Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. **Behav Brain Res**, v. 179, n. 1, p. 90-8, Apr 16 2007.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends Pharmacol Sci**, v. 12, n. 7, p. 260-5, Jul 1991.

IZQUIERDO, L. A. et al. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cell Mol Neurobiol**, v. 22, n. 3, p. 269-87, Jun 2002.

JEITNER, T. M.; VOLOSHYNA, I.; REISS, A. B. Oxysterol derivatives of cholesterol in neurodegenerative disorders. **Curr Med Chem**, v. 18, n. 10, p. 1515-25, 2011.

JELLINGER, K. Neuropathologic substrates of ischemic vascular dementia. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 60, n. 6, p. 658-9, Jun 2001.

JERUSALINSKY, D. et al. Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. **Behav Neural Biol**, v. 58, n. 1, p. 76-80, Jul 1992.

JICK, H. et al. Statins and the risk of dementia. **Lancet**, v. 356, n. 9242, p. 1627-31, Nov 11 2000.

JIN, X. et al. Dietary selenium (Se) and vitamin E (V(E)) supplementation modulated methylmercury-mediated changes in markers of cardiovascular diseases in rats. **Cardiovasc Toxicol**, v. 12, n. 1, p. 10-24, Mar 2012.

KALAYCI, R. et al. Influence of hypercholesterolemia and hypertension on the integrity of the blood-brain barrier in rats. **Int J Neurosci**, v. 119, n. 10, p. 1881-904, 2009.

KALMIJN, S. Fatty acid intake and the risk of dementia and cognitive decline: a review of clinical and epidemiological studies. **J Nutr Health Aging**, v. 4, n. 4, p. 202-7, 2000.

KALVODOVA, L. et al. Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. **J Biol Chem**, v. 280, n. 44, p. 36815-23, Nov 4 2005.

KANE, J. P.; HARDMAN, D. A.; PAULUS, H. E. Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 5, p. 2465-9, May 1980.

KAR, S. et al. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. **J Psychiatry Neurosci**, v. 29, n. 6, p. 427-41, Nov 2004.

KARASINSKA, J. M.; HAYDEN, M. R. Cholesterol metabolism in Huntington disease. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 10, p. 561-72, Oct 2011.

KAZLAUCKAS, V. et al. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. **Physiol Behav**, v. 102, n. 5, p. 475-80, Mar 28 2011.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 493-5, Apr 3 1997.

KHADRAWY, Y. A.; NOUR, N. A.; ABOUL EZZ, H. S. Effect of oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation on the activities of Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in the cortex and hippocampus of rat. **Transl Res**, v. 157, n. 2, p. 100-7, Feb 2011.

KITAMURA, T. et al. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 814-27, Nov 13 2009.

KIVIPELTO, M. et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. **Ann Intern Med**, v. 137, n. 3, p. 149-55, Aug 6 2002.

KIVIPELTO, M. et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. **BMJ**, v. 322, n. 7300, p. 1447-51, Jun 16 2001.

KIVIPELTO, M. et al. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. **Arch Neurol**, v. 62, n. 10, p. 1556-60, Oct 2005.

KIVIPELTO, M.; SOLOMON, A.; WINBLAD, B. Statin therapy in Alzheimer's disease. **Lancet Neurol**, v. 4, n. 9, p. 521-2, Sep 2005.

KNAFO, S. et al. Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J Pathol**, v. 219, n. 1, p. 41-51, Sep 2009.

KNIGHT-LOZANO, C. A. et al. Cigarette smoke exposure and hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues. **Circulation**, v. 105, n. 7, p. 849-54, Feb 19 2002.

KOJRO, E. et al. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 10, p. 5815-20, May 8 2001.

KOTILINEK, L.A. et al. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 22, p. 6331-6335, 2002.

- KOWALA, M. C. et al. Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. **Atherosclerosis**, v. 149, n. 2, p. 323-30, Apr 2000.
- KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. **J Comp Physiol Psychol**, v. 53, p. 509-19, Dec 1960.
- KROMHOUT, D. Diet and cardiovascular diseases. **J Nutr Health Aging**, v. 5, n. 3, p. 144-9, 2001.
- KUO, Y. M. et al. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 252, n. 3, p. 711-5, Nov 27 1998.
- KUSHI, L. H. et al. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. **N Engl J Med**, v. 334, n. 18, p. 1156-62, May 2 1996.
- LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N.; ODDO, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 7, p. 499-509, Jul 2007.
- LAUFS, U. et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 220-6, Jan 20 2004.
- LEDESMA, M. D.; DOTTI, C. G. Amyloid excess in Alzheimer's disease: what is cholesterol to be blamed for? **FEBS Lett**, v. 580, n. 23, p. 5525-32, Oct 9 2006.
- LEE, I. M. et al. Relative intensity of physical activity and risk of coronary heart disease. **Circulation**, v. 107, n. 8, p. 1110-6, Mar 4 2003.
- LEONI, V.; CACCIA, C. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. **Biochimie**, v. 95, n. 3, p. 595-612, Mar 2012.

LEVY, E. et al. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. **Science**, v. 248, n. 4959, p. 1124-6, Jun 1 1990.

LEVY-LAHAD, E. et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. **Science**, v. 269, n. 5226, p. 973-7, Aug 18 1995.

LI, F. J.; SHEN, L.; JI, H. F. Dietary intakes of vitamin E, vitamin C, and beta-carotene and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. **J Alzheimers Dis**, v. 31, n. 2, p. 253-8, 2012.

LI, L. et al. Simvastatin enhances learning and memory independent of amyloid load in mice. **Ann Neurol**, v. 60, n. 6, p. 729-39, Dec 2006.

LINDEN, T. et al. Cognitive impairment and dementia 20 months after stroke. **Neuroepidemiology**, v. 23, n. 1-2, p. 45-52, Jan-Apr 2004.

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

LIU, N.; HE, S.; YU, X. Early natural stimulation through environmental enrichment accelerates neuronal development in the mouse dentate gyrus. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30803, 2012.

LIYANAGE, K. E. et al. Familial hypercholesterolemia: epidemiology, Neolithic origins and modern geographic distribution. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 48, n. 1, p. 1-18, Jan-Feb 2011.

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

MABUCHI, H. et al. Effect of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on serum lipoproteins and ubiquinone-10-levels in patients with familial hypercholesterolemia. **N Engl J Med**, v. 305, n. 9, p. 478-82, Aug 27 1981.

McLEAN, C.A. et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Ann Neurol**, v. 46, p. 860-866, 1999.

MANDAL, P. K.; TRIPATHI, M.; SUGUNAN, S. Brain oxidative stress: detection and mapping of anti-oxidant marker 'Glutathione' in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 417, n. 1, p. 43-8, Jan 6 2012.

MANGIALASCHE, F. et al. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. **Lancet Neurol**, v. 9, n. 7, p. 702-16, Jul 2010.

MANN, D. M. Neuropathology of Alzheimer's disease: towards an understanding of the pathogenesis. **Biochem Soc Trans**, v. 17, n. 1, p. 73-5, Feb 1989.

MARIANI, E.; MONASTERO, R.; MECOCCHI, P. Mild cognitive impairment: a systematic review. **J Alzheimers Dis**, v. 12, n. 1, p. 23-35, Aug 2007.

MARLATT, M. W. et al. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. **Dev Neurobiol**, v. 72, n. 6, p. 943-52, Jun 2012.

MASSOULIE, J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. **Neurosignals**, v. 11, n. 3, p. 130-43, May-Jun 2002.

MASSOULIE, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Prog Neurobiol**, v. 41, n. 1, p. 31-91, Jul 1993.

MAXFIELD, F. R.; VAN MEER, G. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, n. 4, p. 422-9, Aug 2010.

MEHTA, N. J.; KHAN, I. A. Cardiology's 10 greatest discoveries of the 20th century. **Tex Heart Inst J**, v. 29, n. 3, p. 164-71, 2002.

MERINO, J. G.; HACHINSKI, V. Stroke-related dementia. **Curr Atheroscler Rep**, v. 4, n. 4, p. 285-90, Jul 2002.

MIELKE, M. M. et al. High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. **Neurology**, v. 64, n. 10, p. 1689-95, May 24 2005.

MIIDA, T.; TAKAHASHI, A.; IKEUCHI, T. Prevention of stroke and dementia by statin therapy: experimental and clinical evidence of their pleiotropic effects. **Pharmacol Ther**, v. 113, n. 2, p. 378-93, Feb 2007.

MONTILLA, P. et al. Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats. **Clin Nutr**, v. 25, n. 1, p. 146-53, Feb 2006.

MRAK, R. E.; SHENG, J. G.; GRIFFIN, W. S. Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. **Hum Pathol**, v. 26, n. 8, p. 816-23, Aug 1995.

MULDER, M. Sterols in the central nervous system. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 12, n. 2, p. 152-8, Mar 2009.

MULDER, M. et al. Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. **Neurobiol Dis**, v. 16, n. 1, p. 212-9, Jun 2004.

MULDER, M. et al. LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. **Neurosci Res**, v. 59, n. 3, p. 251-6, Nov 2007.

MUNZEL, T. et al. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? **Eur Heart J**, v. 31, n. 22, p. 2741-8, Nov 2010.

MURAI, T. et al. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. **Physiol Behav**, v. 90, n. 1, p. 116-24, Jan 30 2007.

MURATA, K. et al. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. **J Pediatr**, v. 144, n. 2, p. 177-83, Feb 2004.

NAGELHUS, E. A.; MATHISEN, T. M.; OTTERSEN, O. P. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 905-13, 2004.

NAJ, A. C. et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. **Nat Genet**, v. 43, n. 5, p. 436-41, May 2011.

NASLUND, J. et al. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. **JAMA**, v. 283, p. 1571-1577, 2000.

NEUNTEUFL, T. et al. Additional benefit of vitamin E supplementation to simvastatin therapy on vasoreactivity of the brachial artery of hypercholesterolemic men. **J Am Coll Cardiol**, v. 32, n. 3, p. 711-6, Sep 1998.

NICCHIA, G. P. et al. The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 935-45, 2004.

NOTKOLA, I. L. et al. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. **Neuroepidemiology**, v. 17, n. 1, p. 14-20, 1998.

NOUROOZ-ZADEH, J.; SMITH, C. C.; BETTERIDGE, D. J. Measures of oxidative stress in heterozygous familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis**, v. 156, n. 2, p. 435-41, Jun 2001.

OHASHI, R. et al. Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. **Trends Cardiovasc Med**, v. 14, n. 5, p. 187-90, Jul 2004.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979.

OHNO, M.; KISHIMOTO, T.; TADA, M. The effect of methylmercury (CH₃HgCl) on the production of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) by cultured human umbilical vascular endothelial cells based on its anti-aggregatory effect on human platelets. **Cell Biol Toxicol**, v. 11, n. 6, p. 303-11, Dec 1995.

OLIVEIRA, H. C. et al. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **FASEB J**, v. 19, n. 2, p. 278-80, Feb 2005.

ONER, P.; BEKPINAR, S.; OZ, B. Alterations in some lipid components and Ca²⁺ ATPase activity in brain of rats fed an atherogenic diet. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v. 72, n. 3, p. 337-45, Jun 1991.

PAIGEN, B. et al. Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. **Arteriosclerosis**, v. 10, n. 2, p. 316-23, Mar-Apr 1990.

PAIM, B. A. et al. 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 Radic Biol Med**, v. 44, n. 3, p. 444-51, Feb 1 2008.

PAPPOLLA, M. A. et al. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. **Neurology**, v. 61, n. 2, p. 199-205, Jul 22 2003.

PAPPOLLA, M. A. et al. Cholesterol, oxidative stress, and Alzheimer's disease: expanding the horizons of pathogenesis. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 2, p. 173-81, Jul 15 2002.

PARATCHA, G.; IBANEZ, C. F. Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. **Curr Opin Neurobiol**, v. 12, n. 5, p. 542-9, Oct 2002.

PASSINGHAM, D.; SAKAI, K. The prefrontal cortex and working memory: physiology and brain imaging. **Curr Opin Neurobiol**, v. 14, n. 2, p. 163-8, Apr 2004.

PEPEU, G. Mild cognitive impairment: animal models. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 6, n. 4, p. 369-77, Dec 2004.

PERRY, E. et al. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? **Trends Neurosci**, v. 22, n. 6, p. 273-80, Jun 1999.

PERRY, E. K. et al. A cholinergic connection between normal aging and senile dementia in the human hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 6, n. 1, p. 85-9, Oct 1977.

PETERSEN, R. C. et al. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. **Arch Neurol**, v. 56, n. 3, p. 303-8, Mar 1999.

PFRIEGER, F. W.; UNGERER, N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. **Prog Lipid Res**, v. 50, n. 4, p. 357-71, Oct 2011.

PIACERI, I. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 1, p. 167-77, 2013.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, Apr 21 1977.

PRASANTHI, J. R. et al. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Mol Neurodegener**, v. 4, p. 1, 2009.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, Feb 28 2003.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 362, n. 4, p. 329-44, Jan 28 2010.

RAKONCZAY, Z. et al. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chem Biol Interact**, v. 157-158, p. 233-8, Dec 15 2005.

RAMIREZ, C. et al. ApoB100/LDLR^{-/-} hypercholesterolaemic mice as a model for mild cognitive impairment and neuronal damage. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22712, 2011.

RAMJEE, V.; EAPEN, D. J.; SPERLING, L. S. Optimal lipid targets for the new era of cardiovascular prevention. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1254, p. 106-14, Apr 2012.

- RANG, H. P. et al. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2011.
- RAPP, J. H. et al. Microemboli composed of cholesterol crystals disrupt the blood-brain barrier and reduce cognition. **Stroke**, v. 39, n. 8, p. 2354-61, Aug 2008.
- REFOLO, L. M. et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. **Neurobiol Dis**, v. 7, n. 4, p. 321-31, Aug 2000.
- REFOLO, L. M. et al. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, v. 8, n. 5, p. 890-9, Oct 2001.
- REITZ, C. et al. Impact of plasma lipids and time on memory performance in healthy elderly without dementia. **Neurology**, v. 64, n. 8, p. 1378-83, Apr 26 2005.
- REITZ, C. et al. Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. **Arch Neurol**, v. 61, n. 5, p. 705-14, May 2004.
- RHEE, S. J.; JEONG, Y. C.; CHOI, J. H. Effects of vitamin E on phospholipase A2 activity and oxidative damage to the liver in streptozotocin-induced diabetic rats. **Ann Nutr Metab**, v. 49, n. 6, p. 392-6, Nov-Dec 2005.
- RIEKKINEN, P., JR. et al. Effects of THA on passive avoidance retention performance of intact, nucleus basalis, frontal cortex and nucleus basalis + frontal cortex-lesioned rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 39, n. 4, p. 841-6, Aug 1991.
- RIMM, E. B. et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. **N Engl J Med**, v. 328, n. 20, p. 1450-6, May 20 1993.
- RISSANEN, T. et al. Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. **Circulation**, v. 102, n. 22, p. 2677-9, Nov 28 2000.

ROBINSON, L.; PLATT, B.; RIEDEL, G. Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2, p. 443-65, Aug 10 2011.

RODWELL, V. W.; NORDSTROM, J. L.; MITSCHELEN, J. J. Regulation of HMG-CoA reductase. **Adv Lipid Res**, v. 14, p. 1-74, 1976.

ROSENZWEIG, M. R. et al. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. **J Comp Physiol Psychol**, v. 55, p. 429-37, Aug 1962.

SALONEN, J. T. et al. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. **Atherosclerosis**, v. 148, n. 2, p. 265-73, Feb 2000.

SANO, M. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of simvastatin to treat Alzheimer disease. **Neurology**, v. 77, n. 6, p. 556-63, Aug 9 2011.

SANTOS, D. B. et al. Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid beta peptide in mice. **Exp Neurol**, v. 233, n. 2, p. 767-75, Feb 2012.

SEPEHRNIA, B. et al. Genetic studies of human apolipoproteins. XI. The effect of the apolipoprotein C-II polymorphism on lipoprotein levels in Nigerian blacks. **J Lipid Res**, v. 30, n. 9, p. 1349-55, Sep 1989.

SHAFATI, M. et al. Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation. **J Lipid Res**, v. 52, n. 5, p. 1004-10, May 2011.

SHANKER, G. et al. Methylmercury inhibits cysteine uptake in cultured primary astrocytes, but not in neurons. **Brain Res**, v. 914, n. 1-2, p. 159-65, Sep 28 2001.

SHEPARDSON, N. E.; SHANKAR, G. M.; SELKOE, D. J. Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: II. Review of human trials and recommendations. **Arch Neurol**, v. 68, n. 11, p. 1385-92, Nov 2011.

SHEPARDSON, N. E.; SHANKAR, G. M.; SELKOE, D. J. Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies. **Arch Neurol**, v. 68, n. 10, p. 1239-44, Oct 2011.

SILVA, E.L. et al. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. **Arch Biochem Biophys**, v.349, p.313-20, 1998.

SIMONETTI, T. et al. Enrichment from birth accelerates the functional and cellular development of a motor control area in the mouse. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6780, 2009.

SIMONS, L. A.; WILLIAMS, P. F. Changes in plasma lipoproteins in subjects treated with the bile acid-sequestering resin polidexide (Secholex). **Aust N Z J Med**, v. 6, n. 2, p. 127-30, Apr 1976.

SIMONS, M. et al. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p. 6460-4, May 26 1998.

SINGH, P. et al. Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58833, 2013.

SMITH, C. P. et al. Pharmacological activity and safety profile of P10358, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 280, n. 2, p. 710-20, Feb 1997.

SOFI, F. et al. Physical activity during leisure time and primary prevention of coronary heart disease: an updated meta-analysis of cohort studies. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v. 15, n. 3, p. 247-57, Jun 2008.

SOLOMON, A. et al. Serum cholesterol changes after midlife and late-life cognition: twenty-one-year follow-up study. **Neurology**, v. 68, n. 10, p. 751-6, Mar 6 2007.

SOLOMON, A. et al. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 28, n. 1, p. 75-80, 2009.

SORIA, L. F. et al. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 2, p. 587-91, Jan 1989.

SPADY, D. K.; DIETSCHY, J. M. Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. **J Lipid Res**, v. 24, n. 3, p. 303-15, Mar 1983.

SPARKS, D. L. Intra-neuronal beta-amyloid immunoreactivity in the CNS. **Neurobiol Aging**, v. 17, n. 2, p. 291-9, Mar-Apr 1996.

SPARKS, D. L. et al. Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 11, n. 6, p. 601-7, Nov-Dec 1990.

SPARKS, D. L. et al. Reduced risk of incident AD with elective statin use in a clinical trial cohort. **Curr Alzheimer Res**, v. 5, n. 4, p. 416-21, Aug 2008.

SPARKS, D. L. et al. Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. **Ann N Y Acad Sci**, v. 903, p. 335-44, Apr 2000.

SPARKS, D. L. et al. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. **Exp Neurol**, v. 126, n. 1, p. 88-94, Mar 1994.

SPILLANTINI, M. G. et al. Mutations in the tau gene (MAPT) in FTDP-17: the family with Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia (MSTD). **J Alzheimers Dis**, v. 9, n. 3 Suppl, p. 373-80, 2006.

SPOSITO, A. C. et al. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. **Arq Bras Cardiol**, v. 88 Suppl 1, p. 2-19, Apr 2007.

STEINBERG, D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1211-7, Nov 2002.

STONE, N. J. et al. Coronary artery disease in 116 kindred with familial type II hyperlipoproteinemia. **Circulation**, v. 49, n. 3, p. 476-88, Mar 1974.

STRAND, B. H. et al. Midlife vascular risk factors and their association with dementia deaths: results from a Norwegian prospective study followed up for 35 years. **J Neurol Sci**, v. 324, n. 1-2, p. 124-30, Jan 15 2013.

STREIT, W. J.; SPARKS, D. L. Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. **J Mol Med (Berl)**, v. 75, n. 2, p. 130-8, Feb 1997.

STRITTMATTER, W. J. et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 5, p. 1977-81, Mar 1 1993.

TAKECHI, R. et al. Probulcol prevents blood-brain barrier dysfunction in wild-type mice induced by saturated fat or cholesterol feeding. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 40, n. 1, p. 45-52, Jan 2013.

TAKECHI, R. et al. Dietary fats, cerebrovasculature integrity and Alzheimer's disease risk. **Prog Lipid Res**, v. 49, n. 2, p. 159-70, Apr 2010.

TANZI, R. E.; MOIR, R. D.; WAGNER, S. L. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. **Neuron**, v. 43, n. 5, p. 605-8, Sep 2 2004.

TARIOT, P. N. et al. A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group. **Neurology**, v. 54, n. 12, p. 2269-76, Jun 27 2000.

THIRUMANGALAKUDI, L. et al. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **J Neurochem**, v. 106, n. 1, p. 475-85, Jul 2008.

TOMAS-CAMARDIEL, M. 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. **J Neurosci Res**, v. 80, n. 2, p. 235-46, Apr 15 2005.

TRINH, N. H. et al. Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis. **JAMA**, v. 289, n. 2, p. 210-6, Jan 8 2003.

ULLRICH, C.; PIRCHL, M.; HUMPEL, C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. **Mol Cell Neurosci**, v. 45, n. 4, p. 408-17, Dec 2010.

UNGER, C. et al. Effect of subchronic treatment of memantine, galantamine, and nicotine in the brain of Tg2576 (APP^{swe}) transgenic mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 317, n. 1, p. 30-6, Apr 2006.

VAN DAM, D. et al. Symptomatic effect of donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine on cognitive deficits in the APP23 model. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 180, n. 1, p. 177-90, Jun 2005.

VAN DAM, D.; COEN, K.; DE DEYN, P. P. Cognitive evaluation of disease-modifying efficacy of donepezil in the APP23 mouse model for Alzheimer's disease. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 197, n. 1, p. 37-43, Mar 2008.

VAN PRAAG, H. Exercise and the brain: something to chew on. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 5, p. 283-90, May 2009.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 3, p. 266-70, Mar 1999.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat Rev Neurosci**, v. 1, n. 3, p. 191-8, Dec 2000.

VAN PRAAG, H. et al. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J Neurosci**, v. 25, n. 38, p. 8680-5, Sep 21 2005.

VAN VLIET, P. Cholesterol and late-life cognitive decline. **J Alzheimers Dis**, v. 30 Suppl 2, p. S147-62, 2012.

VAN VLIET, P. et al. The influence of age on the association between cholesterol and cognitive function. **Exp Gerontol**, v. 44, n. 1-2, p. 112-22, Jan-Feb 2009.

VENKATESHAPPA, C. et al. Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochem Res**, v. 37, n. 8, p. 1601-14, Aug 2012.

VERCESI, A. E. et al. Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. **IUBMB Life**, v. 59, n. 4-5, p. 263-8, Apr-May 2007.

VIVAR, C.; POTTER, M. C.; VAN PRAAG, H. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 15, p. 189-210, 2013.

VIZI, E. S. et al. Neurochemical evidence of heterogeneity of presynaptic and somatodendritic nicotinic acetylcholine receptors. **Ann N Y Acad Sci**, v. 757, p. 84-99, May 10 1995.

WATSON, R. E. et al. Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 77, n. 5, p. 471-84, Oct 2006.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-33, 1981.

WEVERS, A. Localisation of pre- and postsynaptic cholinergic markers in the human brain. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2, p. 341-55, Aug 10 2011.

WHITMER, R. A. et al. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. **Neurology**, v. 64, n. 2, p. 277-81, Jan 25 2005.

WILMOT, E. G. et al. Sedentary time in adults and the association with diabetes, cardiovascular disease and death: systematic review and meta-analysis. **Diabetologia**, v. 55, n. 11, p. 2895-905, Nov 2012.

WU, H. M. et al. Novel neuroprotective mechanisms of memantine: increase in neurotrophic factor release from astroglia and anti-inflammation by preventing microglial activation. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 10, p. 2344-57, Sep 2009.

XIE, H. Q. et al. PRiMA directs a restricted localization of tetrameric AChE at synapses. **Chem Biol Interact**, v. 187, n. 1-3, p. 78-83, Sep 6 2010.

XIE, H. Q. et al. Targeting acetylcholinesterase to membrane rafts: a function mediated by the proline-rich membrane anchor (PRiMA) in neurons. **J Biol Chem**, v. 285, n. 15, p. 11537-46, Apr 9 2010.

YOSHIDA, M. Potential role of statins in inflammation and atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, v. 10, n. 3, p. 140-4, 2003.

ZADELAAR, S. et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 8, p. 1706-21, Aug 2007.

ZAMBON, D. et al. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **Am J Med**, v. 123, n. 3, p. 267-74, Mar 2010.