

Jadna Bogado Lopes

**DONEPEZIL REVERTE DÉFICITS COGNITIVOS EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA
FAMILIAR**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado junto à disciplina BIO7016
– Trabalho de conclusão de curso II,
como requisito parcial para a obtenção
do título de licenciada em Ciências
Biológicas.

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

Co-orientadora: Dr^a. Jade de Oliveira.

Florianópolis
2015

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

Lopes, Jadna Bogado

Donepezil reverte déficits cognitivos em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar / Jadna Bogado Lopes ; orientadora, Andreza Fabro de Bem ; coorientadora, Jade de Oliveira. - Florianópolis, SC, 2015.

82 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. camundongos nocautes para o receptor de LDL. 3. acetilcolinesterase. 4. sistema colinérgico. 5. memória. I. Bem, Andreza Fabro de. II. Oliveira, Jade de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Aos meus pais, pelo suporte, apoio,
carinho e amor incondicionais.
Obrigada por estarem presentes nas
mais distintas etapas de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado. Neste espaço eu gostaria de agradecer a todos os envolvidos, embora sempre falhamos na execução de tal tarefa... Meus agradecimentos, no momento, vão principalmente:

À Prof^a. Dr^a. Andreza Fabro de Bem, minha orientadora, primeiramente por aceitar me orientar neste trabalho. Obrigada pelas conversas, pela construção de conhecimento e por estar presente nos momentos de dúvida.

À minha co-orientadora, Dr^a. Jade de Oliveira, por todo o empenho e disposição em fazer o melhor possível em cada etapa e experimento. Este trabalho só existe porque você construiu sua carreira acadêmica seguindo tal linha de pesquisa que, desde o início, foi o que mais me motivou a começar a iniciação científica neste laboratório. Obrigada pelos (vários) puxões de orelha – quando cabíveis. Obrigada, também, pela paciência em ler e reler este TCC milhões de vezes. Por fim, obrigada por ser minha colega e co-orientadora, contribuindo em distintos momentos da minha vida.

Aos meus colegas de laboratório: Cristine, Daiane, Gabriela, Gianni, Luana, Luiza e Ruth, além dos colegas emprestados de Santa Maria: Sabrina e Matheus. Também agradeço às colegas do laboratório do prof. Farina: Aline, Cinara, Dan, Helo, Ju, Vivi e Stefanie. Vocês fazem meus dias mais felizes! Obrigada por estarem presentes e contribuírem de várias formas para a construção deste trabalho. Sentirei (muitas) saudades.

Aos meus amigos e amigas, obrigada por me entenderem e compartilharem comigo bons momentos. Em especial à Fabíola, Juliana e Thaís, eu sei que estive afastada nos últimos tempos, mas espero que me desculpem. Ao Paulo André, meus sinceros agradecimentos, principalmente por me ouvir falar tantas vezes dos meus experimentos, dúvidas e rotina. A todos os meus queridos e queridas que moram, ou não, em Florianópolis, não listarei, mas sei que vocês sabem o quanto eu os quero bem.

Aos membros da banca: Profa. Dra. Manuella, Dr. Eduardo e Dr. André. Obrigada por aceitarem participar na avaliação e construção final deste trabalho.

Aos técnicos do LAMEB, Bibiana e Denis. Em especial à Vanessa que, além de sempre ser simpática no LAMEB, colaborou de forma importantíssima para a minha (futura) colação de grau. Muito obrigada!

Aos professores do curso, tanto da UFSC, quanto da UC (Portugal). Em especial à profa. Risoleta, cujo projeto permitiu o meu intercâmbio para a UC, e ao prof. João Ramalho pelas excelentes e inspiradoras aulas no momento que eu mais precisava. Levarei sempre comigo o exemplo de vocês.

Aos meus pais, Juçara e Huri, obrigada por todo amor e carinho! Espero poder deixá-los sempre orgulhosos, porque vocês são pais maravilhosos e merecem o melhor, sempre.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

"A senhora me desculpe, mas no momento não tenho muita certeza. Quer dizer, eu sei quem eu era quando acordei hoje de manhã, mas já mudei uma porção de vezes desde que isso aconteceu.

(...) Receio que não possa me explicar, Dona Lagarta, porque é justamente aí que está o problema. Posso explicar uma porção de coisas, mas não posso explicar a mim mesma."

Alice no País das Maravilhas, Lewis Carrol (1865)

RESUMO

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma condição hereditária do tipo autossômica codominante caracterizada, principalmente, por uma disfunção total ou parcial no receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLr), levando ao aumento nos níveis de colesterol plasmático. Além da forte associação entre a HF e o desenvolvimento prematuro de doenças cardiovasculares ateroscleróticas, estudos clínicos e pré-clínicos apontam a hipercolesterolemia familiar como um importante fator de risco para o desenvolvimento de prejuízos cognitivos. Nesse sentido, os inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) representam a classe de fármacos mais extensamente utilizada no tratamento da principal demência descrita, a doença de Alzheimer. Dessa forma, neste trabalho investigamos o envolvimento do sistema colinérgico na relação entre HF e déficits cognitivos, utilizando camundongos nocautes para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) de três meses de idade, um modelo experimental de HF humana, tratados subcronicamente (vinte e um dias) com um inibidor da AChE – o donepezil na dose de 3 mg/kg (via intraperitoneal). Ao final do tratamento, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais – reconhecimento do objeto, realocação do objeto e alternância espontânea – para avaliar memória espacial de referência e memória de trabalho respectivamente. Em seguida, foram avaliadas no córtex pré-frontal e hipocampo as atividades da enzima AChE e das enzimas antioxidantes pertencentes ao sistema da glutatona. Além disso, também investigamos o potencial do donepezil em inibir a AChE cerebral de camundongos C57BL/6 *in vitro*. De modo notório, observamos que o tratamento subcrônico com o donepezil reverte os déficits cognitivos em camundongos LDLr^{-/-}, em todos os paradigmas comportamentais avaliados. Entretanto, não observamos uma inibição significativa na atividade da AChE nas estruturas cerebrais dos grupos experimentais tratados com donepezil. Adicionalmente, a atividade das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) também não foram alteradas pela hipercolesterolemia e tratamento com o donepezil. Por fim, a partir de nosso protocolo experimental *in vitro* observamos que o donepezil é eficaz em inibir a AChE cerebral, com um IC₅₀ de 0,14 nM. Em suma, este trabalho demonstra, pela primeira vez, que um inibidor da AChE é capaz de reverter os déficits cognitivos em um modelo experimental de HF, indicando que alterações do sistema colinérgico estão envolvidas no desenvolvimento de prejuízos de memória induzidos pela hipercolesterolemia. Todavia, os mecanismos ainda precisam ser melhor elucidados.

Palavras-chave: Camundongos nocautes para o receptor de LDL, acetilcolinesterase, sistema colinérgico e hipercolesterolemia.

ABSTRACT

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal co-dominant inherited disorder characterized, mostly, by a total or partial loss of low-density lipoprotein receptor (LDLr) function, leading to an increase on plasmatic cholesterol levels. In addition to the strong correlation between FH and the premature atherosclerotic cardiovascular diseases, clinical and preclinical studies have shown that FH is an important risk factor to cognitive impairment development. In this regard, the experimental findings indicate that cholinergic system dysfunction seems to be an early event associated with hypercholesterolemia-induced cognitive impairments in rodents. Accordingly, acetylcholinesterase (AChE) inhibitors are the main employed class of drugs for the treatment of Alzheimer's disease, the most common form of dementia. Herein, using three-month-old LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}) (a widely experimental model of human FH) treated subchronically (twenty one days) with an AChE inhibitor – donepezil (3 mg/kg, i.p.), we investigated the involvement of the cholinergic system on FH-induced cognitive deficits. After the treatment, mice were submitted to behavioral tasks – object recognition, object location and spontaneous alternation – to assess spatial reference memory and working memory, respectively. Then, activity of AChE and glutathione-related antioxidant enzymes were evaluated on prefrontal cortex and hippocampus. Furthermore, we also investigated in vitro donepezil's effects on AChE activity in cerebral homogenates. Notably, the treatment with donepezil mitigates cognitive deficits in LDLr^{-/-} mice in all behavioral paradigms tested. However, we did not observed an AChE inhibition in the brain structures of any experimental group. Additionally, the activities of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) were not modified by hypercholesterolemia or donepezil. Finally, we observed the in vitro efficacy of donepezil in the AChE inhibition (IC₅₀ 0.14 nM). In summary, the AChE inhibitor, donepezil, mitigates cognitive deficits in the experimental model of FH, indicating that alterations in the cholinergic system are involved in the memory deficits induced by hypercholesterolemia. However, the exact mechanisms remains to be elucidated.

Keywords: LDL receptor knockout mice, acetylcholinesterase, cholinergic system and hypercholesterolemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama representativo da via endocítica mediada pelo receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL).	22
Figura 2	O receptor de LDL na hipercolesterolemia familiar.	24
Figura 3	Neurotransmissão colinérgica.	29
Figura 4	Estrutura química do donepezil.	31
Figura 5	Desenho experimental <i>in vivo</i> .	41
Figura 6	Efeito inibitório do donepezil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) <i>in vitro</i> em homogenato de cérebro total de camundongos C57BL/6.	48
Figura 7	Efeitos do tratamento com donepezil sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} .	49
Figura 8	Efeitos do tratamento com donepezil sobre a memória de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} .	51
Figura 9	Perfil lipídico dos camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr ^{-/-} .	52
Figura 10	Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr ^{-/-} .	52
Figura 11	Determinação da atividade das enzimas vinculadas ao sistema antioxidante da glutatona (GSH), em camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr ^{-/-} .	54

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Características gerais dos inibidores das colinesterases	30
Tabela II	Evidências pré-clínicas demonstrando a eficácia do donepezil em reverter déficits cognitivos	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β – Peptídeo β - amiloide
AChE – acetilcolinesterase
ACTI – acetiltiocolina
ANOVA – Análise de variância
APP – proteína precursora amiloide
apoB – apolipoproteína B
apoE – apolipoproteína E
BHE – Barreira hemato-encefálica
BuChE – butirilcolinesterase
CCL – Comprometimento cognitivo leve
DAC – Doença arterial coronariana
DTNB – ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
E.P.M. – erro padrão da média
GPx – Glutaciona peroxidase
GR – Glutaciona redutase
GSH - Glutaciona
GSSG – Glutaciona oxidada
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HEPES - ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico
HF – Hipercolesterolemia familiar
i.c. – intracerebral
i.c.v. – intracerebroventricular
i.p. – intraperitoneal
IgG – imunoglobulina G
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDLr – Receptor da lipoproteína de baixa densidade
LRP-1 – Proteína 1 relacionada ao receptor de LDL
NADPH – Nucleotídeos piridinas no estado reduzido
pH – potencial de hidrogênio
PS1 – presenilina 1
SNC – Sistema nervoso central
s.c. – subcutâneo
TFK – tampão fosfato de potássio
TNB – ácido-2-nitro-5-tiobenzoico
VLDL – Lipoproteínas de muita baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR	23
1.2. MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR	25
1.3. HIPERCOLESTEROLEMIA E DÉFICITS COGNITIVOS	25
1.4. INIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASE	28
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	37
3.1. OBJETIVO GERAL	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. ANIMAIS	39
4.2. CLORIDRATO DE DONEPEZILA	39
4.3. DESENHOS EXPERIMENTAIS	39
4.3.1. Experimento <i>in vitro</i>	39
4.3.2. Experimento <i>in vivo</i>	39
4.4. TESTES COMPORTAMENTAIS	41
4.4.1. Teste do campo aberto	41
4.4.2. Teste do reconhecimento do objeto	42
4.4.3. Teste da realocação do objeto	42
4.4.4. Teste de alterância espontânea	43
4.5. DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO	44
4.6. PREPARAÇÃO TECIDUAL PARA AS ANÁLISES BIOQUÍMICAS	44
4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE	45
4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
5. RESULTADOS	47
5.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM O DONEPEZIL NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE <i>IN VITRO</i>	47
5.2. O TRATAMENTO COM O DONEPEZIL REVERTE A HIPERLOCOMOÇÃO E OS PREJUÍZOS DE MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS LDLR ^{-/-}	48
5.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM O DONEPEZIL NO PERFIL LIPÍDICO DOS ANIMAIS	51
5.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM O DONEPEZIL NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE NO CÉREBRO DOS CAMUNDONGOS	52
5.5. EFEITO DO TRATAMENTO COM O DONEPEZIL NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES DO SISTEMA DA GLUTATIONA NO CÉREBRO DOS CAMUNDONGOS	53

6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES PONTUAIS	61
REFERÊNCIAS	63

INTRODUÇÃO

O colesterol é uma molécula essencial para o funcionamento de todas as células animais. Isolado pela primeira vez em 1784, o colesterol é um componente estrutural imprescindível das membranas celulares, além de ser precursor de hormônios esteroides e participar em processos de sinalização e proliferação celular (GOEDEKE e FERNANDEZ-HERNANDO, 2012; NELSON E COX, 2011). Todavia, apesar de sua importância, quando em níveis inadequados na circulação sanguínea, esta molécula contribui para o aparecimento de enfermidades, como por exemplo a aterosclerose (IKONEN, 2006).

O colesterol necessita de transportadores para ser carregado na corrente sanguínea devido sua lipofilicidade. Estes transportadores são macromoléculas denominadas lipoproteínas. Dentre estas, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) é o principal carreador de colesterol no sangue. Portanto, a homeostase do colesterol plasmático é principalmente regulada pelo receptor de LDL, uma vez que este receptor medeia a remoção e o catabolismo de partículas de LDL circulantes (VANCE E VANCE, 2008; NELSON E COX, 2011).

A LDL contém uma cópia única de apolipoproteína B100 (apoB100) e carrega cerca de 70% do colesterol plasmático (BURNETT e HOOPER, 2008). Resumidamente, a apoB100 está presente na superfície da lipoproteína plasmática e liga-se ao receptor, o qual está na superfície celular. Após a ligação, este complexo receptor-LDL passa por endocitose para entrar na célula. A LDL é dissociada do complexo, graças ao pH ácido, e o receptor pode retornar à superfície da célula. Nesta fase, a LDL chega ao lisossomo, tendo seus componentes proteicos hidrolisados, gerando então aminoácidos, ésteres de colesterol e colesterol livre (Figura 1). A síntese de membranas plasmáticas, ácidos biliares e hormônios esteroides acontecem com a participação do colesterol não esterificado resultante da hidrólise de LDL (JEON e BLACKLOW, 2005).

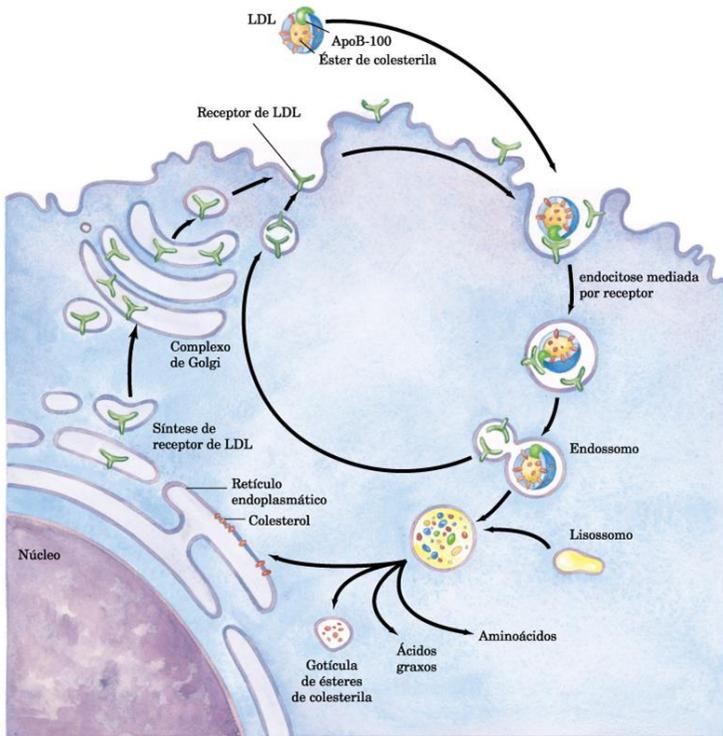


Figura 1. Diagrama representativo da via endocítica mediada pelo receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (adaptado de Nelson e Cox, 2011).

O metabolismo do colesterol periférico vem sendo estudado há décadas, enquanto que o papel do colesterol no sistema nervoso central (SNC) apenas virou alvo dos pesquisadores nos últimos anos (MULDER, 2009; PFRIEGER, 2003a;2003b;2003c; PFRIEGER e UNGERER, 2011). O colesterol cerebral é sintetizado localmente, uma vez que as lipoproteínas plasmáticas são incapazes de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) (DIETSCHY, 2009). A maior parte do colesterol cerebral no adulto está na mielina, portanto a síntese de colesterol neste sistema ocorre mais intensamente na fase de mielinização. A síntese continua após a mielinização, em níveis baixos, e ocorre principalmente nos astrócitos (BOYLES et al., 1985). Por sua vez, os neurônios captam o colesterol, que está associado a apolipoproteína E (apoE) e fosfolípidos, por meio de endocitose com a contribuição dos receptores membros da família de receptores da LDL – entre eles, o receptor de LDL (LAGACE, 2014).

O receptor de LDL é o protótipo de uma família de receptores, os quais são glicoproteínas transmembranares que ligam e internalizam diferentes tipos de ligantes extracelulares para a degradação em lisossomos. Também fazem parte desta família, o receptor da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), a proteína 1 relacionada ao receptor de LDL (LRP-1), o receptor 2 da apoE entre outros (LICAM e BU, 2001). Foi a partir de estudos sobre a hipercolesterolemia familiar, que os pesquisadores Michael Brown e Joseph Goldstein identificaram e caracterizaram o receptor para a LDL e decifram meticulosamente as etapas do metabolismo do colesterol e das lipoproteínas plasmáticas. Estes estudos renderam a estes pesquisadores americanos o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1985 (GOLDSTEIN E BROW, 2009).

1.1. HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

Aproximadamente 20 milhões de pessoas no mundo inteiro são portadoras da hipercolesterolemia familiar (HF) (WATTS et al., 2014), uma condição herdada geneticamente de forma autossômica codominante, isto é, os indivíduos heterozigotos também possuem manifestações clínicas, embora não tão graves quanto às dos indivíduos homozigotos (PEREIRA et al., 2012). A forma mais comum de HF ocorre devido mutações no gene que codifica o receptor de LDL. Os indivíduos com hipercolesterolemia familiar apresentam uma diminuição na função do receptor de LDL (Figura 2), causando insuficiente endocitose e remoção da LDL plasmática. Além disso, o fígado é estimulado a produzir mais colesterol. Juntos, estes fatores resultam em elevadas concentrações de LDL circulante, entre 155 a 500 mg/dL (quando heterozigoto) ou maiores que 500 mg/dL (quando homozigoto) (BROWN e GOLDSTEIN, 1984; VOGT, 2015).

Os xantomas tendinosos (acúmulo de colesterol subcutâneo na região dos tendões) e a doença arterial coronariana (DAC) prematura são algumas das manifestações clínicas desta condição genética (BOUHAIRIE e GOLDBERG, 2015). É importante destacar que as chances de indivíduos com HF na sua forma heterozigótica desenvolverem DAC é cerca de onze vezes maior quando comparados com indivíduos sem HF (MABUCHI et al., 1989; NAIR, SHARIFI e AL-RASADI, 2014). Sem tratamento, 75% dos homens com HF desenvolverão a DAC antes dos 60 anos (SIJBRANDS et al., 2000). O aparecimento da DAC ocorre geralmente em torno dos 40 e 45 anos em homens, e cerca de 10 anos mais tarde em mulheres com HF. Após os 70

anos de idade, estima-se que 100% dos pacientes com esta condição genética terão DAC (JANSEN et al., 2002). Além disto, cerca de 200 mil pessoas em todo o mundo morrem a cada ano de infartos precoces do miocárdio causados pela HF. Neste contexto, diversos estudos demonstram que a DAC é a principal causa de mortes entre os pacientes com HF (CIVEIRA, 2004).

RECEPTOR DE LDL

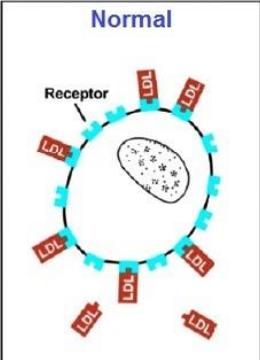
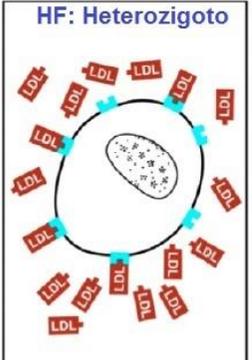
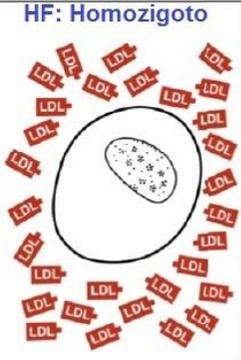
	Normal	HF: Heterozigoto	HF: Homozigoto
			
Níveis plasmáticos de LDL		↑ 2-3 vezes	↑ 8-10 vezes
Frequência populacional		1 em 500	1 em 10 ⁶
Idade de infarto agudo do miocárdio		35-65 anos	5-15 anos

Figura 2. O receptor de LDL na hipercolesterolemia familiar (adaptado de Nair, 2013).

Entretanto, desde o advento das estatinas na década de 70 (ENDO, 2008), novos tratamentos para a HF continuam a surgir, diminuindo a incidência dos eventos relacionados aos níveis plasmáticos elevados de LDL (AHN e CHOI, 2015). Com o avanço no tratamento da HF, o aumento na expectativa de vida das pessoas com esta condição é notável e alguns aspectos que não eram observados anteriormente, devido à alta mortalidade por doenças cardiovasculares, agora podem ser visualizados. Em 2010, um grupo de pesquisa espanhol demonstrou – através de um estudo clínico – que há uma proporção significativamente maior de indivíduos com HF que apresentam comprometimento cognitivo leve (CCL) em comparação com indivíduos sem HF (ZAMBON et al., 2010). Nesta mesma linha de evidência, o nosso grupo

e outros grupos de pesquisa demonstraram que camundongos nocautes para o receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$), bem como camundongos $LDLr^{-/-}/apoB100$ de “meia-idade” – modelos experimentais de hipercolesterolemia familiar – também apresentam características indicativas de CCL (MOREIRA et al., 2012; RAMIREZ et al., 2011). O CCL é caracterizado por perda de memória, atenção e funções cognitivas maior do que aquela esperada em relação à idade e ao nível escolar. Dessa forma, é considerado como uma fase intermediária antes do desenvolvimento de demência, ainda sem interferir significativamente nas atividades diárias do indivíduo (ESHKOOR et al., 2015).

1.2. MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

Ishibashi e colaboradores desenvolveram, em 1993, os camundongos $LDLr^{-/-}$ a partir da linhagem C57BL/6J. Estes animais representam um modelo amplamente utilizado de hipercolesterolemia familiar humana e, mesmo quando mantidos em uma dieta padrão, apresentam concentrações plasmáticas de colesterol duas a quatro vezes maiores que os camundongos selvagens (ISHIBASHI et al., 1993; ZADELAAR et al., 2007). Quando estes animais 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).

1.3. HIPERCOLESTEROLEMIA E DÉFICITS COGNITIVOS

Concomitantemente com o incremento na expectativa de vida, vem aumentando o número de pessoas acometidas por doenças relacionadas a idade, dentre elas está a demência (QUERFURTH e LAFERLA, 2010). A doença de Alzheimer é a principal e a mais estudada forma de demência (BARTUS et al., 1982). A grande maioria dos casos de doença de Alzheimer, bem como das demais formas de demência, são de etiologia desconhecida, resultantes da interação de fatores de risco genéticos e ambientais durante toda a vida, entre estes estão hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, fatores genéticos e tabagismo (QUERFURTH e LAFERLA, 2010).

A doença de Alzheimer, bem como a demência em geral, está primariamente associada a um substancial declínio no número de neurônios colinérgicos que se projetam, principalmente, do prosencéfalo basal para áreas corticais e formação hipocampal (GALLAGHER e

COLOMBO, 1995; MUFSON et al., 2003; SCHLIEBS e ARENDT, 2011; TIRABOSCHI et al., 2002). Esta diminuição de células colinérgicas está diretamente correlacionada com a evolução clínica destas neuropatologias, a qual é caracterizada por progressiva e incapacitante perda de memória e da capacidade de aprender, bem como prejuízo cognitivo severo (MCKHANN et al., 1984; VAN BEEK e CLAASSEN, 2011).

Evidências epidemiológicas e neuroquímicas suportam a associação entre alterações no metabolismo do colesterol e o aparecimento de prejuízos cognitivos (PANZA et al., 2006). Todavia, há controvérsias quanto aos mecanismos específicos por trás da relação entre o metabolismo de colesterol e a demência (PANZA et al., 2006). Os estudos epidemiológicos na sua maioria demonstram uma associação entre níveis elevados de colesterol plasmático na meia idade e uma maior suscetibilidade à doença de Alzheimer esporádica em idades mais avançadas (KIVIPELTO et al., 2002; NOTKOLA et al., 1998; TAN et al., 2003). Por outro lado, não há uma correlação significativa quando são avaliados os níveis de colesterol em pacientes idosos (BECKETT, NUNES e BULPITT, 2000).

Os estudos relacionando o desenvolvimento de declínio cognitivo com a hipercolesterolemia iniciaram nos anos 90, demonstrando que grande parte dos indivíduos que haviam falecido em decorrência de complicações ateroscleróticas também apresentavam características de doença de Alzheimer em seus cérebros (SPARKS et al., 1990; SPARKS et al., 1993). Em seguida, outro estudo demonstrou que quando indivíduos recebem tratamento para doenças cardiovasculares como terapias que reduzem os níveis de colesterol, apresentam uma menor prevalência da doença de Alzheimer e uma diminuição da deterioração cognitiva (SPARKS et al., 2005).

Inúmeras evidências experimentais corroboram estes dados epidemiológicos e clínicos reforçando o impacto dos níveis aumentados de colesterol plasmático sobre a função cognitiva (EVOLA et al., 2010; MULDER et al., 2004; THIRUMANGALAKUDI et al., 2008; ULLRICH, PIRCHL e HUMPEL, 2010; UMEDA et al., 2012; ZHOU et al., 1998). Evola e colaboradores (2010) observaram prejuízos de memória e aprendizado em um modelo de camundongos hipercolesterolêmicos, os camundongos nocautes para apoE (apoE^{-/-}) (EVOLA et al., 2010). Da mesma forma, utilizando camundongos LDLr^{-/-}, modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana, Mulder e colaboradores (2004) observaram prejuízos de memória em diferentes testes comportamentais. Além disso, os autores demonstraram

que camundongos LDLr^{-/-} adultos apresentam diminuição na proliferação celular e densidade sináptica hipocampal (MULDER et al., 2004; MULDER et al., 2007).

Nosso grupo de pesquisa também demonstrou prejuízo de memória e aprendizado em camundongos LDLr^{-/-} de três meses de idade, o que foi associado a uma situação de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial cerebral (DE OLIVEIRA et al., 2011). Ademais, indicamos os camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade” (quatorze meses) como um modelo animal de CCL. Observamos que o envelhecimento está relacionado a uma intensificação dos prejuízos cognitivos nos camundongos LDLr^{-/-}, que aos quatorze meses apresentaram prejuízos cognitivos em todos os testes realizados (testes de memória operacional, de referência espacial e procedural) (MOREIRA, et al., 2012). Estes prejuízos cognitivos nos camundongos LDLr^{-/-} de “meia-idade” foram associados com desbalanço antioxidante, dano oxidativo e aumento na atividade da AChE em regiões cerebrais associadas com os processos de aprendizado e memória, particularmente no córtex pré-frontal (MOREIRA et al., 2012). De maneira interessante, nós também demonstramos que os camundongos LDLr^{-/-} são mais susceptíveis a neurotoxicidade induzida pela injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de peptídeo β -amiloide (A β) (ferramenta experimental para o estudo da doença de Alzheimer). Em comparação com os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, os camundongos hipercolesterolêmicos apresentam maior ativação glial, dano de membrana celular, permeabilidade da BHE, desbalanço oxidativo e aumento na atividade da AChE no hipocampo após a administração do A β 1-40 (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Digno de nota, em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa também indicamos que o aumento na atividade da AChE cerebral parece ser um evento inicial associado aos prejuízos cognitivos induzidos pela hipercolesterolemia em camundongos Swiss (MOREIRA, et al., 2014). Nessa mesma linha de evidência, observaram-se prejuízos de memória em ratos tratados com uma dieta rica em colesterol, os quais foram associados com disfunção colinérgica caracterizada por redução no número de neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert e diminuição dos níveis de acetilcolina no córtex cerebral (ULLRICH et al., 2010). Portanto, o sistema colinérgico parece ser particularmente sensível a neurotoxicidade induzida pela hipercolesterolemia.

1.4. INIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASE

A enzima AChE está localizada nas sinapses colinérgicas e é responsável por regular esta neurotransmissão através da hidrólise da acetilcolina em colina e acetato (CHEUNG et al., 2014; QUINN, 1987). A AChE encontra-se ligada à membrana plasmática do neurônio pós-sináptico, mas projeta-se pela sinapse. Esta enzima atua quando a acetilcolina é liberada do neurônio pré-sináptico em resposta a um potencial de ação. A acetilcolina passa pela fenda sináptica e se liga ao receptor (nicotínico ou muscarínico) do neurônio pós-sináptico. Após uma série de eventos, os quais resultam na ativação de um potencial de ação no neurônio pós-sináptico, a AChE rapidamente acaba com a ligação acetilcolina-receptor pela hidrólise deste neurotransmissor (Figura 3) (QUINN, 1987). A AChE encontra-se predominantemente no cérebro, músculo estriado e eritrócitos (DOOLEY e LAMB, 2000; SUGIMOTO et al., 2002).

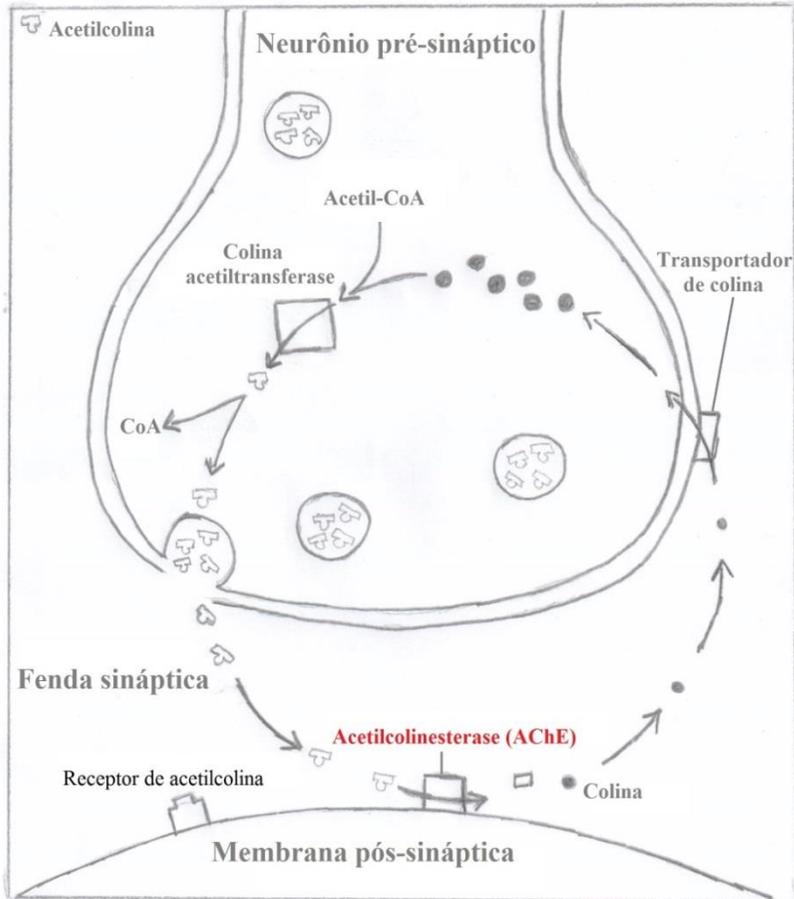


Figura 3. Neurotransmissão colinérgica (adaptado de CNSforum©). A AChE, presente na membrana pós-sináptica, degrada a acetilcolina liberada pelo neurônio pré-sináptico.

A hipótese colinérgica da doença de Alzheimer surgiu na tentativa, principalmente, do desenvolvimento de possíveis tratamentos (BARTUS et al., 1982). A abordagem que até hoje corresponde a principal forma de tratamento para os indivíduos com a doença de Alzheimer, conta com a utilização de inibidores da enzima AChE. Na Tabela 1 estão listados os principais inibidores de AChE. Como pode ser observado, o primeiro inibidor – denominado tacrina – foi comercializado a partir de 1993, mas já não é tão utilizado atualmente

por causar vários efeitos colaterais, incluindo hepatotoxicidade (MINARINI et al., 2013).

Tabela I. Características gerais dos inibidores das colinesterases (adaptado de Forlenza, 2005).

	Tacrina	Donepezil	Rivastigmina	Galantamina
Disponível no ano	1993	1997	1998	2000
Classe química	Acridina	Piperidina	Carbamato	Alcalóide fenantreno
Seletividade cerebral	Não	Sim	Sim	Sim
Tipo de inibição da colinesterase	Reversível	Reversível	Pseudo-irreversível	Reversível
Enzimas Inibidas	AChE e BuChE*	AChE	AChE e BuChE*	AChE

*A butirilcolinesterase (BuChE) é uma enzima também capaz de degradar a acetilcolina. Entretanto, ela não é prevalente no sistema nervoso central (SNC), sendo encontrada principalmente no músculo cardíaco e liso. No SNC a BuChE está localizada extrasinapticamente (DOOLEY e LAMB, 2000; SUGIMOTO et al., 2002).

O donepezil (cloridrato de donepezila) ficou disponível a partir de 1997. Desde sua aprovação, outros dois inibidores da AChE, a rivastigmina e a galantamina, em 1998 e 2000 respectivamente, também começaram a ser utilizados no tratamento da doença de Alzheimer (JACKSON, HAM e WILKINSON, 2004). Embora existam inúmeras publicações criticando a utilização dos inibidores da AChE, alegando baixa eficácia (EMRE, 2002; GAUTHIER et al., 2003), diversos ensaios clínicos vêm demonstrando benefícios para os pacientes com a doença Alzheimer. Dentre os efeitos benéficos estão a redução os sintomas comportamentais e cognitivos em longo prazo e o aumento da qualidade de vida (SHIMIZU et al., 2015; SUGIMOTO et al., 2002). Estudos clínicos mostraram que pacientes tratados com donepezil ou rivastigmina melhoram significativamente em testes cognitivos quando comparados com pacientes que foram tratados com galantamina (HANSEN et al., 2008; SHIMIZU et al., 2015).

O donepezil (Figura 3), conhecido pelo nome comercial Aricept®, é uma molécula do tipo piperidina, contendo uma indanona e uma N-benzilpiperidina. Ele possui uma ação mais prolongada e seletiva para a AChE, quando comparado com outros inibidores (DOOLEY e LAMB, 2000). A inibição do donepezil é principalmente não-competitiva e reversível (SUGIMOTO et al., 2002).

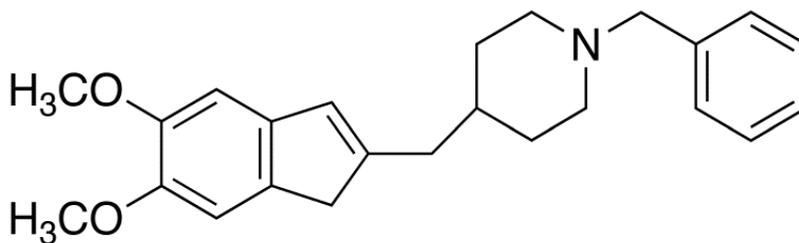


Figura 4. Estrutura química do donepezil (adaptado de Sugimoto et al., 2002).

Como demonstrado na Tabela II, inúmeros estudos experimentais vêm apontando a eficácia do tratamento com o donepezil em paradigmas comportamentais de memória e aprendizado em roedores. Em um estudo pré-clínico, Saxena e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos tratados com estreptozotocina injetada intracerebralmente (i.c.) – uma abordagem experimental para o estudo de demência – apresentam dano cognitivo, bem como níveis diminuídos de glutathiona (GSH) e um aumento na atividade da enzima AChE. O tratamento destes camundongos com o donepezil foi capaz de reverter o déficit cognitivo, o estresse oxidativo e a disfunção colinérgica induzidos pela exposição a estreptozotocina (SAXENA et al., 2008). Estes resultados apontam o donepezil também como um possível modulador de vias antioxidantes celulares, demonstrando que existem outros mecanismos pelos quais esta molécula pode atuar ao nível cerebral.

Tabela II. Evidências pré-clínicas demonstrando a eficácia do donepezil em reverter déficits cognitivos.

Animais	Testes	Dose (mg/kg)	Dias	Autores/Ano
Camundongos <i>Swiss</i> , injetados com A β ₂₅₋₃₅ (via i.c.v.)	Alternância espontânea e Esquiva passiva	0,5 e 1 (i.p.)	Pré-tratamento (1 dia); Tratamento pós A β (6 dias)	Meunier et al. 2006
Camundongos ICR, injetados com A β ₂₅₋₃₅ (via i.c.v)	Alternância espontânea e Medo condicionado	0,1 (s.c.)	3 dias	Tsunekawa et al. 2008
Camundongos <i>Swiss</i> injetados com escopolamina (via i.p.)	Esquiva passiva	5 (oral)	1 dia	Agrawal et al. 2008
Camundongos <i>Swiss</i> injetados com estreptozotocina (via i.c.)	Esquiva passiva e Labirinto aquático de Morris	5 (oral)	21 dias	Saxena et al. 2008
Camundongos C57BL/6J injetados com escopolamina (via i.p.)	Sociabilidade e memória social	1 (s.c.)	1 dia	Riedel et al. 2009
Camundongos APP/PS1	Labirinto aquático de Morris	1 (s.c.)	14 dias	Easton et al. 2013
Camundongos APP/PS1	Reconhecimento do objeto e Labirinto aquático de Morris	2 (oral)	4 semanas	Guo et al. 2015

Via i.c.v. = via intracerebroventricular; via i.p. = via intraperitoneal; via i.c. = via intracerebral; via s.c. = via subcutâneo. Camundongos ICR são da linhagem de camundongos albinos e a sigla é em referência ao Institute of Cancer Research nos EUA. Camundongos APP/PS1 são duplo transgênico que expressam a proteína precursora amiloide (APP) e a presenilina 1 (PS1) humana mutada, sendo utilizados como modelo de doença de Alzheimer.

Neste contexto, nós acreditamos que o tratamento com o donepezil poderia funcionar como uma interessante ferramenta farmacológica na determinação de uma possível conexão entre a disfunção do sistema colinérgico e o desenvolvimento de déficit cognitivo induzido pela HF.

2. JUSTIFICATIVA

A HF, caracterizada pela exposição desde o nascimento a níveis elevados de colesterol plasmático, possui grande importância epidemiológica, principalmente devido a elevada morbidade e mortalidade decorrentes de doenças cardiovasculares. Além disso, recentemente esta doença vem sendo associada ao aumento na incidência de prejuízos cognitivos. A HF é a doença monogênica mais comum. Na sua forma heterozigótica, aparece com frequência populacional de 1:200 a 1:500 indivíduos e, mais raramente, na sua forma homozigótica com uma frequência de 1:300.000 a 1:1.000.000 indivíduos (JANNES et al., 2015). De fato, há décadas estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais vêm associando a hipercolesterolemia à doença de Alzheimer e à demência em geral. Dessa forma, torna-se importante o estudo dos mecanismos que associam as alterações do metabolismo do colesterol e o desenvolvimento de prejuízos cognitivos.

Com o aumento da expectativa de vida e o conseqüente aumento do número de pessoas com mais de 65 anos, os problemas relacionados à memória e cognição vêm atraindo a atenção de diversos pesquisadores. A patologia mais comumente relacionada aos déficits cognitivos é a doença de Alzheimer, a qual ainda não possui um tratamento efetivo. Todavia, a hipótese colinérgica da doença de Alzheimer é uma das únicas que direcionou a terapia desta doença, ainda que de forma paliativa. Aproximadamente 36 milhões de pessoas em todo o mundo manifestam a doença de Alzheimer, e em decorrência do aumento na expectativa de vida, é esperado que a prevalência global aumente para 115 milhões de pessoas em 2050 (QUERFURTH e LAFERLA, 2010; WISNIEWSKI e GONI, 2014).

Até o presente momento é possível ressaltar dois mecanismos que parecem correlacionar a hipercolesterolemia e o desenvolvimento de déficits de memória: i) o estresse oxidativo e ii) as alterações no sistema colinérgico. **Além disso, se um inibidor da enzima acetilcolinesterase é capaz de reverter déficits cognitivos em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, pode-se indicar esta classe de fármaco para o tratamento do comprometimento cognitivo leve observado em indivíduos com hipercolesterolemia familiar.**

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento com o donepezil sobre os prejuízos de memória observados em camundongos LDLr^{-/-}.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se há uma curva concentração-dependente inibitória de atividade da AChE, nas diferentes concentrações de donepezil, em homogenatos de cérebros de camundongos C57BL/6;
- Verificar se os déficits de memória e aprendizagem, observados nos camundongos LDLr^{-/-}, são revertidos pelo tratamento com o donepezil;
- Avaliar o efeito do tratamento subcrônico de camundongos LDLr^{-/-} com donepezil sobre a atividade da AChE cerebral;
- Avaliar o efeito do tratamento subcrônico de camundongos LDLr^{-/-} com o donepezil na atividade das enzimas antioxidantes cerebrais pertencentes ao sistema antioxidante da GSH.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) machos com três meses de idade. Estes camundongos foram alojados em caixas plásticas no Biotério de Experimentação Animal BIO054, mantidos em temperatura ambiente controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam ração para roedores e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas previstas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC, Protocolo PP00948).

4.2. CLORIDRATO DE DONEPEZILA

O cloridrato de donepezila (Ranbaxy Farmacêutica Ltda.), adquirido na forma de comprimido de 10 mg (equivalente a 9,12 mg de donepezila), foi macerado com gral e pistilo de porcelana e diluído em salina (NaCl 0,9%). A solução foi então filtrada para remoção de excipientes. A dose utilizada no tratamento foi de 3 mg/kg de peso corporal, administrada pela via intraperitoneal (i.p.).

4.3. DESENHOS EXPERIMENTAIS

4.3.1. Experimento *in vitro*

Avaliou-se a ação inibitória do donepezil sobre a atividade da AChE em homogenatos de cérebro total de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem machos adultos incubados com diferentes concentrações de donepezil: 0,01nM; 0,1nM; 1nM e 10nM. Ao todo, dois experimentos independentes foram realizados, utilizando um número amostral de 5 animais por experimento.

4.3.2. Experimento *in vivo*

O objetivo do experimento *in vivo* foi de avaliar os efeitos do donepezil sob a cognição dos camundongos LDLr^{-/-}, bem como a relação destes efeitos com a atividade da AChE e parâmetros de estresse oxidativo. Como esquematizado na Figura 4, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de 3 meses de idade machos foram tratados

diariamente, durante 21 dias, pela via i.p. com o donepezil (3mg/kg) ou com a solução veículo (salina), totalizando quatro grupos experimentais. Ao final de quinze dias de tratamento, grupos independentes de animais foram submetidos aos testes comportamentais: i) campo aberto (por três dias), ii) reconhecimento do objeto, iii) realocação do objeto e iv) alternância espontânea. Após a realização dos testes comportamentais, no 21º dia, os animais foram anestesiados (xilazina 10mg/kg e quetamina 100 mg/kg, via i.p.) e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis plasmáticos de colesterol total e de triglicerídeos. Então, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para posterior dissecação do córtex pré-frontal e do hipocampo. A determinação da atividade da AChE, da atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx) foram realizados a partir das amostras dissecadas.

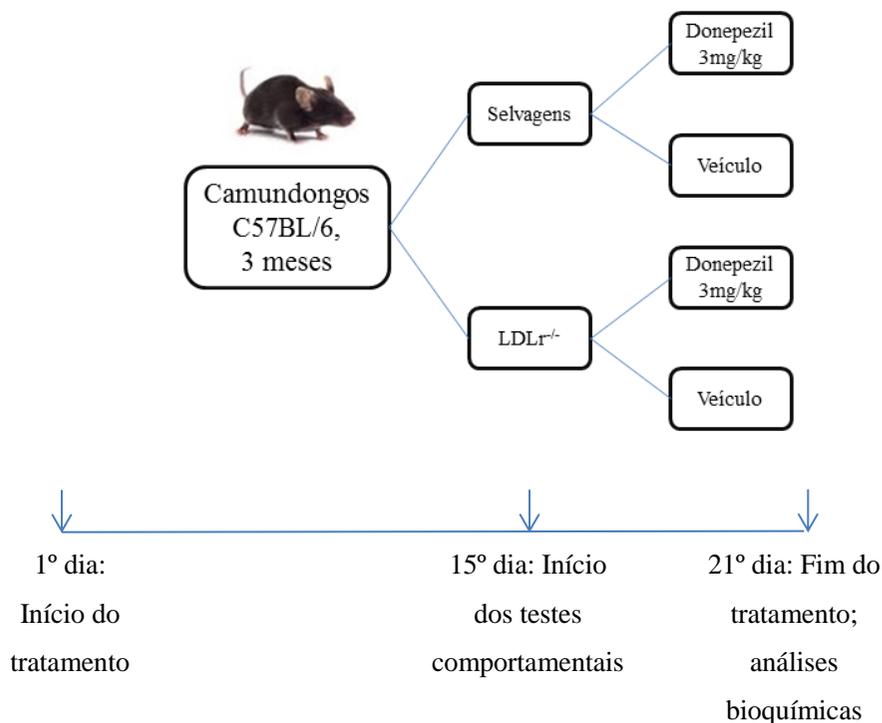


Figura 5. Desenho experimental *in vivo*. Os animais C57BL/6 foram separados em dois grupos, onde metade recebeu cloridrato de donepezila (donepezil) 3 mg/kg via intraperitoneal (i.p.) e a outra metade recebeu solução veículo (salina) via i.p.; a mesma divisão foi realizada com os camundongos LDLr^{-/-}. Totalizando 21 dias de tratamento diário. Grupos independentes de animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais (campo aberto, reconhecimento do objeto, realocação do objeto e alternância espontânea) do 15º ao 20º dia, sendo então sacrificados no 21º dia para posteriores análises bioquímicas (perfil lipídico, atividade da AChE e enzimas antioxidantes).

4.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1. Teste do campo aberto

Para investigar a atividade locomotora dos animais, o teste do campo aberto foi realizado (PRUT e BELZUNG, 2003). Empregou-se

um aparelho feito de acrílico transparente, com um assoalho cinza, dividido por linhas pretas em 25 quadrados (10 x 10 cm) e cercado por paredes de 40 cm de altura. O teste, feito com cada camundongo individualmente, começa quando se posiciona o animal no centro do campo aberto. O número total de cruzamentos – isto é, todas as vezes que o animal passava de um quadrante para o outro com as quatro patas – foi registrado por 5 minutos. Este teste foi realizado em três dias consecutivos.

4.4.2. Teste do reconhecimento do objeto

Com o intuito de avaliar um tipo de memória dependente do hipocampo, realizou-se o teste de reconhecimento do objeto (AINGE et al., 2006). Durante os três dias anteriores ao início deste teste, os animais foram habituados ao campo aberto (5 minutos/dia). Na primeira fase, chamada de sessão treino, os animais foram familiarizados com dois objetos idênticos, durante 5 minutos e o tempo de exploração de cada objeto foi registrado. Imediatamente após o treino, os animais foram levados de volta às suas respectivas gaiolas. Passados 60 minutos após o treino, os camundongos foram postos novamente no campo aberto, que desta vez incluía um objeto diferente no lugar de um dos objetos anteriormente expostos, ao mesmo tempo em que um dos objetos antigos continuava lá. Esta segunda etapa é chamada de sessão teste. Da mesma forma, o tempo de exploração de cada objeto foi registrado durante 5 minutos. Os objetos utilizados apresentavam nível de complexidade física, nível exploratório e tamanho similares. Como exploração do objeto, foram considerados os seguintes comportamentos: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. O índice de discriminação foi calculado da seguinte maneira:
$$\left[\frac{\text{tempo}_{(\text{segundos})} \text{ Objeto}_{\text{Novo}}}{\text{tempo}_{(\text{segundos})} \text{ Objeto}_{\text{Novo}} + \text{tempo}_{(\text{segundos})} \text{ Objeto}_{\text{Antigo}}} \right] \times 100$$
, i.e., é a razão entre o tempo que o animal passou explorando o objeto novo em relação ao tempo total de exploração.

4.4.3 Teste da realocação do objeto

A memória espacial dos camundongos foi avaliada no teste de realocação de objeto. Este teste, baseado na tendência espontânea de roedores, previamente expostos a dois objetos idênticos, a posteriormente, explorar um dos objetos (realocado para uma nova localização espacial) por um tempo maior que o

objeto não deslocado, tem sido utilizado na avaliação de memórias dependentes do hipocampo (ASSINI, DUZZIONI e TAKAHASHI, 2009; FERGUSON e SAPOLSKY, 2007). Novamente, o aparelho utilizado para o teste foi o campo aberto. Os animais foram habituados previamente no campo aberto durante os três dias anteriores ao início deste teste (5 minutos/dia). Na sessão treino, os dois objetos idênticos eram apresentados aos animais. Neste momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa, durante 5 minutos. Depois do treino os animais retornavam às suas gaiolas e aguardavam até o momento do teste, 180 minutos após o treino. No momento do teste, porém, um dos objetos era colocado em uma nova posição no campo aberto. Neste momento registrava-se, novamente, o tempo de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Este tempo de exploração dos objetos foi utilizado para o cálculo do índice de localização de objetos, o qual foi utilizado como parâmetro de memória (ASSINI, DUZZIONI E TAKAMOSHI, 2009). Índice de localização:
$$\left[\frac{\text{tempo}_{(\text{segundos})} \text{ Objeto}_{\text{deslocado}} \times 100}{\text{tempo}_{(\text{segundos})} \text{ Objeto}_{\text{deslocado}} + \text{tempo}_{(\text{segundos})} \text{ Objeto}_{\text{não-deslocado}}} \right]$$
, i.e., é a razão entre o tempo que o animal passou explorando o objeto deslocado em relação ao tempo total de exploração.

4.4.4. Teste de alternância espontânea

Para avaliar a memória operacional dos camundongos, utilizou-se o teste de alternância espontânea, no labirinto em “T”. Feito de acrílico transparente preto, o aparato experimental contém um braço central e dois braços laterais em um ângulo de 90° em relação ao braço central. As paredes possuem 30 cm de altura, enquanto que os braços têm 10 cm de largura. Os animais devem escolher entre os braços e a alternância espontânea acontece quando o camundongo escolhe o braço que não foi selecionado anteriormente (SPOWART-MANNING e VAN DER STAAY, 2004). A sessão treino – primeira sessão – foi quando os camundongos eram forçados a escolher um braço específico (por exemplo, o braço esquerdo), pois o outro se encontrava trancado. Após a exploração do braço esquerdo, normalmente o animal volta à posição inicial, onde fica preso por cerca de 5 segundos, enquanto

o bloqueio do braço direito é removido. Então, inicia-se a sessão de treinos livres, que é quando os animais estão livres para escolher entre os braços laterais. Quando o camundongo entrava em um braço, o outro era bloqueado. Ao voltar para o braço central, o animal era retido por mais 5 segundos e depois iniciava-se uma nova sessão. Após 14 treinos livres ou 15 minutos, o teste acabava. As escolhas entre braço direito (D) ou braço esquerdo (E) eram anotadas para o cálculo posterior de porcentagem de alternâncias, da seguinte forma: Alternâncias (%) = $100 * (\text{n}^\circ \text{ de alternâncias} / \text{n}^\circ \text{ total de treinos livres})$.

4.5. DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO

Os níveis de colesterol total e triglicerídeos foram determinados em plasma a partir de Kits comerciais (Gold Analisa Diagnóstica Ltda), seguindo as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.6. PREPARAÇÃO TECIDUAL PARA AS ANÁLISES BIOQUÍMICAS

No experimento *in vitro* – avaliação da ação inibitória do donepezil sobre a atividade da AChE - os animais C57BL/6 selvagens foram eutanasiados por deslocamento cervical e, posteriormente, foram dissecados os cérebros totais. Os cérebros foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (TFK) 0,25 M, pH 8,0 (1: 15 m/v) e centrifugados a 3000g e a 4°C, durante 5 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes (190µl) foram incubados com donepezil (10µl) nas diferentes concentrações: 0,01 nM; 0,1 nM; 1 nM; 10 nM, ou com água destilada (controle). A incubação ocorreu por trinta minutos, à temperatura ambiente e então a atividade da AChE foi determinada.

No experimento *in vivo*- avaliação do efeito do donepezil sobre parâmetros cognitivos e bioquímicos - os animais pertencentes aos 4 grupos experimentais identificados na Figura 4 foram eutanasiados e os tecidos cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) homogeneizados (1: 10 m/v) em tampão HEPES 20 mM (pH 7,0). Em seguida os homogenatos foram centrifugados a 3.000 g a 4° C durante 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 a 4° C por 20

minutos e o sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas GR e GPx.

4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE

A atividade da enzima AChE foi determinada seguindo o método de Ellman (ELLMAN et al., 1961). Este método baseia-se na taxa de hidrólise do iodeto de acetiltiocolina, que é medida em 412 nm. Primeiramente, mediu-se a atividade basal durante 5 minutos à 37°C, adicionando à amostra um meio de reação composto por TFK 0,25 M (pH 8,0), DTNB 5 mM (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) e água destilada. Imediatamente após a primeira leitura, adicionou-se o substrato iodeto de acetiltiocolina (ACTI) 7,25 mM, para medir, então, a hidrólise do substrato a partir da liberação do tiol tiocolina, que produz um composto formador de cor – TNB (ácido-2-nitro-5-tiobenzoico) – após a reação com DTNB. 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.

No experimento *in vitro*, os dados foram expressos como porcentagem de inibição em comparação ao controle, seguindo a fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - (X = 100 * [donepezil] / \text{controle})$$

Onde:

X equivale ao valor da atividade (em porcentagem) em comparação ao controle;

[donepezil] é o valor da atividade das amostras incubadas com diferentes concentrações de donepezil, expressa em nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína; e

controle é o valor da atividade da amostra controle expressa em nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína.

Os dados do experimento *in vivo* foram expressos como nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína.

4.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A GR é responsável pela redução da glutathiona oxidada (GSSG). Quando utiliza o substrato GSSG, a GR leva ao consumo de NADPH, que é medido a 340 nm (CARLBERG e MANNERVIK,

1985). O meio de reação é composto por TFK 0,25 M (pH 7,0), 1 mM de EDTA e NADPH 0,2 mM. Primeiramente, o consumo inespecífico de NADPH foi mensurado, após a adição de amostra, por 5 minutos a 340 nm. Em seguida, a leitura foi realizada por mais 5 minutos após o acréscimo do substrato GSSG 1 mM. 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 enzima GPx catalisa a redução de H_2O_2 , bem como de peróxidos orgânicos e lipoperóxidos, produzindo GSSG a partir de GSH. A GR reduz a GSSG, consumindo NADPH. Neste ensaio, o meio de reação contém TFK 0,25 M (pH 7,0), 1 mM de EDTA, GSH 100 mM, GR 5 U/mL e NADPH 0,1 mM. Após a adição da amostra foi medido o consumo inespecífico de NADPH através de uma leitura a 340 nm, por 5 minutos. A leitura foi realizada por mais 5 minutos após adição do substrato (1 mM peróxido de ter-butila). Descontou-se o consumo inespecífico de NADPH ao decréscimo de absorbância por minuto. Assim, o valor obtido foi novamente dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH e multiplicado pelas diluições. Os dados foram expressos como nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos no teste comportamental de campo aberto, bem como nas determinações de perfil lipídico e nas atividades das enzimas foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, com o teste de Duncan *post hoc*, quando apropriado. Os resultados são considerados significativos para $p \leq 0,05$. Os dados da atividade da AChE, obtidos do experimento *in vitro*, foram avaliados pelo software Graph-Pad Prism, versão 5.03, a partir da análise da dose-resposta inibitória não linear, pela qual também encontrou-se o valor referente ao IC_{50} da curva. Já os resultados dos testes comportamentais de reconhecimento do objeto, realocação do objeto e de alternância espontânea foram analisados utilizando o teste *t* de Student, comparando-se os dados a um valor teórico de 50% (nível de chance). Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM O DONEPEZIL NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE *IN VITRO*

Estudos prévios apontaram o donepezil como um potente inibidor seletivo da enzima AChE, com um IC_{50} de 6,7 nM em cérebro de ratos *in vitro* (OGURA et al., 2000). Para obtermos uma curva concentração-dependente de inibição da AChE cerebral pelo donepezil, realizamos um protocolo *in vitro*, onde os homogenatos de cérebros de camundongos C57BL/6 foram incubados com diferentes concentrações de donepezil: 0,01 nM; 0,1 nM; 1 nM e 10 nM. A máxima concentração utilizada, 10 nM foi capaz de inibir completamente a atividade da enzima AChE. O valor de IC_{50} calculado a partir da curva inibitória foi de 0,14 nM, indicando uma potência alta do donepezil em relação à inibição desta enzima (Figura 6).

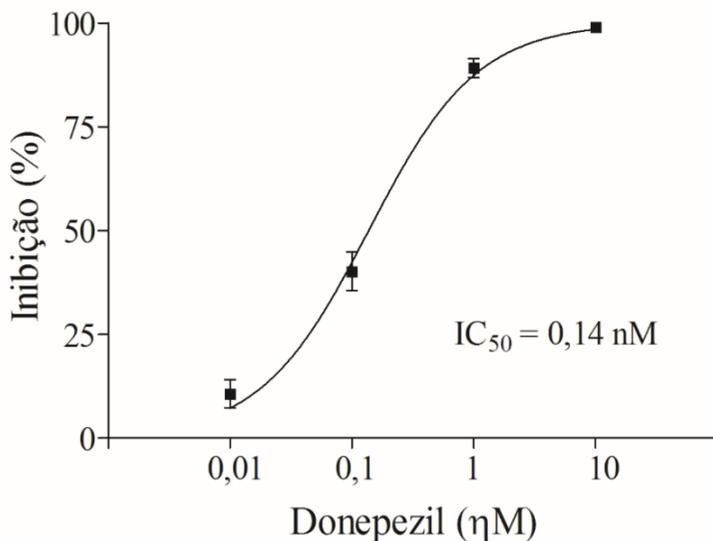


Figura 6. Efeito inibitório do donepezil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) *in vitro* em homogenato de cérebro total de camundongos C57BL/6. Os dados estão expressos em média de porcentagem de inibição \pm erro padrão da média ($n = 5$). O donepezil inibiu a atividade da AChE com IC_{50} de 0,14 nM (*Software* Graph-Pad Prism versão 5.03; análise da dose-resposta inibitória não linear).

5.2. O TRATAMENTO COM O DONEPEZIL REVERTE A HIPERLOCOMOÇÃO E OS PREJUÍZOS DE MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS LDLR^{-/-}

Elder e colaboradores (2008) observaram que os camundongos LDLR^{-/-} possuem atividade locomotora aumentada quando comparados com os camundongos selvagens (ELDER et al., 2008). Neste estudo, a atividade locomotora espontânea dos camundongos foi avaliada no teste do campo aberto, realizado por três dias consecutivos. Os animais LDLR^{-/-} tratados com veículo apresentaram um número de cruzamentos totais no campo aberto significativamente maior quando comparados com camundongos C57BL/6 selvagens também tratados com veículo nos 3 dias do teste de campo aberto, não apresentando um perfil de habituação (Figura 7). O tratamento com o donepezil foi capaz de reverter a hiperlocomção nos camundongos LDLR^{-/-}. Os camundongos hipercolesterolêmicos quando tratados com o donepezil apresentaram

um número de cruzamentos totais significativamente menor em comparação aos camundongos LDLr^{-/-} tratados com veículo (Figura 7). É importante mencionar, que o número de cruzamentos totais apresentados pelos camundongos selvagens, independentemente do tratamento, e pelos animais LDLr^{-/-} tratados com donepezil, diminui conforme os dias de testes (i.e., apresentam perfil de habituação) (Figura 7D).

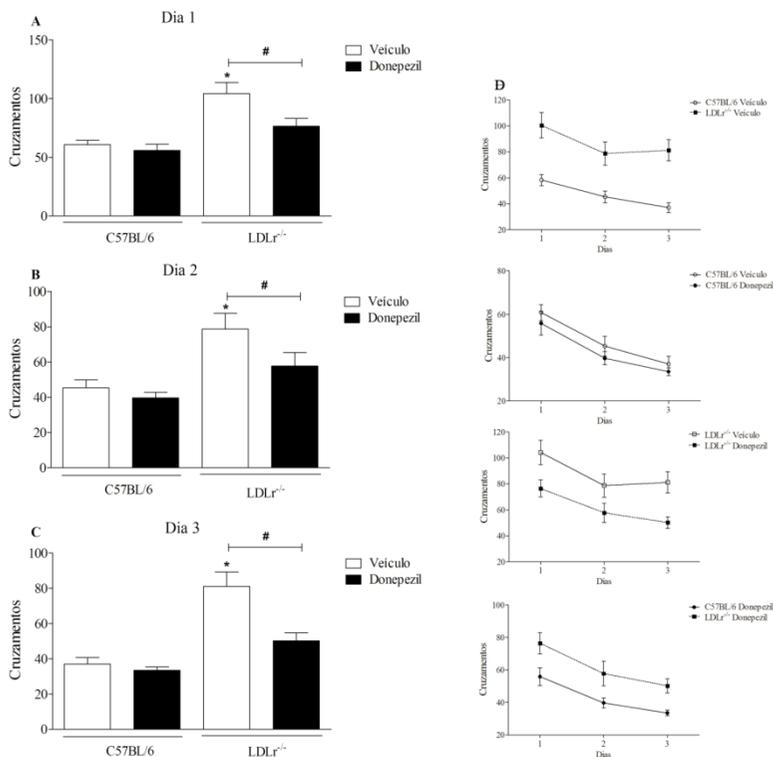


Figura 7. Efeito do tratamento com donepezil sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. (A) Campo aberto dia 1, (B) Campo aberto dia 2, (C) Campo aberto dia 3 e (D) Curva de habituação no campo aberto durante os três dias. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (8 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. *p<0,05 versus camundongos selvagens tratados com veículo, #p<0,05 versus camundongos LDLr^{-/-} tratados com veículo.

Posteriormente, a memória espacial de referência foi avaliada por meio do teste de reconhecimento do objeto. Como mostrado na Figura 8A, os camundongos C57BL/6 (independentemente do tratamento) exploraram o objeto novo por um período de tempo significativamente maior, como indicado pelo aumento significativo no índice de reconhecimento em comparação com um valor teórico de 50% (Figura 8A). Por outro lado, os camundongos LDLr^{-/-} tratados com veículo não exploraram o objeto novo por mais tempo que o objeto velho, caracterizando prejuízo cognitivo. O tratamento com o donepezil reverteu o dano de memória espacial de referência apresentado pelos animais LDLr^{-/-} (Figura 8A). De forma similar, o teste de realocação do objeto foi utilizado para avaliar também a memória espacial de referência. Novamente, os camundongos LDLr^{-/-} tratados com veículo apresentaram prejuízo de memória espacial, enquanto que o tratamento com donepezil reverteu este prejuízo (Figura 8B).

A memória operacional dos animais foi avaliada por meio do teste de alternância espontânea realizado no labirinto em T. Os camundongos LDLr^{-/-} tratados com veículo apresentaram índices de alternâncias espontâneas similares ao valor teórico de 50%, o que caracteriza prejuízo de memória operacional. Já os camundongos C57BL/6 (independente do tratamento) e os camundongos LDLr^{-/-} tratados com donepezil não apresentaram dano cognitivo neste teste comportamental, uma vez que seus índices de alternâncias espontâneas foram significativamente maiores que 50% (Figura 8C). O tratamento não causou diferenças no desempenho dos animais C57BL/6 do tipo selvagem em nenhum dos testes comportamentais realizados.

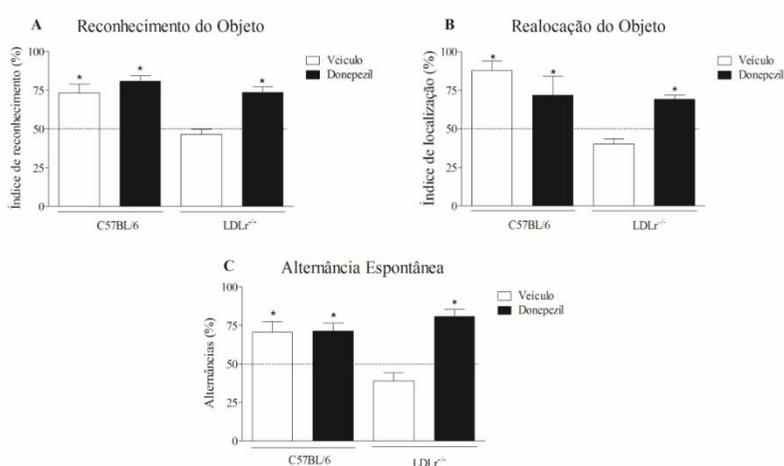


Figura 8. Efeitos do tratamento com donepezil sobre a memória de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}. (A) teste de reconhecimento do objeto, (B) teste de realocação do objeto e (C) teste de alternância espontânea. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (8 animais/grupo). O teste *t* foi utilizado para a análise dos dados, para determinar se o índice de reconhecimento, de localização e de alternância diferiam significativamente de um valor teórico de 50% (i.e., nível de chance). * $p < 0,05$ versus 50%.

5.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM O DONEPEZIL NO PERFIL LIPÍDICO DOS ANIMAIS

Os níveis de colesterol plasmático total e de triglicerídeos dos camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-} estão demonstrados na Figura 9. Os níveis de colesterol total dos camundongos LDLr^{-/-}, independentemente do tratamento, foram significativamente maiores quando comparados com os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (Figura 9A). Por outro lado, os níveis de triglicerídeos nos camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr^{-/-} não diferiram significativamente entre os grupos (Figura 9B).

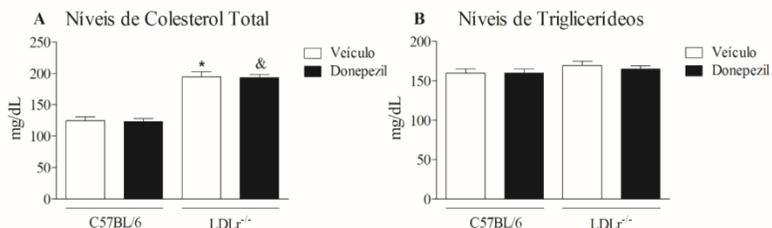


Figura 9. Perfil lipídico dos camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr^{-/-}. (A) Colesterol total e (B) Triglicerídeos. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (8 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. * $p < 0,05$ em comparação com os camundongos C57BL/6 tratados com veículo e & $p < 0,05$ em comparação com os camundongos C57BL/6 tratados com donepezil.

5.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM O DONEPEZIL NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE NO CÉREBRO DOS CAMUNDONGOS

Levando em consideração que o fármaco utilizado neste experimento é um inibidor da AChE e, que previamente nosso grupo de pesquisa observou um aumento na atividade desta enzima no córtex pré-frontal dos camundongos LDLr^{-/-} (MOREIRA et al., 2012), nós avaliamos a atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos. Não foram observadas diferenças significativas na atividade da AChE entre os grupos experimentais, tanto no córtex pré-frontal (Figura 10A) quanto no hipocampo (Figura 10B).

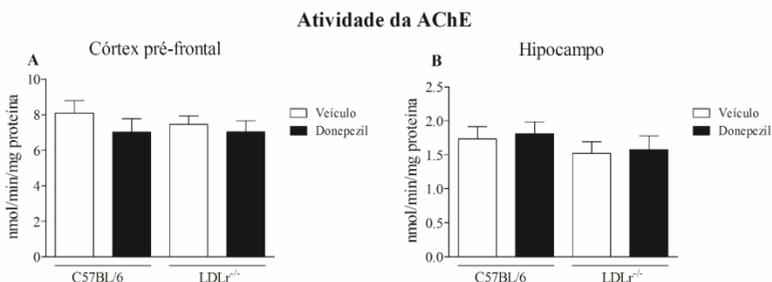


Figura 10. Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr^{-/-}. (A) CórteX pré-frontal e (B) hipocampo. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (8 animais/grupo).

5.5. EFEITO DO TRATAMENTO COM O DONEPEZIL NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES DO SISTEMA DA GLUTATIONA NO CÉREBRO DOS CAMUNDONGOS

A GSH desempenha papel fundamental na proteção celular contra o estresse oxidativo, principalmente no SNC (DRINGEN e HIRRLINGER, 2003). Levando isso em consideração, nós investigamos a atividade da GPx e GR – enzimas vinculadas ao sistema da GSH – no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos. De maneira geral, não houve diferença significativa nas atividades das enzimas pertencentes ao sistema da GSH nos diferentes grupos experimentais (Figura 11). Observamos somente um aumento na atividade da enzima GR no córtex pré-frontal dos camundongos LDLr^{-/-} tratados com veículo em comparação aos C57BL/6 do tipo selvagem também tratados com veículo (Figura 11B). Além disso, a atividade desta enzima também estava aumentada nos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com donepezil em comparação aos tratados com veículo (Figura 11B).

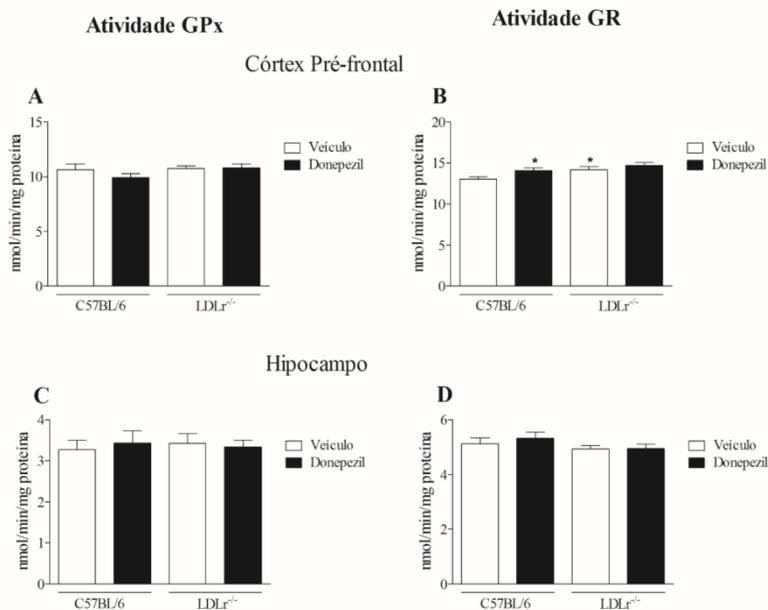


Figura 11. Determinação da atividade das enzimas vinculadas ao sistema antioxidante da glutatona (GSH), em camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr^{-/-}. (A) Atividade da glutatona peroxidase (GPx) em córtex pré-frontal, (B) atividade da glutatona redutase (GR) em córtex pré-frontal, (C) atividade da GPx em hipocampo e (D) atividade da GR em hipocampo. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (8 animais/grupo). * $p < 0,05$ em comparação com os camundongos C57BL/6 tratados com veículo

6. DISCUSSÃO

A relação entre alterações nos níveis de colesterol plasmático e o aparecimento de declínio cognitivo vem despertando a atenção da comunidade científica nas últimas décadas (KIVIPELTO et al., 2002; SPARKS et al., 2005). Neste sentido, a HF surge como uma condição que propicia uma observação única sobre a associação entre a hipercolesterolemia e o desenvolvimento de prejuízos cognitivos, uma vez que os indivíduos com esta condição apresentam elevados níveis de colesterol no plasma desde o nascimento (BROWN e GOLDSTEIN, 1974;1986). De grande importância, um estudo clínico demonstrou que indivíduos com HF de meia-idade apresentam uma maior incidência de CCL em comparação com indivíduos sem esta condição genética (ZAMBON et al., 2010).

Neste contexto, os estudos pré-clínicos vêm demonstrando déficits cognitivos em camundongos LDLr^{-/-}, modelo experimental de HF, de três, cinco e quatorze meses, utilizando diversos testes de memória operacional e espacial de referência, incluindo o labirinto aquático de Morris (MOREIRA et al., 2012; MULDER et al., 2004), o labirinto aquático radial (THIRUMANGALAKUDI et al., 2008), o alternância espontânea (DE OLIVEIRA et al., 2014; MULDER et al., 2004) e o realocação do objeto (DE OLIVEIRA et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2014). No presente estudo, nós reforçamos estas observações ao demonstrar, também, prejuízos de memória de referência espacial e de trabalho em camundongos LDLr^{-/-} de três meses.

A modulação do aprendizado e memória envolve a participação de vários neurotransmissores, incluindo a acetilcolina, a qual desempenha um papel importante na cognição. A perda da função colinérgica contribui para o dano de aprendizado e déficit cognitivo associado à demência (LIU et al., 2007). De forma interessante, nosso grupo de pesquisa anteriormente demonstrou que a atividade da enzima AChE – a qual reduz a transmissão colinérgica pela degradação da acetilcolina – estava aumentada no córtex pré-frontal de camundongos LDLr^{-/-} (MOREIRA et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que a ativação desta enzima parece ser um evento primário associado aos prejuízos cognitivos induzidos pela hipercolesterolemia em camundongos *Swiss* (MOREIRA et al., 2014). Estes dados foram confirmados por meio de ensaios *in vitro*, nos quais observou-se que a LDL é citotóxica e aumenta a atividade da AChE em cultura celular de neuroblastoma humano (MOREIRA et al., 2014; YAMCHUEN, AIMJONGJUN e LIMPEANCHOB, 2014).

Importante destacar que as lipoproteínas plasmáticas não atravessam a BHE. Portanto, não está claro, ainda, como o colesterol plasmático poderia afetar as funções cerebrais (DIETSCHY, 2009). Entretanto, Sparks e colaboradores (2000) demonstraram que a hipercolesterolemia afeta a integridade da BHE e desencadeia o aumento no extravasamento de IgG em coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol (SPARKS et al., 2000). Além disso, nós demonstramos anteriormente que os camundongos LDLr^{-/-}, quando comparados aos camundongos C57BL/6, exibem uma maior permeabilidade da BHE (DE OLIVEIRA et al., 2014). Em situações de disfunção da BHE, a LDL plasmática também pode ser encontrada no SNC. Recentemente, Löffler e colaboradores (2013) observaram em camundongos hipercolesterolêmicos apoB-APP (camundongos transgênicos para doença de Alzheimer hipercolesterolêmicos), um acúmulo de apoB100 em vasos cerebrais (LOFFLER et al., 2013). Assim, a LDL plasmática poderia atravessar a BHE e desencadear um efeito direto no sistema colinérgico neste modelo experimental de HF.

Neste sentido, nós hipotetizamos o envolvimento do sistema colinérgico na relação existente entre a HF e o desenvolvimento de déficits cognitivos. Para testar experimentalmente esta hipótese, submetemos os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} ao tratamento subcrônico com donepezil. Levando em consideração que o tratamento com inibidores da AChE melhora a cognição de pacientes com demência, mais especificadamente com doença de Alzheimer (YANG et al., 2013), bem como melhora a memória e aprendizado de camundongos em diversos testes comportamentais (MURAI et al., 2007; VAN DAM et al., 2005), os efeitos da administração subcrônica de donepezil, foram avaliados em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de três meses nos testes de reconhecimento e realocação do objeto, bem como no teste de alternância espontânea. De modo notório, o tratamento com donepezil reverteu os prejuízos cognitivos dos camundongos LDLr^{-/-} em todos os paradigmas comportamentais realizados neste trabalho. Estes dados contribuem para a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos prejuízos cognitivos em pacientes com HF.

Utilizando o teste de campo aberto, bem como outros testes, em 2008, Elder e colaboradores observaram um aumento na atividade locomotora dos camundongos LDLr^{-/-} (ELDER et al., 2008). Da mesma forma, nós também observamos esta hipercolocomoção, a qual foi amenizada após o tratamento subcrônico com donepezil. Podemos especular, que exista uma participação da disfunção colinérgica neste

perfil de atividade locomotora nestes animais modelo de HF e, que quando estes são tratados com o donepezil, a disfunção torna-se atenuada, levando a uma locomoção e atividade exploratória similar a dos animais C57BL/6 do tipo selvagem. Além disso, Moreira e colaboradores (2013) demonstraram que os camundongos LDLr^{-/-}, quando são submetidos a um protocolo experimental de exercício físico, apresentam um número de cruzamentos totais, no campo aberto, significativamente menor que os LDLr^{-/-} sedentários (MOREIRA et al., 2013). É importante destacar que os exercícios físicos melhoram a cognição através do aumento da plasticidade sináptica (AGUIAR et al., 2011). Neste sentido, é possível que o donepezil esteja também atuando sobre mecanismos similares aos conhecidamente modificados pelo exercício físico – os quais incluem o aumento na neurogênese e na sobrevivência neuronal no hipocampo (VAN PRAAG et al., 2005).

Mulder e colaboradores (2004) demonstraram que os déficits de memória operacional e espacial nos camundongos LDLr^{-/-} estão associados à diminuição na proliferação celular e densidade sináptica no hipocampo, devido à diminuição na captação do colesterol celular em decorrência da falta do receptor de LDL (MULDER et al., 2004; MULDER et al., 2007). De fato, Zambon e colaboradores (2010), em seu estudo clínico, também destacaram que além da hipercolesterolemia, havia o envolvimento da disfunção do receptor de LDL no desenvolvimento de prejuízos cognitivos nos indivíduos com HF (ZAMBON et al., 2010).

Estudos experimentais reforçam a inibição da AChE pelo donepezil (KOSASA et al., 2000). Kosasa e colaboradores (2000) demonstraram, em ratos, que a dose de donepezil (via oral) para gerar o efeito mínimo de inibição de AChE cerebral é 0,63 mg/kg, enquanto que a dose estimada para inibir 50% da AChE cerebral é 2,6 mg/kg (KOSASA et al., 2000; SUGIMOTO et al., 2002). No entanto, neste estudo nós não conseguimos observar uma diminuição da atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais tratados com donepezil. Além disso, em contraste com a literatura (MOREIRA et al., 2012), não observamos o aumento na atividade desta enzima nos camundongos LDLr^{-/-} em nenhuma das estruturas estudadas.

É importante destacar que demonstramos, em nosso protocolo experimental *in vitro*, que a preparação do donepezil utilizada foi capaz de inibir a atividade da AChE, com um IC₅₀ de 0,14 nM em homogenatos cerebrais de camundongos selvagens. Esta IC₅₀ encontrada foi menor que a descrita anteriormente, i.e., com uma maior potência biológica (KOSASA et al., 2000; SUGIMOTO et al., 2002). Portanto, a

não observação da inibição causada pelo donepezil no experimento *in vivo* pode ser em virtude da farmacocinética do fármaco, sendo necessária a realização da medida em um tempo menor após a administração do que realizamos neste protocolo experimental.

Além dos efeitos na cognição e memória, alguns estudos vêm demonstrando o envolvimento do donepezil na modulação de sistemas antioxidantes (SAXENA et al., 2008; UMUKORO et al., 2014). Por outro lado, está bem documentado um desbalanço oxidativo como característica da demência (GHOSH, LEVAULT e BREWER, 2014; LYRAS et al., 1997; VALKO et al., 2007). Neste sentido, o sistema antioxidante vinculado à GSH desempenha um papel importante na manutenção da homeostase celular (GHOSH, LEVAULT E BREWER, 2014). Saxena e colaboradores (2008) demonstraram que, em um modelo experimental de doença de Alzheimer, os níveis de GSH cerebrais encontram-se diminuídos, e que quando estes animais são tratados com donepezil os níveis de GSH voltam aos valores do controle. Além disso, foi demonstrado por de Oliveira e colaboradores (2011) que os camundongos LDLr^{-/-}, tratados com uma dieta rica em colesterol, apresentam uma diminuição significativa nos níveis de GSH, bem como um desbalanço entre as atividades das enzimas GPx e GR no córtex cerebral destes animais. Enquanto nos animais LDLr^{-/-} tratados com uma dieta padrão, a única alteração no sistema antioxidante vinculado à GSH observada foi o aumento na atividade da GR no córtex cerebral (DE OLIVEIRA et al., 2011).

No presente trabalho, a atividade das enzimas GPx e GR também foram determinadas. Não houve diferença significativa em relação à atividade de ambas as enzimas no hipocampo dos animais, bem como em relação à atividade da GPx no córtex pré-frontal destes camundongos. Corroborando os dados do estudo anterior (DE OLIVEIRA et al., 2011), a atividade da GR encontra-se aumentada no córtex pré-frontal dos camundongos LDLr^{-/-} em comparação com os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem. Todavia, o tratamento com donepezil não modificou significativamente a atividade das enzimas antioxidantes nos animais LDLr^{-/-}, não havendo participação da modulação do sistema antioxidante nos efeitos deste tratamento na função cognitiva.

Neste trabalho de conclusão de curso observamos experimentalmente que a HF está associada ao desenvolvimento de déficits cognitivos, os quais são revertidos pelo tratamento com o donepezil, um inibidor da enzima AChE. Com estes dados, corroboramos a hipótese do envolvimento do sistema colinérgico na

relação entre HF e os déficits cognitivos. No entanto, os mecanismos pelos quais este composto interferiu no sistema colinérgico e conseqüentemente na cognição ainda precisam ser melhor elucidados e mais experimentos são necessários.

7. CONCLUSÕES PONTUAIS

- O donepezil inibe a atividade da enzima AChE, em uma curva dependente da concentração, em homogenatos cerebrais de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, com um IC₅₀ de 0,14 nM;
- Os déficits de memória e hiperlocomoção observados nos camundongos LDLr^{-/-} de três meses de idade são revertidos, notoriamente, após o tratamento subcrônico com o donepezil;
- A melhora na cognição dos camundongos LDLr^{-/-} não foi associada a uma inibição da AChE nas estruturas cerebrais pelo donepezil;
- A atividade das enzimas vinculadas ao sistema antioxidante da GSH, GPx e GR, de maneira geral, não foram alteradas pelo tratamento com o donepezil e hipercolesterolemia;

Neste trabalho demonstramos o envolvimento do sistema colinérgico na relação existente entre hipercolesterolemia familiar e déficits cognitivos, embora ainda sem elucidar os mecanismos específicos.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, R.; TYAGI, E.; SHUKLA, R.; NATH, C. Effect of insulin and melatonin on acetylcholinesterase activity in the brain of amnesic mice. **Behav Brain Res**, v. 189, n. 2, p. 381-6, Jun 3 2008. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336929> >.

AGUIAR, A. S., JR.; CASTRO, A. A.; MOREIRA, E. L.; GLASER, V.; SANTOS, A. R.; TASCA, C. I.; LATINI, A.; PREDIGER, R. D. 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. ISSN 1872-6216 (Electronic)

0047-6374 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983475> >.

AHN, C. H.; CHOI, S. H. New drugs for treating dyslipidemia: beyond statins. **Diabetes Metab J**, v. 39, n. 2, p. 87-94, Apr 2015. ISSN 2233-6079 (Print)

2233-6079 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25922802> >.

AINGE, J. A.; HERON-MAXWELL, C.; THEOFILAS, P.; WRIGHT, P.; DE HOZ, L.; WOOD, E. R. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. **Behav Brain Res**, v. 167, n. 1, p. 183-95, Feb 15 2006. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214239> >.

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. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19523494> >.

BARTUS, R. T.; DEAN, R. L., 3RD; BEER, B.; LIPPA, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, n. 4558, p. 408-14, Jul 30 1982. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7046051> >.

BECKETT, N.; NUNES, M.; BULPITT, C. Is it advantageous to lower cholesterol in the elderly hypertensive? **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 14, n. 4, p. 397-405, Aug 2000. ISSN 0920-3206 (Print)

0920-3206 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10999646> >.

BOUHAIRIE, V. E.; GOLDBERG, A. C. Familial Hypercholesterolemia. **Cardiol Clin**, v. 33, n. 2, p. 169-179, May 2015. ISSN 1558-2264 (Electronic)

0733-8651 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25939291> >.

BOYLES, J. K.; PITAS, R. E.; WILSON, E.; MAHLEY, R. W.; TAYLOR, J. M. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. **J Clin Invest**, v. 76, n. 4, p. 1501-13, Oct 1985. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3932467> >.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. **Science**, v. 185, n. 4145, p. 61-3, Jul 5 1974. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4366052> >.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. **Sci Am**, v. 251, n. 5, p. 58-66, Nov 1984. ISSN 0036-8733 (Print)

0036-8733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6390676> >.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34-47, Apr 4 1986. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3513311> >.

BURNETT, J. R.; HOOPER, A. J. Common and rare gene variants affecting plasma LDL cholesterol. **Clin Biochem Rev**, v. 29, n. 1, p. 11-26, Feb 2008. ISSN 0159-8090 (Print)

0159-8090 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566665> >.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-90, 1985. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3003504> >.

CHEUNG, J.; BERI, V.; SHIOMI, K.; ROSENBERRY, T. L. Acetylcholinesterase complexes with the natural product inhibitors dihydrotanshinone I and territrem B: binding site assignment from inhibitor competition and validation through crystal structure determination. **J Mol Neurosci**, v. 53, n. 3, p. 506-10, Jul 2014. ISSN 1559-1166 (Electronic)

0895-8696 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573600> >.

CIVEIRA, F. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v. 173, n. 1, p. 55-68, Mar 2004. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15177124> >.

DE OLIVEIRA, J.; HORT, M. A.; MOREIRA, E. L.; GLASER, V.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; PREDIGER, R. D.; FARINA, M.; LATINI, A.; DE BEM, A. F. 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. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945034> >.

DE OLIVEIRA, J.; MOREIRA, E. L.; DOS SANTOS, D. B.; PIERMARTIRI, T. C.; DUTRA, R. C.; PINTON, S.; TASCA, C. I.; FARINA, M.; PREDIGER, R. D.; DE BEM, A. F. Increased susceptibility to amyloid-beta-induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **J Alzheimers Dis**, v. 41, n. 1, p. 43-60, 2014. ISSN 1875-8908 (Electronic)

1387-2877 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24577472> >.

DIETSCHY, J. M. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. **Biol Chem**, v. 390, n. 4, p. 287-93, Apr 2009. ISSN 1431-6730 (Print)

1431-6730 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19166320> >.

DOOLEY, M.; LAMB, H. M. Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease. **Drugs Aging**, v. 16, n. 3, p. 199-226, Mar 2000. ISSN 1170-229X (Print)

1170-229X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803860> >.

DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biol Chem**, v. 384, n. 4, p. 505-16, Apr 2003. ISSN 1431-6730 (Print)

1431-6730 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12751781> >.

EASTON, A.; SANKARANARAYANAN, S.; TANGHE, A.; TERWEL, D.; LIN, A. X.; HOQUE, N.; BOURIN, C.; GU, H.; AHLJANIAN, M.; BRISTOW, L. Effects of sub-chronic donepezil on brain Abeta and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 230, n. 2, p. 279-89, Nov 2013. ISSN 1432-2072 (Electronic)

0033-3158 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23783773> >.

ELDER, G. A.; RAGNAUTH, A.; DORR, N.; FRANCIOSI, S.; SCHMEIDLER, J.; HAROUTUNIAN, V.; BUXBAUM, J. D. Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **Behav Brain Res**, v. 191, n. 2, p. 256-65, Aug 22 2008. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18466986>>.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V., JR.; FEATHER-
STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of
acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-95, Jul
1961. ISSN 0006-2952 (Print)
0006-2952 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13726518>>.

EMRE, M. Switching cholinesterase inhibitors in patients with
Alzheimer's disease. **Int J Clin Pract Suppl**, n. 127, p. 64-72, Jun 2002.
ISSN 1368-504X (Print)
1368-504X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139369>>.

ENDO, A. A gift from nature: the birth of the statins. **Nat Med**, v. 14, n.
10, p. 1050-2, Oct 2008. ISSN 1546-170X (Electronic)
1078-8956 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18841147>>.

ESHKOOR, S. A.; HAMID, T. A.; MUN, C. Y.; NG, C. K. Mild
cognitive impairment and its management in older people. **Clin Interv
Aging**, v. 10, p. 687-693, 2015. ISSN 1178-1998 (Electronic)
1176-9092 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25914527>>.

EVOLA, M.; HALL, A.; WALL, T.; YOUNG, A.; GRAMMAS, P.
Oxidative stress impairs learning and memory in apoE knockout mice.
Pharmacol Biochem Behav, v. 96, n. 2, p. 181-6, Aug 2010. ISSN
1873-5177 (Electronic)
0091-3057 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457176>>.

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.
ISSN 1529-2401 (Electronic)
0270-6474 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17652595>>.

FRERET, T.; BOUET, V.; QUIEDEVILLE, A.; NEE, G.; DALLEMAGNE, P.; ROCHAIS, C.; BOULOUARD, M. Synergistic effect of acetylcholinesterase inhibition (donepezil) and 5-HT(4) receptor activation (RS67333) on object recognition in mice. **Behav Brain Res**, v. 230, n. 1, p. 304-8, Apr 21 2012. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348892> >.

FORLANZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Rev psiquiatr clín**, v.32 n. 3, May/June 2005. ISSN 1806-938X

GALLAGHER, M.; COLOMBO, P. J. Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. **Curr Opin Neurobiol**, v. 5, n. 2, p. 161-8, Apr 1995. ISSN 0959-4388 (Print)

0959-4388 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7620303> >.

GAUTHIER, S.; EMRE, M.; FARLOW, M. R.; BULLOCK, R.; GROSSBERG, G. T.; POTKIN, S. G. Strategies for continued successful treatment of Alzheimer's disease: switching cholinesterase inhibitors. **Curr Med Res Opin**, v. 19, n. 8, p. 707-14, 2003. ISSN 0300-7995 (Print)

0300-7995 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14687441> >.

GHOSH, D.; LEVAULT, K. R.; BREWER, G. J. Relative importance of redox buffers GSH and NAD(P)H in age-related neurodegeneration and Alzheimer disease-like mouse neurons. **Aging Cell**, v. 13, n. 4, p. 631-40, Aug 2014. ISSN 1474-9726 (Electronic)

1474-9718 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655393> >.

GOEDEKE, L.; FERNANDEZ-HERNANDO, C. Regulation of cholesterol homeostasis. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 6, p. 915-30, Mar 2012. ISSN 1420-9071 (Electronic)

1420-682X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009455> >.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 4, p. 431-8, Apr 2009. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19299327> >.

GUO, H. B.; CHENG, Y. F.; WU, J. G.; WANG, C. M.; WANG, H. T.; ZHANG, C.; QIU, Z. K.; XU, J. P. Donepezil improves learning and memory deficits in APP/PS1 mice by inhibition of microglial activation. **Neuroscience**, v. 290, p. 530-42, Apr 2 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25662507> >.

HANSEN, R. A.; GARTLEHNER, G.; WEBB, A. P.; MORGAN, L. C.; MOORE, C. G.; JONAS, D. E. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. **Clin Interv Aging**, v. 3, n. 2, p. 211-225, 2008. ISSN 1176-9092. Disponível em: < <Go to ISI>://000208332400001 >.

IKONEN, E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. **Physiol Rev**, v. 86, n. 4, p. 1237-61, Oct 2006. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015489> >.

ISHIBASHI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.; GERARD, R. D.; HAMMER, R. E.; HERZ, J. 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. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8349823> >.

JACKSON, S.; HAM, R. J.; WILKINSON, D. The safety and tolerability of donepezil in patients with Alzheimer's disease. **Br J Clin Pharmacol**, v. 58 Suppl 1, p. 1-8, Nov 2004. ISSN 0306-5251 (Print)

0306-5251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496217> >.

JANNES, C. E.; SANTOS, R. D.; DE SOUZA SILVA, P. R.; TUROLLA, L.; GAGLIARDI, A. C.; MARSIGLIA, J. D.; CHACRA, A. P.; MINAME, M. H.; ROCHA, V. Z.; FILHO, W. S.; KRIEGER, J. E.; PEREIRA, A. C. Familial hypercholesterolemia in Brazil: cascade screening program, clinical and genetic aspects. **Atherosclerosis**, v. 238, n. 1, p. 101-7, Jan 2015. ISSN 1879-1484 (Electronic)
0021-9150 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25461735> >.

JANSEN, A. C.; VAN WISSEN, S.; DEFESCHE, J. C.; KASTELEIN, J. J. Phenotypic variability in familial hypercholesterolaemia: an update. **Curr Opin Lipidol**, v. 13, n. 2, p. 165-71, Apr 2002. ISSN 0957-9672 (Print)
0957-9672 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891419> >.

JEON, H.; BLACKLOW, S. C. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. **Annu Rev Biochem**, v. 74, p. 535-62, 2005. ISSN 0066-4154 (Print)
0066-4154 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952897> >.

KIVIPELTO, M.; HELKALA, E. L.; LAAKSO, M. P.; HANNINEN, T.; HALLIKAINEN, M.; ALHAINEN, K.; IIVONEN, S.; MANNERMAA, A.; TUOMILEHTO, J.; NISSINEN, A.; SOININEN, H. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. **Ann Intern Med**, v. 137, n. 3, p. 149-55, Aug 6 2002. ISSN 1539-3704 (Electronic)
0003-4819 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160362> >.

KOSASA, T.; KURIYA, Y.; MATSUI, K.; YAMANISHI, Y. Inhibitory effect of orally administered donepezil hydrochloride (E2020), a novel treatment for Alzheimer's disease, on cholinesterase activity in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 389, n. 2-3, p. 173-9, Feb 18 2000. ISSN 0014-2999 (Print)
0014-2999 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688981> >.

LAGACE, T. A. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. **Curr Opin Lipidol**, v. 25, n. 5, p. 387-93, Oct 2014. ISSN 1473-6535 (Electronic)

0957-9672 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110901> >.

LI, Y.; CAM, J.; BU, G. Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction. **Mol Neurobiol**, v. 23, n. 1, p. 53-67, Feb 2001. ISSN 0893-7648 (Print)

0893-7648 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11642543> >.

LIU, Y. Q.; XIN, T. R.; LU, X. Y.; JI, Q.; JIN, Y.; YANG, H. D. Memory performance of hypercholesterolemic mice in response to treatment with soy isoflavones. **Neurosci Res**, v. 57, n. 4, p. 544-9, Apr 2007. ISSN 0168-0102 (Print)

0168-0102 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289196> >.

LOFFLER, T.; FLUNKERT, S.; HAVAS, D.; SANTHA, M.; HUTTER-PAIER, B.; STEYRER, E.; WINDISCH, M. Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPPsl mice. **Neurobiol Aging**, v. 34, n. 10, p. 2379-88, Oct 2013. ISSN 1558-1497 (Electronic)

0197-4580 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23643485> >.

LYRAS, L.; CAIRNS, N. J.; JENNER, A.; JENNER, P.; HALLIWELL, B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 68, n. 5, p. 2061-9, May 1997. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9109533> >.

MABUCHI, H.; KOIZUMI, J.; SHIMIZU, M.; TAKEDA, R. Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. **Circulation**, v. 79, n. 2, p. 225-32, Feb 1989. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2914343> >.

MARIGHETTO, A.; VALERIO, S.; DESMEDT, A.; PHILIPPIN, J. N.; TROCME-THIBIERGE, C.; MORAIN, P. Comparative effects of the alpha7 nicotinic partial agonist, S 24795, and the cholinesterase inhibitor, donepezil, against aging-related deficits in declarative and working memory in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 197, n. 3, p. 499-508, Apr 2008. ISSN 0033-3158 (Print)
0033-3158 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18265960> >.

MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R.; PRICE, D.; STADLAN, E. M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**, v. 34, n. 7, p. 939-44, Jul 1984. ISSN 0028-3878 (Print)
0028-3878 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6610841> >.

MEUNIER, J.; IENI, J.; MAURICE, T. The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma1 receptor. **Br J Pharmacol**, v. 149, n. 8, p. 998-1012, Dec 2006. ISSN 0007-1188 (Print)
0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17057756> >.

MINARINI, A.; MILELLI, A.; SIMONI, E.; ROSINI, M.; BOLOGNESI, M. L.; MARCHETTI, C.; TUMIATTI, V. Multifunctional tacrine derivatives in Alzheimer's disease. **Curr Top Med Chem**, v. 13, n. 15, p. 1771-86, 2013. ISSN 1873-4294 (Electronic)
1568-0266 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23931443> >.

MOREIRA, E. L.; AGUIAR, A. S., JR.; DE CARVALHO, C. R.; SANTOS, D. B.; DE OLIVEIRA, J.; DE BEM, A. F.; XIKOTA, J. C.; WALZ, R.; FARINA, M.; PREDIGER, R. D. Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia. **Neurosci Lett**, v. 541, p. 193-8, Apr 29 2013. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470631>>.

MOREIRA, E. L.; DE OLIVEIRA, J.; ENGEL, D. F.; WALZ, R.; DE BEM, A. F.; FARINA, M.; PREDIGER, R. D. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? **J Neural Transm**, v. 121, n. 4, p. 415-26, Apr 2014. ISSN 1435-1463 (Electronic)

0300-9564 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24166183>>.

MOREIRA, E. L. G.; DE OLIVEIRA, J.; NUNES, J. C.; SANTOS, D. B.; NUNES, F. C.; VIEIRA, D. S. C.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; PAMPLONA, F. A.; DE BEM, A. F.; FARINA, M.; WALZ, R.; PREDIGER, R. D. 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 Alzheimers Disease**, v. 32, n. 2, p. 495-511, 2012. ISSN 1387-2877. Disponível em: <<Go to ISI>://000309977800021 >.

MUFSON, E. J.; GINSBERG, S. D.; IKONOMOVIC, M. D.; DEKOSKY, S. T. Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. **J Chem Neuroanat**, v. 26, n. 4, p. 233-42, Dec 2003. ISSN 0891-0618 (Print)

0891-0618 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729126>>.

MULDER, M. Sterols in the central nervous system. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 12, n. 2, p. 152-8, Mar 2009. ISSN 1473-6519 (Electronic)

1363-1950 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19202386>>.

MULDER, M.; JANSEN, P. J.; JANSSEN, B. J.; VAN DE BERG, W. D.; VAN DER BOOM, H.; HAVEKES, L. M.; DE KLOET, R. E.; RAMAEKERS, F. C.; BLOKLAND, A. 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. ISSN 0969-9961 (Print)

0969-9961 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207278> >.

MULDER, M.; KOOPMANS, G.; WASSINK, G.; AL MANSOURI, G.; SIMARD, M. L.; HAVEKES, L. M.; PRICKAERTS, J.; BLOKLAND, A. 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. ISSN 0168-0102 (Print)
0168-0102 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17720268> >.

MURAI, T.; OKUDA, S.; TANAKA, T.; OHTA, H. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. **Physiol Behav**, v. 90, n. 1, p. 116-24, Jan 30 2007. ISSN 0031-9384 (Print)
0031-9384 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049363> >.

NAIR, D. R.; SHARIFI, M.; AL-RASADI, K. Familial hypercholesterolaemia. **Curr Opin Cardiol**, v. 29, n. 4, p. 381-8, Jul 2014. ISSN 1531-7080 (Electronic)
0268-4705 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24870549> >.

NAIR, P. Brown and Goldstein: the cholesterol chronicles. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 37, p. 14829-32, Sep 10 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23980185> >.

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

NOTKOLA, I. L.; SULKAVA, R.; PEKKANEN, J.; ERKINJUNTTI, T.; EHNHOLM, C.; KIVINEN, P.; TUOMILEHTO, J.; NISSINEN, A. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. **Neuroepidemiology**, v. 17, n. 1, p. 14-20, 1998. ISSN 0251-5350 (Print)
0251-5350 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9549720> >.

OGURA, H.; KOSASA, T.; KURIYA, Y.; YAMANISHI, Y. Comparison of inhibitory activities of donepezil and other cholinesterase inhibitors on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in vitro. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 22, n. 8, p. 609-13, Oct 2000. ISSN 0379-0355 (Print)
0379-0355 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256231> >.

PANZA, F.; D'INTRONO, A.; COLACICCO, A. M.; CAPURSO, C.; PICHICHERO, G.; CAPURSO, S. A.; CAPURSO, A.; SOLFRIZZI, V. Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. **Brain Research Reviews**, v. 51, n. 2, p. 275-292, Aug 2006. ISSN 0165-0173. Disponível em: <<Go to ISI>://000238922200007 >.

PEREIRA, A. G., ACM; LOTTENBERG, AM; CHACRA, APM; FALUDI, AA; SPOSITO, AC; CASELLA-FILHO, A; ARAÚJO, DB; CESENA, FHY; RIBEIRO FILHO, FF; FONSECA, FAH; XAVIER, HT; GIULIANO, I; CATANI, LH; BERTOLAMI, MC; MINAME, MH; IZAR, MC; MONTE, O; SANTOS, RD; MARANHÃO, RC; ALVES, RJ; MARTINEZ, T; MACHADO, VA; ROCHA, VZ; SALGADO-FILHO, W. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arq Bras Cardiol**, v. 99, n. 2, p. 28, Agosto 2012 2012. ISSN 0066-782X.

PFRIEGER, F. W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 6, p. 1158-71, Jun 2003a. ISSN 1420-682X (Print)
1420-682X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12861382> >.

PFRIEGER, F. W. Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? **Bioessays**, v. 25, n. 1, p. 72-8, Jan 2003b. ISSN 0265-9247 (Print)
0265-9247 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12508285> >.

PFRIEGER, F. W. Role of cholesterol in synapse formation and function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1610, n. 2, p. 271-80, Mar 10 2003c. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648780> >.

PFRIEGER, F. W.; UNGERER, N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. **Prog Lipid Res**, v. 50, n. 4, p. 357-71, Oct 2011. ISSN 1873-2194 (Electronic)

0163-7827 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21741992> >.

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. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600700> >.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 362, n. 4, p. 329-44, Jan 28 2010. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107219> >.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase - Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition-States. **Chemical Reviews**, v. 87, n. 5, p. 955-979, Oct 1987. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <Go to ISI>://A1987K412400006 >.

RAMIREZ, C.; SIERRA, S.; TERCERO, I.; VAZQUEZ, J. A.; PINEDA, A.; MANRIQUE, T.; BURGOS, J. S. ApoB100/LDLR-/- hypercholesterolaemic mice as a model for mild cognitive impairment and neuronal damage. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22712, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829488> >.

RIEDEL, G.; KANG, S. H.; CHOI, D. Y.; PLATT, B. Scopolamine-induced deficits in social memory in mice: reversal by donepezil. **Behav Brain Res**, v. 204, n. 1, p. 217-25, Dec 1 2009. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19527754> >.

SAXENA, G.; SINGH, S. P.; AGRAWAL, R.; NATH, C. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 581, n. 3, p. 283-9, Mar 10 2008. ISSN 0014-2999 (Print)
0014-2999 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234183> >.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2, p. 555-63, Aug 10 2011. ISSN 1872-7549 (Electronic)
0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145918> >.

SHIMIZU, S.; KANETAKA, H.; HIROSE, D.; SAKURAI, H.; HANYU, H. Differential effects of acetylcholinesterase inhibitors on clinical responses and cerebral blood flow changes in patients with Alzheimer's disease: a 12-month, randomized, and open-label trial. **Dement Geriatr Cogn Dis Extra**, v. 5, n. 1, p. 135-46, Jan-Apr 2015. ISSN 1664-5464 (Electronic)
1664-5464 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25999980> >.

SIJBRANDS, E. J.; WESTENDORP, R. G.; PAOLA LOMBARDI, M.; HAVEKES, L. M.; FRANTS, R. R.; KASTELEIN, J. J.; SMELT, A. H. Additional risk factors influence excess mortality in heterozygous familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis**, v. 149, n. 2, p. 421-5, Apr 2000. ISSN 0021-9150 (Print)
0021-9150 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729393> >.

SPARKS, D. L.; HUNSAKER, J. C., 3RD; SCHEFF, S. W.; KRYSCIO, R. J.; HENSON, J. L.; MARKESBERY, W. R. Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 11, n. 6, p. 601-7, Nov-Dec 1990. ISSN 0197-4580 (Print)
0197-4580 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1704106> >.

SPARKS, D. L.; KUO, Y. M.; ROHER, A.; MARTIN, T.; LUKAS, R. J. 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. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818523> >.

SPARKS, D. L.; LIU, H.; SCHEFF, S. W.; COYNE, C. M.; HUNSAKER, J. C., 3RD. Temporal sequence of plaque formation in the cerebral cortex of non-demented individuals. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 52, n. 2, p. 135-42, Mar 1993. ISSN 0022-3069 (Print)
0022-3069 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440995> >.

SPARKS, D. L.; SABBAGH, M. N.; CONNOR, D. J.; LOPEZ, J.; LAUNER, L. J.; BROWNE, P.; WASSER, D.; JOHNSON-TRAVER, S.; LOCHHEAD, J.; ZIOLWOLSKI, C. Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. **Arch Neurol**, v. 62, n. 5, p. 753-7, May 2005. ISSN 0003-9942 (Print)
0003-9942 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15883262> >.

SPOWART-MANNING, L.; VAN DER STAAY, F. J. The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse. **Behav Brain Res**, v. 151, n. 1-2, p. 37-46, May 5 2004. ISSN 0166-4328 (Print)
0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084419> >.

SUGIMOTO, H.; OGURA, H.; ARAI, Y.; LIMURA, Y.; YAMANISHI, Y. Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. **Jpn J Pharmacol**, v. 89, n. 1, p. 7-20, May 2002. ISSN 0021-5198 (Print)
0021-5198 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12083745> >.

TAN, Z. S.; SESHADRI, S.; BEISER, A.; WILSON, P. W.; KIEL, D. P.; TOCCO, M.; D'AGOSTINO, R. B.; WOLF, P. A. Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study. **Arch Intern Med**, v. 163, n. 9, p. 1053-7, May 12 2003. ISSN 0003-9926 (Print)
0003-9926 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742802> >.

THIRUMANGALAKUDI, L.; PRAKASAM, A.; ZHANG, R.; BIMONTE-NELSON, H.; SAMBAMURTI, K.; KINDY, M. S.; BHAT, N. R. 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. ISSN 1471-4159 (Electronic)
0022-3042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18410513> >.

TIRABOSCHI, P.; HANSEN, L. A.; ALFORD, M.; MERDES, A.; MASLIAH, E.; THAL, L. J.; COREY-BLOOM, J. Early and widespread cholinergic losses differentiate dementia with Lewy bodies from Alzheimer disease. **Arch Gen Psychiatry**, v. 59, n. 10, p. 946-51, Oct 2002. ISSN 0003-990X (Print)
0003-990X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12365882> >.

TSUNEKAWA, H.; NODA, Y.; MOURI, A.; YONEDA, F.; NABESHIMA, T. Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25-35). **Behav Brain Res**, v. 190, n. 2, p. 224-32, Jul 19 2008. ISSN 0166-4328 (Print)
0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420288> >.

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. ISSN 1095-9327 (Electronic)
1044-7431 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696249> >.

UMEDA, T.; TOMIYAMA, T.; KITAJIMA, E.; IDOMOTO, T.; NOMURA, S.; LAMBERT, M. P.; KLEIN, W. L.; MORI, H. Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of Abeta oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. **Life Sci**, v. 91, n. 23-24, p. 1169-76, Dec 10 2012. ISSN 1879-0631 (Electronic)
0024-3205 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273754> >.

UMUKORO, S.; ADEWOLE, F. A.; EDUVIERE, A. T.; ADERIBIGBE, A. O.; ONWUCHEKWA, C. Free radical scavenging effect of donepezil as the possible contribution to its memory enhancing activity in mice. **Drug Res (Stuttg)**, v. 64, n. 5, p. 236-9, May 2014. ISSN 2194-9387 (Electronic)

2194-9379 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24203083> >.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSNER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725 (Print)

1357-2725 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905> >.

VAN BEEK, A. H.; CLAASSEN, J. A. The cerebrovascular role of the cholinergic neural system in Alzheimer's disease. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2, p. 537-42, Aug 10 2011. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060023> >.

VAN DAM, D.; ABRAMOWSKI, D.; STAUFENBIEL, M.; DE DEYN, P. P. 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. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15654502> >.

VAN PRAAG, H.; SHUBERT, T.; ZHAO, C.; GAGE, F. H. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J Neurosci**, v. 25, n. 38, p. 8680-5, Sep 21 2005. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177036> >.

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

VOGT, A. The genetics of familial hypercholesterolemia and emerging therapies. **Appl Clin Genet**, v. 8, p. 27-36, 2015. ISSN 1178-704X (Electronic)

1178-704X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25670911 >.

WATTS, G. F.; GIDDING, S.; WIERZBICKI, A. S.; TOTH, P. P.; ALONSO, R.; BROWN, W. V.; BRUCKERT, E.; DEFESCHE, J.; LIN, K. K.; LIVINGSTON, M.; MATA, P.; PARHOFER, K. G.; RAAL, F. J.; SANTOS, R. D.; SIJBRANDS, E. J.; SIMPSON, W. G.; SULLIVAN, D. R.; SUSEKOV, A. V.; TOMLINSON, B.; WIEGMAN, A.; YAMASHITA, S.; KASTELEIN, J. J. Integrated guidance on the care of familial hypercholesterolaemia from the International FH Foundation: executive summary. **J Atheroscler Thromb**, v. 21, n. 4, p. 368-74, 2014. ISSN 1880-3873 (Electronic)

1340-3478 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24892180 >.

WISNIEWSKI, T.; GONI, F. Immunotherapy for Alzheimer's disease. **Biochem Pharmacol**, v. 88, n. 4, p. 499-507, Apr 15 2014. ISSN 1873-2968 (Electronic)

0006-2952 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412277 >.

YAMCHUEN, P.; AIMJONGJUN, S.; LIMPEANCHOB, N. Oxidized low density lipoprotein increases acetylcholinesterase activity correlating with reactive oxygen species production. **Neurochem Int**, v. 78, p. 1-6, Dec 2014. ISSN 1872-9754 (Electronic)

0197-0186 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111460 >.

YANG, Y. H.; CHEN, C. H.; CHOU, M. C.; LI, C. H.; LIU, C. K.; CHEN, S. H. Concentration of donepezil to the cognitive response in Alzheimer disease. **J Clin Psychopharmacol**, v. 33, n. 3, p. 351-5, Jun 2013. ISSN 1533-712X (Electronic)

0271-0749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23609381 >.

ZADELAAR, S.; KLEEMANN, R.; VERSCHUREN, L.; DE VRIES-VAN DER WEIJ, J.; VAN DER HOORN, J.; PRINCEN, H. M.; KOOISTRA, T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical

modifiers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 8, p. 1706-21, Aug 2007. ISSN 1524-4636 (Electronic)
1079-5642 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17541027> >.

ZAMBON, D.; QUINTANA, M.; MATA, P.; ALONSO, R.; BENAVENT, J.; CRUZ-SANCHEZ, F.; GICH, J.; POCOVI, M.; CIVEIRA, F.; CAPURRO, S.; BACHMAN, D.; SAMBAMURTI, K.; NICHOLAS, J.; PAPPOLLA, M. A. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **Am J Med**, v. 123, n. 3, p. 267-74, Mar 2010. ISSN 1555-7162 (Electronic)
0002-9343 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20193836> >.

ZHOU, Y.; ELKINS, P. D.; HOWELL, L. A.; RYAN, D. H.; HARRIS, R. B. Apolipoprotein-E deficiency results in an altered stress responsiveness in addition to an impaired spatial memory in young mice. **Brain Res**, v. 788, n. 1-2, p. 151-9, Mar 30 1998. ISSN 0006-8993 (Print)
0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9554991> >.