



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**



CIBELE MARTINS PINHO

**IMPACTO DO ESTRESSE E DO DIMORFISMO SEXUAL SOBRE
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E NEUROPLÁSTICAS EM UM
MODELO ANIMAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR**

**FLORIANÓPOLIS
2023**

CIBELE MARTINS PINHO

**IMPACTO DO ESTRESSE E DO DIMORFISMO SEXUAL SOBRE
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E NEUROPLÁSTICAS EM UM
MODELO ANIMAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestra em Neurociências.

Orientador: Prof. Rui Daniel Prediger, Dr.

Coorientadora: Profa. Manuella Pinto Kaster, Dra.

FLORIANÓPOLIS
2023

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

Pinho, Cibele Martins

Impacto do estresse e do dimorfismo sexual sobre respostas comportamentais e neuroplásticas em um modelo animal de Hipercolesterolemia Familiar / Cibele Martins Pinho ; orientador, Rui Daniel Schröder Prediger, coorientador, Manuella Pinto Kaster, 2023.

121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Colesterol. 3. ansiedade. 4. estresse. 5. comportamento. I. Prediger, Rui Daniel Schröder. II. Kaster, Manuella Pinto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

Cibele Martins Pinho

Impacto do estresse e do dimorfismo sexual sobre respostas comportamentais e neuroplásticas em um modelo animal de Hipercolesterolemia Familiar

O presente trabalho em nível de mestrado foi apresentado no dia 15 de Setembro de 2023, avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Patrícia de Souza Brocardo, Dra.
Universidade Federa de Santa Catarina

Profa. Jade de Oliveira, Dra.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Prof. Aderbal Silva Aguiar Jr, Dr.
Coordenador do Curso

Prof. Rui Daniel S. Prediger, Dr.
Orientador

Profa. Manuella Pinto Kaster, Dra.
Coorientadora

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho a toda minha família, que sempre me apoiou nos estudos e que me deixam sonhar, mesmo meus sonhos mais altos, sempre me incentivando e acreditando em mim, quando nem eu mesma acreditava. Eu sempre estarei aqui, mesmo longe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a todos os animais que deram suas vidas para que este trabalho fosse possível, muito obrigada!

Ao Professor Dr. Rui Prediger, por todo o conhecimento e orientação, por acreditar e confiar muito em mim, por deixar-me fazer “loucuras” no laboratório, agradeço imensamente pela oportunidade de ter começado minha carreira na Neurociências com você!

À Professora Dra. Manuella Kaster, que me adotou no LANET e fez com que eu me sentisse parte do laboratório, obrigada por todo o ensinamento e ajuda, seja na prática tirando as amígdalas, seja na teoria com as discussões sobre estresse e *western blotting*, obrigada por ter aberto as portas e o coração para mim!

Obrigada ao corpo técnico do LAMEB, pelo auxílio nos experimentos, em especial à Liz, Bibiana e Flávia! À veterinária Luciana, que sempre foi um amor e por ter me auxiliado em experimentos, que também sempre esteve à disposição para sanar as pequenas dúvidas em relação aos animais, você é muito especial!

Aos integrantes do LEXDON, que me ensinaram a fazer ciência, de alguma maneira ou de todas as maneiras, Andreia (pelas fofocas no corredor), as Brunas, Dayse, Fernanda, Gisa, Juliana, Nei, Naiani, Samantha e Tay. À Ana Elisa, que foi a primeira pessoa que conheci do LEXDON lá em 2019 e foi o anjo que me ajudou com as inscrições para o doutorado futuro, muito obrigada!!! Aos IC's, Marcos e Nicolý, que foram muito mais do que apenas ajudantes para que este trabalho terminasse, foram também amigos que ganhei e que sentirei muita falta no dia a dia. Ao Gabriel, por me aturar nos últimos meses e topa as minhas loucuras, sentirei saudades de não conseguir fazer as coisas no Lab. porque você não para de falar, toma conta dos meus filhos por mim.

Ao Lab. adotivo, pelo acolhimento, mas principalmente à Nicolle, sem ela eu não saberia nada de *Blotting*, e você foi muito mais que uma amiga me ensinando, virou um serzinho que vou levar sempre no meu coração pelo carinho que trata tudo ao seu redor, que encanta e me faz querer ficar junto e apertá-la (mesmo não gostando de contato). Muito obrigada, Nic! Você foi essencial para este trabalho, e para minha vida.

À Laura, que mesmo que tenhamos nos conhecido lá em 15.2, quando entramos juntas na Bio, fomos nos conectar somente no mestrado graças ao LANET. Obrigada por tudo, pela ajuda nos experimentos, pelas horas de café, pelos conselhos de Lab. e de vida, por suportar a minha irritação enquanto você era o oposto de mim, por ter virado uma pessoa essencial para suportar os perrengues do mestrado. Sem você teria sido trilhões de vezes mais difícil. Obrigada pelo apoio também de vida, por me inspirar a ser mais e a ter coragem como você! De qualquer lugar do mundo, te amo!

Ao meu IC adotado, meu suporte emocional no último ano do mestrado, Francisco, eu nem sei como irei aguentar o doutorado sem você, você foi muito mais que um amigo, foi uma âncora de felicidade, um ponto de paz em meio ao caos dos experimentos que davam errado. Obrigada por existir!

Aos amigos do PPG Neuro, em especial à Thayza, Scheila e Well que fizeram do mestrado algo especial e muito feliz, principalmente nos congressos e cursos de verão. Aqui estendo o meu muito obrigada por me deixarem fazer parte da organização dos últimos Cursos de Verão em Neurociências, não está escrito o quanto eu amei poder fazer parte das últimas

edições! Também obrigada à Professora Dra. Patrícia Brocardo, por me deixar fazer parte da organização do I FloripaNeuro e por ter confiado tanto em mim, foi uma experiência incrível!

Às amigas da Bio, a primeira louca que me aturou no começo, Ângela, muito obrigada! Aos amores da minha vida, que encontrei no noturno, Ágatha e Lais, sem vocês eu não teria nem terminado a Bio, vocês foram essenciais nessa etapa, mas também continuaram sendo no mestrado, com os rolês de comida ou os cafés com a Lais no Lab., amarei vocês para sempre!

Obrigada às minhas amigas de milhões de anos, Bruna, Camila, Juju, Kamila e Maria, por terem sido um presente em minha vida e por me aguentarem nas irritações, choros e surtos. Não quero nunca as perder. Eu amo vocês!

Obrigada a toda minha família, meus avós, que sempre acreditaram em mim, minhas tias, que sempre estiveram ali, minha madrinha, que até me ajudar em experimento no meio da pandemia me ajudou. E principalmente aos meus pais, Ricardo e Patrícia, por acreditarem em mim quando eu não acreditava, à mãe por me ensinar a ler e escrever cedo (4 aninhos) e por ter corrigido (sendo professora de português) todos os meus trabalhos desde muito cedo (inclusive este) e por me incentivar a sempre melhorar e a seguir o caminho da pesquisa, mesmo sabendo o quão difícil é esse mundo. À minha irmã, Janaína, que tem um futuro brilhante pela frente e que sabe que mesmo eu estando longe, pode contar comigo para tudo.

Obrigada à primeira orientadora de pesquisa lá no PIBIC, ensino médio, Professora Dra. Nara, que me fez ver nesse mundo algo pelo qual eu poderia seguir carreira. Também aos professores do Colégio de Aplicação, por terem me influenciado a seguir na carreira acadêmica, devido aos inúmeros projetos de pesquisa e saídas de campo que o colégio proporcionava, desde o Projeto Pés na Estrada, a possibilidade de bolsas PIBIC e as apresentações dos meus resultados em encontros, mesmo fora do estado; imagino que se eu não tivesse tido toda essa experiência eu poderia não estar aqui hoje.

Agradeço à CAPES, pela bolsa de pesquisa concedida por dois anos, sem ela seria inviável realizar a pesquisa com total dedicação.

Finalizando, deixo um agradecimento muito especial, talvez o principal: OBRIGADA à UFSC, pelos 17 anos aqui dentro! Entre NDI, Colégio de Aplicação, Licenciatura em Ciências Biológicas e o Mestrado na Neuro. Eu cresci aqui, literalmente.... praticamente todas as minhas lembranças, as de estudos, as de loucuras com amigos, tudo foi na UFSC. De comer no RU, no bandejão aos 5 anos, de odiar apresentar teatro no NDI, da verdade ou consequência na fila do RU, das horas esperando a Educação Física no CDS, o ônibus Tapera/TITRI, da loucura que foi a Bio diurno, dos surtos de quase desistir, do aprendizado nos laboratórios, dos choros nas saídas de campo para o meio do mato, dos corotes depois da aula, dos experimentos até depois da meia-noite, de ser mordida por camundongo e ficar chorando na sala de comportamento, dos risos e cafés com os amigos nos Labs. Estas e todas as inúmeras lembranças que irei levar comigo, porque aqui, finalmente, depois de muita coisa boa, mas também ruim, aprendizados e tristezas, vou dar o próximo passo na minha carreira um pouco longe daqui, depois de 17 anos, eu digo adeus... ou um até logo?

“Claro que está acontecendo em sua mente..., mas por que isso significaria que não é real?”
(Alvo Dumbledore em “*Harry Potter e as Relíquias da Morte, ano, p. 562*)

RESUMO

A Hipercolesterolemia Familiar é um distúrbio metabólico causado por mutações no gene que codifica o receptor LDL (LDLr), podendo se apresentar na forma heterozigótica, com a perda parcial da função do receptor, ou pela forma homozigótica, com a perda total da função do receptor, acarretando o aumento significativo das concentrações de colesterol no sangue. Camundongos com homozigóticos para o LDLr (LDLr^{-/-}) têm sido utilizados como modelo experimental da Hipercolesterolemia Familiar, apresentando, além de níveis elevados de colesterol, déficits cognitivos e alterações no comportamento emocional. Além disso, camundongos LDLr^{-/-} apresentam alterações na neurotransmissão monoaminérgica no hipocampo, córtex pré-frontal e estriado, áreas encefálicas envolvidas no controle de funções cognitivas e emocionais. Entretanto, ainda são escassos os trabalhos que investiguem o comportamento social e tipo-ansioso nessa linhagem. Adicionalmente, eventos estressores podem atuar como gatilhos ambientais para alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas à ansiedade e atividade social. Portanto, torna-se relevante observar a sensibilidade de camundongos LDLr^{-/-} frente a paradigmas de estresse e possíveis diferenças associadas ao dimorfismo sexual. Sendo assim, o presente trabalho investigou o efeito do dimorfismo sexual em camundongos LDLr^{-/-} nas respostas comportamentais associadas à ansiedade frente a diferentes modelos de estresse. Além disso, foram investigadas possíveis alterações na via de sinalização mediada por *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), TrkB e nos níveis do receptor de glicocorticoides (GR) no hipocampo e córtex-pré-frontal. Foram utilizados camundongos fêmeas e machos com idade entre 4-5 meses das linhagens LDLr^{-/-} e selvagens (C57BL6). Como protocolos de indução de estresse foram utilizados o estresse agudo de contenção por 7 h e a indução farmacológica de estresse com a administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p., por 21 dias). As análises dos comportamentos relacionado à ansiedade foram avaliados com o teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e teste de enterrar esferas, já os comportamentos relacionados à ansiedade social foram avaliados nos testes da sociabilidade no campo aberto e das três câmaras. Os níveis das proteínas de interesse foram avaliados por *Western Blot*. A corticosterona sérica foi mensurada por ELISA e o colesterol sérico por método colorimétrico. Os animais LDLr^{-/-} avaliados no CA e no LCE apresentaram um comportamento tipo-ansiolítico e o estresse agudo não foi capaz de reverter esse perfil. No protocolo de estresse crônico com dexametasona, apenas as fêmeas LDLr^{-/-} apresentaram perfil ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado e em relação a ansiedade social no teste da sociabilidade no campo aberto, sendo que o estresse crônico também não foi capaz de aumentar o comportamento tipo-ansioso nas fêmeas LDL^{-/-}. Conforme esperado, os animais LDLr^{-/-} apresentaram níveis de colesterol plasmático duas vezes maiores do que os camundongos do grupo selvagem. Além disso, os níveis de corticosterona dos animais submetidos ao estresse agudo não diferiu dos animais controle. Contudo, nos animais expostos ao tratamento crônico com dexametasona, houve uma diminuição da corticosterona plasmática, demonstrando uma inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Os animais naive LDLr^{-/-} machos e fêmeas apresentam diminuição de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo, aumento de TrkB no hipocampo nas fêmeas LDLr^{-/-} e diminuição de TrkB no córtex pré-frontal dos machos LDLr^{-/-}. Além disso, observamos um aumento nos níveis do receptor GR no hipocampo dos animais machos e fêmeas LDLr^{-/-} naives. O estresse agudo diminuiu a expressão de GR no córtex das fêmeas LDLr^{-/-} estressadas, e aumentou no córtex e hipocampo dos machos LDLr^{-/-} estressados. Esse último resultado também foi observado no protocolo de estresse crônico, onde foi também observado um aumento de TrkB no hipocampo das fêmeas LDLr^{-/-} estressadas.

Palavras-chave: colesterol, LDLr^{-/-}; ansiedade; comportamento social; estresse.

ABSTRACT

Familial Hypercholesterolemia is a metabolic disorder caused by mutations in the gene that encodes the LDL receptor (LDLr), which can present in the heterozygous form, with partial loss of receptor function, or in the homozygous form, with total loss of receptor function. , leading to a significant increase in cholesterol concentrations in the blood. Mice homozygous for LDLr (LDLr^{-/-}) have been used as an experimental model of Familial Hypercholesterolemia, presenting, in addition to high cholesterol levels, cognitive deficits and changes in emotional behavior. Furthermore, LDLr^{-/-} mice present changes in monoaminergic neurotransmission in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum, brain areas involved in the control of cognitive and emotional functions. However, there are still few studies investigating social and anxiety-like behavior in this lineage. Additionally, stressful events can act as environmental triggers for behavioral and neurochemical changes related to anxiety and social activity. Therefore, it is relevant to observe the sensitivity of LDLr^{-/-} mice to stress paradigms and possible differences associated with sexual dimorphism. Therefore, the present work investigated the effect of sexual dimorphism in LDLr^{-/-} mice on behavioral responses associated with anxiety when faced with different stress models. Furthermore, possible changes in the signaling pathway mediated by brain derived neurotrophic factor (BDNF), TrkB and in the levels of the glucocorticoid receptor (GR) in the hippocampus and prefrontal cortex were investigated. Female and male mice aged between 4-5 months of LDLr^{-/-} and wild-type (C57BL6) lines were used. As stress induction protocols, acute restraint stress for 7 h and pharmacological stress induction with the administration of dexamethasone (4 mg/kg, i.p., for 21 days) were used. The analyzes of anxiety-related behaviors were evaluated with the open field test, elevated plus maze and burying spheres test, while behaviors related to social anxiety were evaluated in the sociability tests in the open field and the three chambers. The levels of proteins of interest were evaluated by Western Blot. Serum corticosterone was measured by ELISA and serum cholesterol by colorimetric method. The LDLr^{-/-} animals evaluated in the AC and LCE showed anxiolytic-like behavior and acute stress was not able to reverse this profile. In the chronic stress protocol with dexamethasone, only LDLr^{-/-} females showed an anxiolytic profile in the elevated plus maze test and in relation to social anxiety in the open field sociability test, and chronic stress was also unable to increase anxiety-like behavior in LDL^{-/-} females. As expected, LDLr^{-/-} animals had plasma cholesterol levels twice as high as mice in the wild group. Furthermore, corticosterone levels in animals subjected to acute stress did not differ from control animals. However, in animals exposed to chronic treatment with dexamethasone, there was a decrease in plasma corticosterone, demonstrating an inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. LDLr^{-/-} naive male and female animals show decreased BDNF in the prefrontal cortex and hippocampus, increased TrkB in the hippocampus in LDLr^{-/-} females and decreased TrkB in the prefrontal cortex of LDLr^{-/-} males. Furthermore, we observed an increase in GR receptor levels in the hippocampus of naive male and female LDLr^{-/-} animals. Acute stress decreased GR expression in the cortex of stressed LDLr^{-/-} females, and increased it in the cortex and hippocampus of stressed LDLr^{-/-} males. This last result was also observed in the chronic stress protocol, where an increase in TrkB was also observed in the hippocampus of stressed LDLr^{-/-} females.

Keywords: cholesterol; LDLr^{-/-}; anxiety; social behavior; stress.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1: ESQUEMA DA INTERNALIZAÇÃO DA LDL NA CÉLULA..... | 18 |
| FIGURA 2: SÍNTESE E METABOLISMO DO COLESTEROL NO SNC..... | 20 |
| FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA GENÉTICA ENVOLVIDA NA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR. | 21 |
| FIGURA 4: EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HHA) E SÍNTESE DE CORTISOL E CORTICOSTERONA..... | 32 |
| FIGURA 5: CASCATAS DE SINALIZAÇÃO BDNF E PRÓ-BDNF..... | 37 |
| FIGURA 6: DESENHO EXPERIMENTAL I – SENSIBILIDADE AO ESTRESSE DE CONTENÇÃO E ALTERAÇÕES RELACIONADAS À NEUROPLASTICIDADE..... | 44 |
| FIGURA 7: DESENHO EXPERIMENTAL II – SENSIBILIDADE AO ESTRESSE CRÔNICO COM DEXAMETASONA E ALTERAÇÕES RELACIONADAS À NEUROPLASTICIDADE..... | 45 |
| FIGURA 8: APARATO DO CAMPO ABERTO..... | 46 |
| FIGURA 9: APARATO DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO..... | 47 |
| FIGURA 10: ILUSTRAÇÃO DO TESTE DE ESCONDER ESFERAS..... | 48 |
| FIGURA 11: APARATO DA SOCIABILIDADE NO CAMPO ABERTO..... | 49 |
| FIGURA 12: ILUSTRAÇÃO DO TESTE DAS TRÊS CÂMARAS..... | 49 |
| FIGURA 13: ILUSTRAÇÕES DAS AVALIAÇÕES DE PESO CORPORAL NOS PROTOCOLOS I E II..... | 50 |
| FIGURA 14: GRUPOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS PARA ANÁLISES DE WESTERN BLOTTING..... | 52 |
| FIGURA 15: TESTE DO CAMPO ABERTO – ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO..... | 58 |
| FIGURA 16: TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO – ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO..... | 59 |
| FIGURA 17: TESTE DA SOCIABILIDADE NO CAMPO ABERTO – ESTRESSE DE CONTENÇÃO / PROTOCOLO II B..... | 61 |
| FIGURA 18: VARIAÇÃO DO PESO NO PROTOCOLO DE ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO..... | 62 |
| FIGURA 19: COLESTEROL E CORTICOSTERONA SÉRICOS NOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO..... | 63 |
| FIGURA 20: ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTEICO DO GR NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO DE ANIMAIS NAIVE..... | 64 |
| FIGURA 21: ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTEICO DE BDNF NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO DE ANIMAIS NAIVE..... | 65 |
| FIGURA 22: ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTEICO DO RECEPTOR TrkB 95kDa e 145kDa NO HIPOCAMPO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE ANIMAIS NAIVE..... | 66 |
| FIGURA 23: ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTEICO DE GR CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO DOS ANIMAIS WT e LDLR ^{-/-} DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO..... | 68 |
| FIGURA 24: ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTEICO DA NEUROTROFINA BDNF NO HIPOCAMPO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DOS ANIMAIS WT e LDLR ^{-/-} DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO..... | 70 |
| FIGURA 25: ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTEICO DO RECEPTOR TrkB 145kDa e 95kDa NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO DAS FÊMEAS WT e LDLR ^{-/-} | 72 |
| FIGURA 26: EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO COM DEXA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E RESPOSTAS DE ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS WT e LDLR ^{-/-} AVALIADAS NO TESTE DO CAMPO ABERTO..... | 74 |
| FIGURA 27: EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO COM DEXA SOBRE AS RESPOSTAS DE ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS WT e LDLR ^{-/-} AVALIADAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO..... | 75 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 28: EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO COM DEXA SOBRE A SOCIABILIDADE EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS WT E LDLR-/- AVALIADA NO CAMPO ABERTO. | 77 |
| FIGURA 29: EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO COM DEXA SOBRE AS RESPOSTAS DE ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS WT E LDLR-/- AVALIADAS NO TESTE DE ESCONDER ESFERAS..... | 78 |
| FIGURA 30: EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO COM DEXA SOBRE AS RESPOSTAS DE SOCIABILIDADE EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS WT E LDLR-/- AVALIADA NO TESTE DAS TRÊS CÂMARAS. | 80 |
| FIGURA 31: VARIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS WT E LDLR-/- MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO..... | 81 |
| FIGURA 32: NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL E CORTICOSTERONA DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO. | 82 |
| FIGURA 33: ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTEICO DE GR NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO DE ANIMAIS WT E LDLR-/- SUBMETIDOS AO PROTOCOLO CRÔNICO COM DEXAMETASONA..... | 83 |
| FIGURA 34: ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTEICO DA NEUROTROFINA BDNF NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO DOS ANIMAIS WT E LDLR-/- SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO COM A ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA. | 85 |
| FIGURA 35: ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTEICO DO RECEPTOR TrkB 145kDa E 95kDa NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO DOS ANIMAIS WT E LDLR-/- SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO COM A ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA..... | 87 |
| FIGURA 36: SUMÁRIO DE RESULTADOS..... | 100 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| 24-OH | 24-Hidroxicolesterol |
| 27-OH | 27-Hidroxicolesterol |
| 5-HT1A | Receptor de Serotonina (5-hidroxitriptamina) do tipo 1 A |
| ABCA-1 | Transportadores de casseta de ligação ao ATP |
| acetilCoA | Acetilcoenzima A |
| ACTH | Hormônio adrenocorticotrófico ou corticotropina |
| AKT | Proteína quinase B |
| APA | Associação Americana de Psiquiatria (<i>American Psychiatric Association</i>) |
| apoE | Apolipoproteína E |
| AQP-4 | Canal de aquaporina 4 |
| ATP | Adenina tri-fosfato |
| AVP | Arginina-vasopressina (<i>arginine vasopressin</i>) |
| BDNF | Fator neurotrófico derivado do cérebro (<i>Brain derived neurotrophic factor</i>) |
| BHE | Barreira hematoencefálica |
| CaMK | Proteína quinase dependente de cálcio Ca ⁺² /Calmodulina |
| CRH | Hormônio liberador de corticotrofina (<i>corticotropin-releasing hormone</i>) |
| DA | Dopamina |
| DAT | Transportador de Dopamina |
| Dexa | Dexametasona |
| DSM-5 | Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5ª edição |
| DSM-V | Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 4ª edição |
| EPM | Erro padrão da média |
| ERK | Quinase regulada por sinal extracelular |
| GDNF | Fator neurotrófico derivado da glia (<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>) |
| GR | Receptores de glicocorticóides (<i>glucocorticoid receptor</i>) |
| Grb-2 | (do inglês - <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>) |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade (<i>High-density lipoprotein</i>) |
| HF | Hipercolesterolemia Familiar |
| HHA | Hipotálamo-hipófise-adrenal |
| HMGR | 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA) |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IDL | Lipoproteínas de densidade intermediária (<i>intermediate-density lipoprotein</i>) |
| LDL | Lipoproteínas de baixa densidade (<i>low-density lipoprotein</i>) |
| LDL-/- | Homozigotos para depleção no gene que codifica a LDL |
| LDLr | Receptor de lipoproteína de baixa densidade (<i>low-density lipoprotein receptor</i>) |
| LRP | Proteína relacionado ao receptor LDL |
| LTD | Depressão de longa duração |
| LTP | Potenciação de longa duração |
| LXR | Receptores hepáticos ativados por X |
| MAO | Monoamina oxidase |

| | |
|----------------|---|
| MAO-A | Monoamina oxidase A |
| MAO-B | Monoamina oxidase B |
| mbGR | Receptor de glicocórticoide (GR) membranar |
| m-CPP | Meta-clorofenilpiperazina |
| MEK | Quinase ativadora da MAP quinase |
| Met | Metionina |
| MR | Receptor mineralocorticóide |
| NGF | Fator de crescimento nervoso (<i>Nerve growth fator</i>) |
| NPC-1 | Niemamann-Pick C tipo 1 |
| NPC-2 | Niemamann-Pick C tipo 2 |
| NT-3 | Neurotrofina-3 |
| NT-4 | Neurotrofina-4 |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PI3K | fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase |
| PLCy | (do inglês – <i>Phospholipase C GAMA</i>) |
| PVN | Núcleo paraventricular (<i>paraventricular nucleus</i>) |
| Raf | Quinase específica para Ser/Thr |
| Rpm | Rotação por minuto |
| SER-1 | Elemento regulatório de esterol |
| SERT | Transportador de Serotonina |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNPs | Polimorfismos de nucleotídeo único |
| SOS | Fator de troca do nucleotídeo guanina |
| SREBP | Elemento regulado por esterol |
| TAG | Transtorno de ansiedade generalizada |
| TAS | Transtorno de ansiedade social |
| TEPT | Transtorno de estresse pós-traumático |
| TOC | Transtorno obsessivo compulsivo |
| TrkB FL | Receptor de tropomiosina quinase B fosforilado |
| TrkB | Receptor de tropomiosina quinase B (<i>Tropomyosin receptor kinase B</i>) |
| Val | Valina |
| VLDL | Lipoproteínas de muito baixa densidade (<i>very-low-densisty lipoprotein</i>) |
| WT | Tipo selvagem (<i>Wild type</i>) |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 O COLESTEROL E SEU METABOLISMO PERIFÉRICO | 16 |
| 1.2 SÍNTESE E METABOLISMO DE COLESTEROL NO SNC | 18 |
| 1.3 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR..... | 20 |
| 1.3.1 Alterações comportamentais e neurológicas em pacientes com HF | 23 |
| 1.4 MODELO ANIMAL DA HF | 24 |
| 1.5 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E COMPORTAMENTOS SOCIAIS | 25 |
| 1.5.1 Ansiedade em modelos animais | 27 |
| 1.5.2 Relação do colesterol com a ansiedade | 29 |
| 1.6 ESTRESSE E RECEPTORES DE GLICOCORTICOIDES | 30 |
| 1.6.1 Protocolos de indução de estresse em animais e comportamentos associados à ansiedade | 33 |
| 1.7 O PAPEL DO BDNF E TRKB NA SOBREVIVÊNCIA NEURONAL E SUA RELAÇÃO COM A ANSIEDADE | 34 |
| 1.8 ALTERAÇÕES NO SNC OBSERVADAS EM CAMUNDONGOS COM A DELEÇÃO DO LDLR | 39 |
| 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES | 42 |
| 3 OBJETIVO | 43 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 43 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 4.1. ANIMAIS | 44 |
| 4.2 DESENHOS EXPERIMENTAIS | 44 |
| 4.3 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS: EXPERIMENTOS IN VIVO | 45 |
| 4.3.1 Teste do Campo aberto | 46 |
| 4.3.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado | 46 |
| 4.3.3 Teste de esconder esferas | 47 |
| 4.3.4 Sociabilidade no campo aberto | 48 |
| 4.3.5 Teste das três câmaras | 49 |
| 4.3.6 Avaliação de parâmetros relacionados ao bem-estar geral dos animais | 50 |
| <i>4.3.6.1 Avaliação do peso corporal</i> | <i>50</i> |
| 4.4 COLETA DE SANGUE E DE ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS | 50 |
| 4.5 PROTOCOLOS BIOQUÍMICOS: EXPERIMENTOS EX VIVO | 51 |
| 4.5.1 Quantificação do colesterol sérico por teste colorimétrico | 51 |
| 4.5.2 Quantificação dos níveis de corticosterona no sangue por ELISA | 51 |
| 4.5.3 Imunodeteção de proteínas por Western Blotting | 52 |
| <i>4.5.3.1 Preparação de amostras</i> | <i>53</i> |
| <i>4.5.3.2 Dosagem de proteínas</i> | <i>54</i> |
| <i>4.5.3.3 Eletroforese e eletrotransferência</i> | <i>54</i> |
| <i>4.5.3.4 Imunodeteção de proteínas</i> | <i>55</i> |
| <i>4.5.3.5 Quantificação dos níveis de proteínas</i> | <i>55</i> |

| | |
|--|------------|
| 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 55 |
| 5 RESULTADOS..... | 57 |
| 5.1 ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO NOS ANIMAIS WT E LDLR-/- MACHOS E FÊMEAS | 57 |
| 5.1.1 Avaliação do comportamento locomotor e tipo-ansioso – Protocolo II-A | 57 |
| 5.1.2 Avaliação do comportamento relacionado à ansiedade social em animais submetidos ao estresse agudo de contenção– Protocolo II-B | 60 |
| 5.1.3 Variação de peso durante o protocolo de estresse agudo de contenção - Protocolo II-A | 61 |
| 5.1.4 Quantificação dos níveis de colesterol e corticosterona séricos – Protocolo II-A ... | 62 |
| 5.1.5 Avaliação neuroquímica das amostras encefálicas de córtex pré-frontal e hipocampo de animais LDLr-/- e WT <u>naive</u> | 63 |
| 5.1.6 Avaliação neuroquímica das amostras encefálicas de córtex pré-frontal e hipocampo de animais LDLr-/- e WT e submetidos ao estresse agudo de contenção..... | 67 |
| 5.2 SENSIBILIDADE DOS ANIMAIS LDLR-/- MACHOS E FÊMEAS AO ESTRESSE CRÔNICO COM DEXAMETASONA..... | 73 |
| 5.2.1 Avaliação comportamental dos animais submetidos ao estresse crônico com dexametasona..... | 73 |
| 5.2.2 Variação de peso durante o protocolo de estresse crônico por administração de Dexametasona..... | 81 |
| 5.2.3 Quantificação do colesterol e corticosterona séricos dos animais submetidos ao estresse crônico..... | 81 |
| 5.2.4 Avaliação de parâmetros neuroquímicos das amostras encefálicas de córtex pré-frontal e hipocampo de animais LDLr-/- e WT submetidos ao estresse crônico..... | 82 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 89 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 102 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 103 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 O COLESTEROL E SEU METABOLISMO PERIFÉRICO

O colesterol é um esterol, um tipo de lipídio, formado por 4 grupos esteróis com ligações trans, caracterizado por sua natureza hidrofóbica. Por essas características, ele é um componente fundamental das membranas celulares dos mamíferos, desempenhando um papel crucial na estabilidade estrutural das membranas biológicas. Além disso, o colesterol participa como precursor na síntese de hormônios esteroides (como o cortisol ou a corticosterona em roedores), da vitamina D, dos ácidos biliares, e desempenha um papel crítico nos processos de sinalização e proliferação celular. O colesterol pode ser obtido diretamente da alimentação e pode ser sintetizado endogenamente no fígado a partir da acetilCoA (WANG *et al.*, 2017, NELSON; COX, 2014). O colesterol é uma molécula vital para a função celular, no entanto sua natureza hidrofóbica apresenta desafios para o transporte dentro do ambiente aquoso da corrente sanguínea e fluido extracelular. Por conta disso, o colesterol é transportado pelo sangue por lipoproteínas, que são complexos macromoleculares compostos por lipídeos e proteínas específicas (apoproteínas) que atuam no transporte, reconhecimento e metabolismo dos lipídeos entre os tecidos (NELSON; COX, 2014).

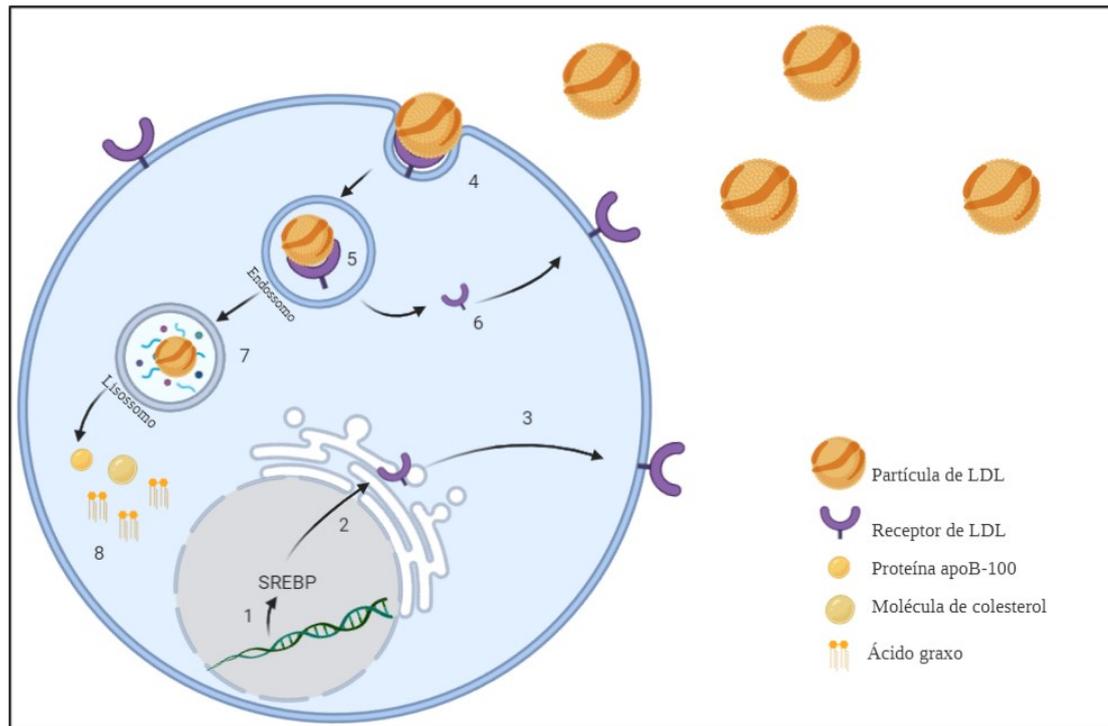
Existem diferentes lipoproteínas transportadoras de colesterol. Os quilomícrons são as lipoproteínas maiores e menos densas, que contém 90% de triacilgliceróis (TAG), 2% de proteína, 3% de fosfolípideo e 5% de colesterol, são sintetizados a partir dos lipídeos vindos da dieta, no retículo endoplasmático das células epiteliais que recobrem a superfície interna do intestino delgado (HOKKANEN; TIRRONEN; YLÄ-HERTTUALA, 2019). Existem diversas apolipoproteínas nas lipoproteínas, como a apoB-48, apoB-100, apoE, apoD apoC-I apoC-II, apoC-III. A função da apoC-II é ativar a enzima lipase lipoproteica nos capilares dos tecidos adiposo, cardíaco e muscular esquelético, quebrando o triacilglicerol do interior dos quilomícrons em ácidos graxos livres de glicerol. Os ácidos graxos são então transportados via transportadores específicos (como o CD36) até o interior do adipócito, célula muscular cardíaca e esquelética (NELSON; COX, 2014).

Quando há uma dieta rica em ácidos graxos e essa ultrapassa o necessário para uso imediato, eles são convertidos em TAG no fígado e empacotados em constituinte de lipoproteínas ricas em TAG, colesterol, ésteres de colesterol, apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE, formando as lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês: *very-low-density lipoprotein-VLDL*) (NELSON; COX, 2014; SPARKS; SPARKS, 2013). A perda dos TAG das

VLDL pela ação das lipases nas paredes dos capilares, converte parte das VLDL em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL do inglês: *intermediate-density lipoprotein*) e com a remoção de mais triacilgliceróis, em lipoproteínas de baixa densidade (*low-density lipoprotein* - LDL) (NELSON; COX, 2014). As partículas de LDL são ricas em colesterol e ésteres do colesterol, cerca de dois terços dela são removidas por receptores hepáticos (mediado por receptor que reconhece a apoB-100 da LDL), o fígado por sua vez pode utilizar o colesterol para a síntese de ácidos biliares, hormônios esteroides e VLDL. Porém um terço das LDL são captadas pelos tecidos, fornecendo colesterol para síntese de hormônios esteroides e para as membranas celulares (GOLDSTEIN; BROWN, 2009).

Um mecanismo crucial para o transporte de colesterol para as células é a endocitose mediada por receptores, particularmente, envolvendo receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLr). As partículas de LDL, que transportam o colesterol na corrente sanguínea, ligam-se aos LDLr na superfície celular. A formação do complexo LDL e seu receptor inicia uma série de eventos que facilitam a internalização do colesterol na célula. Esse processo é bem regulado, pois as células controlam rigidamente a expressão dos LDLr com base em suas necessidades de colesterol (Figura 1) (NELSON; COX, 2014). Os LDLr, na superfície celular, ligam-se às partículas de LDL que circulam na corrente sanguínea. O complexo receptor-LDL é então internalizado na célula por meio de poços revestidos de clatrina, formando endossomos iniciais. À medida que os primeiros endossomos amadurecem, eles finalmente se fundem com os lisossomos, onde os ésteres de colesterol no LDL são hidrolisados, liberando colesterol livre na célula (JOHNSON *et al.*, 2023). Uma vez no meio intracelular, o colesterol é distribuído e utilizado para diferentes processos celulares, enquanto o excesso de colesterol é armazenado como ésteres de colesterol ou expelido da célula por meio de mecanismos de efluxo (NELSON; COX, 2014).

Figura 1: Esquema da internalização da LDL na célula.



Legenda: 1- Aumento da síntese do fator de transcrição SREBP (do inglês - *Sterol regulatory element-binding proteins*), que sinaliza ao retículo endoplasmático para sintetizar o receptor para LDL (lipoproteína de baixa densidade). 2- O receptor LDL é sintetizado no retículo endoplasmático. 3- O receptor de LDL é externalizado na membrana plasmática. 4- O receptor de LDL reconhece a proteína apoB-100 da LDL. 5- A partícula de LDL, juntamente com o receptor, são endocitados por meio de um endossomo para o meio intracelular. 6- O receptor desacopla da LDL e retorna para a membrana plasmática para reciclar sua função. 7- No citoplasma celular, a partícula de LDL funde-se com o lisossomo, que contém enzimas que irão hidrolisar os ésteres de colesterol. 8- Liberando assim o colesterol e os ácidos graxos, bem como a proteína apoB-100 que é degradada em aminoácidos. Fonte: Figura elaborada pela autora com o software *BioRender*. Modificado de Nelson; Cox (2014).

1.2 SÍNTESE E METABOLISMO DE COLESTEROL NO SNC

A quantidade de colesterol no encéfalo é cerca de 25% de todo o colesterol do corpo humano, considerado o órgão mais rico em colesterol. O colesterol não esterificado é o principal esterol no encéfalo adulto, sendo que cerca de 70 a 80% está localizado nas bainhas de mielina formadas pelos oligodendrócitos (DIETSCHY; TURLEY, 2004). Em neurônios, a nível pré-sináptico, o colesterol é responsável por regular a fluidez, espessura e permeabilidade das membranas celulares, além de regular a síntese, formação e liberação de vesículas sinápticas. Já em nível pós-sináptico, o colesterol tem a função de formar microdomínios chamados “*lipid rafts*” (balsas lipídicas) onde há a organização e alta expressão dos receptores para neurotransmissores, fatores neurotróficos e canais iônicos. Portanto, o colesterol é crucial para as propriedades biofísicas da membrana, para a iniciação, propagação e manutenção da transdução de sinal de dos sistemas de neurotransmissão (BORRONI; VALLÉS;

BARRANTES, 2016). Além disso, o metabolismo neuronal do colesterol é responsável pelo aumento do crescimento dendrítico, influenciando os processos de aprendizado e memória (CHEON *et al.*, 2023).

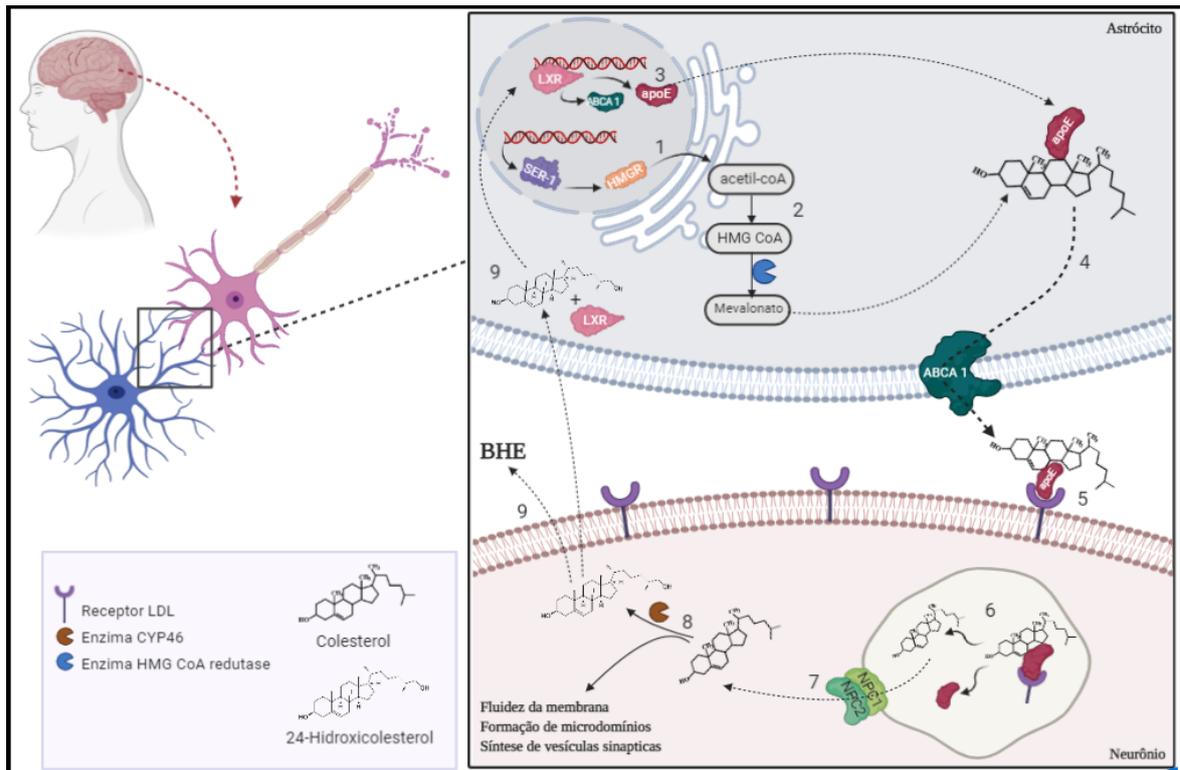
O metabolismo do colesterol no encéfalo é separado da periferia através da barreira hematoencefálica (BHE) (ZHANG; LIU, 2015), sendo os astrócitos os principais responsáveis por produzir o colesterol no SNC na vida adulta (PFRIEGER, 2003). Estudos demonstraram que o colesterol ligado a apoE, secretado pelos astrócitos, aumenta consideravelmente as respostas sinápticas induzidas em cultura neuronal, elevando funções pré-sinápticas e a diferenciação dendrítica (CHRISTOPHERSON *et al.*, 2005; MAUCH *et al.*, 2001). Em culturas neuronais com presença de astrócitos foi mostrado que o colesterol induz um aumento de cerca de 10 vezes na atividade sináptica excitatória (ZHANG; LIU, 2015).

Os astrócitos sintetizam o colesterol por meio de diversas reações, ilustradas na Figura 2. Após ser sintetizado nos astrócitos, o colesterol é carregado através da proteína apoE, o qual é internalizado pelos neurônios via LDLr, sendo este um dos mecanismos de internalização do colesterol na célula neuronal (Figura 2) (CHEON *et al.*, 2023).

A família de LDLr representa a principal via de transporte do complexo apoE-colesterol para o interior celular, e incluem o LDLr, receptor de VLDL, apoER2/LRP8, LRP4, LRP, LRP2, LRP1B, LRP5/LRP6 e LRP11/SORL1 (HERZ, 2009; POTTIER *et al.*, 2012). Entre eles, o LDLr e o LRP1 são os principais receptores para a captação de colesterol ligado à proteína apoE no cérebro, sendo que o LRP1 é mais expresso em neurônios e o LDLr é mais expresso em células gliais. Em caso de deleção do LDLr, como em modelos animais que serão tratados posteriormente, acontece um aumento nos níveis de apoE no encéfalo e no líquido cefalorraquidiano (MAHLEY, 2016).

No meio intracelular, o colesterol é direcionado para suas inúmeras funções ou convertido em 24-hidroxicolesterol (24-OH), esse metabólito do colesterol pode cruzar a BHE, sendo liberado no plasma via fluido cérebro espinal, que é a principal rota de eliminação do colesterol do SNC. Esse metabólito, juntamente com seus derivados, como o 27-OH, são chamados de oxisteróis, derivados oxidados do colesterol, sendo capazes de transpassar membranas lipofílicas (BJÖRKHEM, 2008).

Figura 2: Síntese e metabolismo do colesterol no SNC.



Legenda: **1**- O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático dos astrócitos pela ação da HMGR, a qual é regulada, por retroalimentação negativa via proteína de ligação, a elemento regulado por esterol (SREBP), que se liga ao elemento regulatório de esterol (SER-1) no gene da HMGR. **2** – A acetil coenzima A (Acetil CoA) é convertida em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG CoA) no citoplasma celular, seguido pela conversão do HMG-CoA em mevalonato pela ação da enzima HMG-CoA redutase, no retículo endoplasmático. Após outras transformações, ocorre as reduções da molécula para colesterol. **3** - A Apolipoproteína E (apoE) é sintetizada a partir da expressão gênica de receptores hepáticos ativados por X (LXR), o qual também induz a síntese de ABCA 1. **4** - O colesterol então se liga à apoE e é secretado pelos astrócitos via transportadores de cassete de ligação ao ATP (ABCA1). **5** - O complexo colesterol-apoE é internalizado pelos neurônios via receptores LDL. **6** - O colesterol é liberado a partir das lipoproteínas dentro de lisossomos neuronais. **7** – Posteriormente, o colesterol é transportado por proteínas Niemann-Pick C tipo 1 (NPC1) e tipo 2 (NPC 2) para o citoplasma. **8** - No citoplasma o colesterol direcionado para suas inúmeras funções celulares ou convertido em 24-hidroxicolesterol (24-OH) por uma enzima membro da família do citocromo P450, a CYP46. **9** - Este metabólito pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) via líquido cefalorraquidiano, como também pode se ligar aos receptores hepáticos ativados por X (LXR), que se translocam para o núcleo e induzem a expressão dos genes apoE e ABCA 1 nos astrócitos, favorecendo o fornecimento de colesterol para os neurônios. Fonte: Figura elaborada pela autora com o software *BioRender*. Modificado de Björkhem (2008); Pfrieger; Ungerer (2011). Acetil CoA – Acetil coenzima A; HMG CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; apoE – Apolipoproteína E; LCR – receptores hepáticos ativados por X; ABCA1 – Transportadores de cassete de ligação ao ATP; LDL – Lipoproteína de baixa densidade; NPC1 e 2 – Proteínas Niemann-Pick C tipo 1 e 2; 24-OH – 24-hidroxicolesterol; BHe – Barreira hematoencefálica; CYP46 – Enzima do citocromo P46; Ser-1 – Elemento regulatório de esterol; SREBP – elemento regulado por esterol.

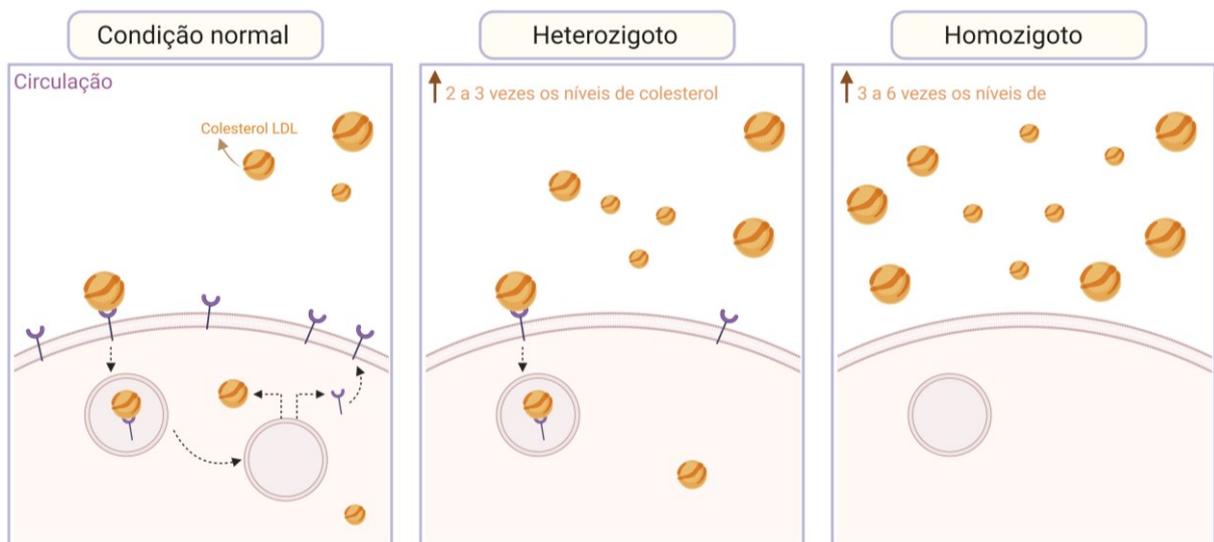
1.3 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma das doenças dislipidêmicas de origem genética mais comum na população, apresentando um padrão hereditário autossômico dominante caracterizado por níveis elevados do colesterol LDL (ALVES; SUEHIRO JUNIOR; PELLEGRINO, 2021). A doença pode se apresentar na forma homozigótica ou heterozigótica

(GOLDBERG *et al.*, 2011; MYTILINAIYOU *et al.*, 2018), entre as mutações que podem levar a HF, a principal está relacionada ao gene que codifica o LDLr (sabe-se hoje que existem mais de 1800 mutações nesse gene). Pacientes que herdaram apenas um alelo mutado são considerados heterozigotos para o gene, acarretando uma redução parcial na função do LDLr e a consequente elevação na concentração sérica de colesterol, entre 2 a 3 vezes. Já nos casos homozigotos, quando se é herdado dois alelos mutados, há perda total da função do receptor e consequente elevação de 3 até 6 vezes nos níveis de colesterol (USIFO *et al.*, 2012; FALUDI *et al.*, 2017) (Figura 3).

Estudos epidemiológicos sugerem que a forma heterozigótica apresenta uma grande variabilidade na prevalência mundial, que pode estar associada à etnia da população avaliada, enquanto a forma homozigótica varia de 1:311 na população em geral, a forma homozigótica é mais rara e apresenta uma menor prevalência, cerca de 1:250.000 a 1:1.000.000 dependendo do país (MABUCHI *et al.*, 1977; SEFTEL *et al.*, 1989, ALVES; SUEHIRO JUNIOR; PELLEGRINO, 2021). Nos Estados Unidos estima-se uma prevalência de 1:250, na Dinamarca a prevalência é de 1:217 e na África do Sul é de apenas 1:70 indivíduos (VAEZI; AMINI, 2023).

Figura 3: Representação da genética envolvida na Hipercolesterolemia Familiar.



Legenda: A figura representa, no primeiro quadro, a condição normal dos indivíduos, onde há uma quantidade de receptores de LDL na membrana das células e a consequente captação constante do colesterol. Já casos heterozigóticos para HF, como o segundo quadro mostra, há uma diminuição dos receptores LDL na membrana, aumentando 2 a 3 vezes os níveis de colesterol circulantes. Já no terceiro quadro, o caso mais raro, hemizigótico para HF está representado, onde acontece a deleção total da função do receptor LDL e o aumento drástico nas concentrações de colesterol circulantes. Fonte: Da autora (2023).

Dados recentes demonstram que no Brasil, um país de etnia heterogênea, a prevalência da HF heterozigótica é de 1:263 (HARADA *et al.*, 2018), sendo que essa prevalência varia de acordo com o sexo (0,38% em mulheres e 0,30% em homens), raça (0,25% em brancos, 0,47% em etnia mista e 0,67% em negros) e idade (0,10% de 35-45 anos, 0,42% de 46-55 anos, 0,60% de 56-65 anos e 0,26% de 66-75 anos) (ALVES; SUEHIRO JUNIOR; PELLEGRINO, 2021). Diferenças entre os sexos também ocorrem nos sintomas apresentados pelos pacientes com HF, por exemplo, a prevalência maior de doença cardiovascular prematura em homens (18,8%) com HF heterozigótica do que em mulheres (12,9%), além das mulheres apresentarem menos fatores de risco como tabagismo, hipertensão e diabetes (SCHREUDER *et al.*, 2023).

De acordo com a Associação Americana de Cardiologia, para uma boa saúde cardiovascular é necessária a manutenção dos níveis plasmáticos de colesterol total inferiores a 200 mg/dL para adultos e 170 mg/dL para crianças (MOZAFFARIAN *et al.*, 2016). A Sociedade Brasileira de Cardiologia estabeleceu que níveis desejáveis de colesterol total para adultos é inferior a 190 mg/dL, e menor de 170 mg/dL para crianças. Os níveis ideais de LDL variam de inferior a 130 mg/dL (para pessoas que apresentam baixo risco de doenças cardiovasculares) até inferior a 100 mg/dL (para pessoas que apresentam alto risco). Sendo que um valor igual ou superior a 160 mg/dL de LDL já é considerado como um quadro de hipercolesterolemia (FALUDI *et al.*, 2017). Segundo as *Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e prevenção da aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia*, o quadro de HF se dá pelos sinais clínicos de depósitos extravasculares de colesterol, níveis superiores a 330 mg/dL de LDL no sangue em conjunto com histórico familiar das doenças e identificação de mutações e polimorfismos genéticos no gene do LDLr, da proteína ApoB100 ou a enzima PCSK9 que favoreçam o desenvolvimento da HF (FALUDI *et al.*, 2017, VAEZI; AMINI, 2023).

Como comentado anteriormente, o colesterol é uma molécula muito importante para diversas funções intracelulares, porém a principal mutação da HF impede a internalização de grande parte do colesterol (em casos homozigóticos) na célula. Contudo, existem mecanismos compensatórios que irão ser ativados a fim de regular essa diminuição de colesterol para dentro das células. Uma dessas vias de compensação é a regulação positiva de proteínas relacionadas ao LDLr, onde na ausência de receptores de LDL funcionais, as células podem aumentar a expressão de proteínas relacionadas ao receptor de LDL, como LRP1 (proteína 1 relacionada ao receptor de LDL) e LRP2/megalina. Esses LRPs podem facilitar a absorção de lipoproteínas, incluindo partículas de LDL, compensando assim a deficiência na internalização do colesterol mediada pelo LDLr (KRIEGER; HERZ, 1994).

Outro possível mecanismo é a síntese aumentada de colesterol, onde as células podem regular positivamente a síntese de colesterol *de novo* para compensar a absorção reduzida de colesterol. Isso envolve a ativação da via SREBP, que leva à regulação positiva da transcrição de genes envolvidos na biossíntese do colesterol, incluindo a HMG-CoA redutase (GOLDSTEIN *et al.*, 2006). Pode acontecer também a captação do colesterol mediada por receptores *scavenger*, como CD36 e SR-B1, em células sem LDLr funcionais. Esses receptores facilitam a captação de lipoproteínas modificadas, incluindo partículas de LDL oxidadas. Embora a captação mediada por receptores *scavenger* possa contribuir para o influxo de colesterol, ela também pode promover o acúmulo de ésteres de colesterol e a formação de células espumosas (MOORE; TABAS, 2011). Alternativamente, as células podem ativar as vias de efluxo de colesterol a fim de manter a homeostase do colesterol. Os transportadores de cassete de ligação de ATP, particularmente ABCA1 e ABCG1, desempenham papéis críticos na mediação do efluxo de colesterol para lipoproteínas de alta densidade (HDL) e outros receptores para transporte de volta ao fígado (TANG; ORAM, 2012).

1.3.1 Alterações comportamentais e neurológicas em pacientes com HF

Além das alterações periféricas, ocorrem alterações neurológicas e neuropsiquiátricas, em particular, o declínio cognitivo em pacientes com HF (SUÁREZ BAGNASCO, 2017). O primeiro relato de prejuízos cognitivos relacionado à memória foi em um estudo espanhol, que demonstrou índices de declínio cognitivo entre pacientes com HF e controles. Os pacientes com HF apresentavam um alta taxa de comprometimento cognitivo (ZAMBÓN *et al.*, 2010). Mesmo em populações de pacientes jovens com HF, entre 18 e 40 anos, é observado comprometimento cognitivo (SUÁREZ BAGNASCO, 2017), possivelmente sugerindo que esse comprometimento cognitivo não seja uma consequência do envelhecimento, como em outros tipos de demência (CHAN *et al.*, 2022).

A relação da HF com prejuízos cognitivos relacionados à memória vem sendo confirmada em estudos posteriores (ARIZA *et al.*, 2016; CRUZ-SANCHEZ *et al.*, 2008; GAROLERA *et al.*, 2016; HYTTINEN *et al.*, 2010). O estudo de Todate *et al.* (2019) usou técnicas de imagens de ressonância magnética cerebral de alta resolução para investigar os efeitos da HF em tecido cerebral, demonstrando uma prevalência significativa em danos cerebrais como infarto lacunar, e hiper intensidade profundas da substância branca, além de micro sangramento e atrofia cerebral, quando comparando pacientes com HF e controle.

Por outro lado, a relação da HF com transtornos de humor, como depressão e com transtornos de ansiedade, é ainda controversa. AKIOYAMEN *et al.* (2018) em sua meta-análise indicou que indivíduos com HF apresentam sintomas de ansiedade reduzidos em comparação com indivíduos sem a doença (AKIOYAMEN *et al.*, 2018). Chan *et al.* (2022) demonstrou que 32% dos pacientes com HF de seu estudo apresentam ansiedade, assim como 25% apresentam sintomas depressivos. Porém, não se tem dado a devida atenção para sintomas psiquiátricos em pacientes com HF quando não relacionada à ansiedade do desenvolvimento da HF, sendo que os sintomas de humor e ansiedade geralmente são relacionados à carga psicológica associada à manifestação dos sintomas na HF (CHAN *et al.*, 2022). Existem evidências de que pacientes com mania (SAGUD *et al.*, 2007) e transtorno de ansiedade generalizada (PETER *et al.*, 1999) apresentam níveis de colesterol sérico e LDL mais baixos do que indivíduos controle (PETER *et al.*, 2002). No entanto, é importante a condução de novos estudos investigando a ansiedade em paciente com diagnóstico confirmado de HF para desvendar as controvérsias acerca desse assunto.

1.4 MODELO ANIMAL DA HF

Para o estudo pré-clínico da HF é utilizado, entre outros modelos, os camundongos com deleção gênica no LDLr, desenvolvidos em 1993 a partir de manipulação genética realizada por Ishibashi e colaboradores (ISHIBASHI *et al.*, 1993). Esses animais apresentam um quadro de hipercolesterolemia, com aumento moderado no colesterol LDL quando alimentados com dieta padrão, podendo também desenvolver lesões ateroscleróticas com o avanço da idade. No entanto, quando submetidos a uma dieta hiperlipídica, acabam se tornando extremamente hipercolesterolêmicos e com grande desenvolvimento de aterosclerose aórtica e xantomas cutâneos (ISHIBASHI *et al.*, 1993; ZADELAAR *et al.*, 2007). Segundo Zadelaar *et al.* (2007), as principais características que tornam esse modelo ótimo para pesquisas pré-clínicas envolvendo a HF são:

- Semelhança biológica à condição humana da HF, causada por mutações no gene que codifica o LDLr;
- Perfil de lipoproteínas plasmáticas se assemelha ao de humanos, estando a maior parte do colesterol confinado na fração LDL;
- Grau de dislipidemia intermediário, desenvolvendo lesões menos avançadas do que outros modelos animais da HF, como os camundongos apoE^{-/-}.

1.5 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E COMPORTAMENTOS SOCIAIS

As respostas comportamentais relacionadas à ansiedade estão associadas à vigilância excessiva, que pode ocorrer com ou sem a existência de um perigo iminente, com a percepção de uma antecipação de ameaça futura (MACLEOD; RUTHERFORD, 1992, APA, 2014). O medo é desencadeado como reação a uma ameaça concreta e específica, podendo ser real ou percebida, que em mamíferos tem um caráter adaptativo e protetor e respostas comportamentais de luta e fuga (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). Entretanto, os transtornos de ansiedade diferem dos comportamentos de medo ou ansiedade por serem de grande intensidade e persistirem por períodos prolongados, prejudicando a funcionalidade e a qualidade de vida dos indivíduos (APA, 2014).

Apesar de terem em comum sintomas de hipervigilância, os transtornos de ansiedade são condições heterogêneas de acordo com o tipo de estímulo desencadeador. Atualmente, os transtornos de ansiedade são classificados clinicamente conforme o *Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais*, 5ª edição (DSM-5) da Associação Americana de Psiquiatria, os quais compreendem os transtornos de ansiedade generalizada, de ansiedade de separação, o mutismo seletivo, as fobias específicas, os transtornos de pânico, transtorno de ansiedade social, agorafobia, os transtornos de ansiedade induzidos por medicamentos ou devido a outra condição médica (APA, 2014)¹. Anteriormente, no DSM-IV, o transtorno obsessivo compulsivo (TOC), e os transtornos de estresse pós-traumático (TEPT), estavam agrupados junto aos transtornos de ansiedade (APA, 2002)², porém, no DSM-5 eles ganharam capítulos separados devido as características diagnósticas envolverem diversos outros fatores específicos (APA, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que há cerca de 57,2 milhões (21%) de pessoas com algum transtorno mental nas Américas (OMS, 2015). Mais recentemente, em 2019, a OMS identificou o Brasil como o país com o maior número de pessoas com transtornos de ansiedade do mundo, com cerca de 18,5 milhões de brasileiros (9,3% da população do país). Mundialmente, segundo a OMS, quase um bilhão de pessoas – incluindo 14% dos adolescentes do mundo – viviam com um transtorno mental em 2019. Nos dados atuais da OMS estima-se que, com a pandemia de COVID-19 em 2020, aumentou 25,6% os casos de transtornos de ansiedade no mundo. Sendo que as mulheres foram mais acometidas

¹ APA – American Psychiatric Association. *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*- DSM. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

² APA – American Psychiatric Association. *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*- DSM. IV ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

do que os homens, e os mais jovens (20-24 anos), foram mais afetados do que os adultos mais velhos. Conseqüentemente, a porcentagem da população brasileira com ansiedade deve ter aumentado nos últimos anos (WHO, 2022).

Os transtornos de ansiedade atingem uma variedade de vias fisiológicas, havendo relação com distúrbios neuroendócrinos, de neurotransmissores e neuroanatômicos. O sistema límbico, como as regiões corticais frontais e do lobo temporal do encéfalo regulam a tomada de decisões, emoções e o comportamento (MARTIN *et al.*, 2009). O hipocampo é uma estrutura do sistema límbico importante para aspectos cognitivos e emocionais (WANG *et al.*, 2020), exercendo controle inibitório sobre o sistema de resposta ao estresse hipotalâmico (que será abordado mais para frente). A amígdala também faz parte do sistema límbico, regulando a expressão do medo e da agressão e é responsável pelo comportamento defensivo, além de ter papel na formação e recuperação de memórias emocionais principalmente relacionadas ao medo (MARTIN *et al.*, 2009), a ativação aberrante da amígdala e a conectividade com outras regiões encefálicas têm sido associadas a sintomas de ansiedade (KLUMPERS *et al.*, 2017). Concomitantemente, alterações no córtex pré-frontal, responsável pela regulação emocional e controle cognitivo, contribuem para dificuldades na regulação emocional e comportamentos relacionados à ansiedade (MILAD; RAUCH, 2012).

O sistema monoaminérgico desempenha um papel significativo na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade, sendo também o principal alvo sistêmico para os fármacos existentes hoje (RANG; DALE, 2012). Disfunções na neurotransmissão serotoninérgica, incluindo alterações nos subtipos de receptores e transportadores de recaptção, foram implicadas em comportamentos relacionados à ansiedade (MILLAN *et al.*, 2020). Estudos recentes mostraram expressão e sinalização alteradas de receptores de dopamina em regiões cerebrais envolvidas no processamento emocional e regulação da ansiedade (MCLAUGHLIN *et al.*, 2019). Da mesma forma, distúrbios no sistema de ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório, foram associados ao aumento da ansiedade e à diminuição da extinção do medo (ROSENKRANZ *et al.*, 2018). Descobriu-se que marcadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, estão elevados em indivíduos ansiosos, sugerindo uma ligação entre ativação imunológica e ansiedade (KALKMAN, 2019). Pode-se notar então que a fisiopatologia dos transtornos de ansiedade envolve várias vias e mecanismos que ainda precisam ser estudados e interligados.

Nos mamíferos, o comportamento social é considerado um dos mais complexos, devido à capacidade destes indivíduos de uma comunicação baseada na interpretação dos sinais sociais e suas respostas. As regiões do encéfalo que interpretam e controlam o comportamento social

são principalmente o córtex pré-frontal medial, amígdala, ínsula anterior, córtex cingulado anterior, giro frontal inferior e sulco temporal superior. (BARAK E FENG, 2016). Existem categorias de comportamento social, que variam de tendências sociais iniciais, como o caso da personalidade proativa, e o comportamento social relacionado com reprodução. Diferentes comportamentos sociais podem evocar diferentes circuitos encefálicos, nesse contexto, a ativação do eixo HHA pode diferir dependendo do tipo de comportamento social. Por exemplo, a sociabilidade proativa está relacionada negativamente à atividade do eixo HHA, já a alta reatividade do eixo HHA está relacionada a uma personalidade menos social. Esse comportamento proativo se relaciona ao nível de sociabilidade, em que indivíduos mais proativos (ousados e exploradores) tendem a ser mais sociáveis do que os indivíduos reativos (tímidos e medrosos) (RAULO; DANTZER, 2018).

A sociabilidade é um comportamento bastante afetado em diferentes transtornos de ansiedade. Contudo, existe um transtorno de ansiedade específico causado por alterações nas interações sociais, conhecido como transtorno de ansiedade social (APA, 2014). A sociabilidade é um comportamento com grande relação com o eixo HHA, assim como os transtornos de ansiedade, além disso sabe-se que a predisposição ao comportamento antissocial em humanos está ligada tanto aos fatores ambientais (como maus tratos e abuso físico na infância) quanto a alterações neurobiológicas, como a baixa atividade da enzima MAO-A, recorrente a uma resposta genética (BYRD E MANUCK, 2014; SAMOCHOWIEC *et al.*, 1999, NILSSON *et al.*, 2015; FERGUSSON *et al.*, 2011; FERGUSSON *et al.*, 2012).

Modelos animais, utilizando animais nocaute para MAO-A, também evidenciaram que a baixa atividade da MAO-A reduz os comportamentos sociais (SCOTT *et al.*, 2008). Bortolato *et al.* (2013) demonstraram que uma redução no número de abordagens sociais e menor frequência de atos de cheirar no teste de interação social com contato em animais nocautes para MAO-A em comparação a animais controle. Em conjunto, estes resultados indicam que a depleção genética da enzima MAO-A em camundongos pode reduzir o comportamento social. Engel *et al.* (2016) demonstraram que há um aumento na atividade da enzima MAO-A nos animais $LDLr^{-/}$, o que poderia ser um fator relevante para um aumento do comportamento social basal observado em resultados preliminares da autora.

1.5.1 Ansiedade em modelos animais

Os modelos animais são úteis na compreensão de mecanismos envolvidos na manifestação de comportamentos complexos. Contudo, não podemos falar que animais

apresentam transtornos de ansiedade, nem ao menos que apresentam sintomas de ansiedade, condição essencialmente humana. Em animais, o que conseguimos avaliar são comportamentos semelhantes à ansiedade, com respostas comportamentais fisiológicas. Deve ser destacado que os estudos pré-clínicos em roedores não buscam replicar todas as características e sintomas dos transtornos de ansiedade em humanos, mas sim mimetizar algumas características dos transtornos observados em humanos. Os roedores podem ser expostos a situações de aproximação-esquiva, por exemplo, a ambientes novos, iluminados, abertos e elevados, gerando impulsos de aversão não aprendidas, gerando conflitos incondicionados (CAMPOS *et al.*, 2013). O conflito de abordagem e esquiva que o animal apresenta frente a um espaço aberto, iluminado ou elevado, por exemplo, serve para inibir um comportamento contínuo do roedor, como a tendência em se envolver em atividades exploratórias ou investigação social (BAILEY; CRAWLEY, 2009).

Alguns paradigmas são utilizados para testes comportamentais, como teste do campo aberto, que possibilita a avaliação tanto da atividade locomotora total, quanto do comportamento relacionado à ansiedade, avaliados pela exploração da parte central e mais exposta do aparato (PRUT; BELZUNG, 2003). Os testes do labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987) e do labirinto zero elevado (SHEPHERD *et al.*, 1994) contêm braços abertos e fechados para medir a esquiva de lugares “desprotegidos”, como o caso dos braços abertos, já que os roedores tendem a evitar áreas abertas, preferindo lugares mais escuros e fechados. Esse conflito de abordagem se correlaciona com aumentos nos indicadores de estresse fisiológico (BAILEY; CRAWLEY, 2009). Testes como o da caixa de preferência claro e escuro se amparam na mesma premissa de que os animais tendem a ter menos medo de lugares escuros (BAILEY; CRAWLEY, 2009).

Assim como os outros transtornos de ansiedade, a ansiedade social não pode ser completamente modelada em roedores, porém usando paradigmas comportamentais é possível modelar a ansiedade de interação humana. Esses paradigmas podem variar de um medo a indivíduo específico, a medo geral de indivíduos desconhecidos, podendo ser gerado medo social específico sozinho ou relacionado ao aumento da ansiedade geral quando em lugares abertos, por exemplo (TOTH; NEUMANN, 2013). As relações sociais são algo bem complexo, existindo diversas categorias de comportamento social, uma delas tem relação com as tendências sociais iniciais, como o caso da personalidade proativa em mamíferos (RAULO; DANTZER, 2018). A sociabilidade proativa é a categoria que pode ser avaliada em roedores em paradigmas de testes comportamentais (O’TUATHEIGH *et al.*, 2007; DESBONNET *et al.*, 2012; KRISHNAN *et al.*, 2007, BERTON *et al.*, 2006). Esse comportamento proativo se

relaciona ao nível de sociabilidade, em que indivíduos mais proativos (ousados e exploradores) tendem a ser mais sociáveis do que os indivíduos reativos (tímidos e medrosos) (RAULO; DANTZER, 2018).

Para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade social, pode-se utilizar testes como sociabilidade no campo aberto ou teste das três câmaras, em que ambos são medidos os movimentos de um animal para longe ou perto de um animal novo e completamente desconhecido, para analisar a preferência ou esquia social O'TUATHEIGH *et al.*, 2007, KRISHNAN *et al.*, 2007, BERTON *et al.*, 2006).

1.5.2 Relação do colesterol com a ansiedade

Estudos mostram que pacientes que sofrem de transtorno do pânico, transtorno de ansiedade generalizada, TOC e TEPT, apresentam níveis mais elevados de colesterol do que indivíduos sem transtornos psiquiátricos (HAYWARD *et al.*, 1989; BAJWA *et al.*, 1992; KUCZMIERCZYK *et al.*, 1996; AGARGUN *et al.*, 1998; YAMADA *et al.*, 2001; PETER *et al.*, 2002). Observou-se em amostras de pacientes que os altos níveis de colesterol estão relacionados à quantidade de cortisol secretada após a administração de um antidepressivo, como a trazodona, que atua por meio da inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina. Segundo a literatura, o *meta*-clorofenilpiperazina (*m*-CPP), um metabólito deste antidepressivo, liga-se as receptores serotoninérgicos, resultando na estimulação do eixo HHA e a consequente secreção de cortisol em humanos (KAHN; WETZLER, 1991; TERA0 *et al.*, 2000b). Estes resultados indicam que uma sensibilidade maior dos receptores serotoninérgicos está relacionada a altos níveis de colesterol (PAPAKOSTAS *et al.*, 2004). Essa sensibilidade pode estar relacionada ao excesso de colesterol, o que pode interferir *indiretamente* na conformação e na função de proteínas e receptores ligados à membrana, reduzindo a fluidez da membrana do neurônio, alterando ou interrompendo a função das balsas lipídicas (regiões celulares fundamentais para a ativação de cascatas de sinais para a ativação de neurotransmissores) (OHVO-REKIKI *et al.*, 2002).

A manipulação dos níveis de colesterol na membrana tem sido relacionada com alteração de funções estruturais e fisiológicas de proteínas transmembrana, como DAT e SERT (MORISSETTE *et al.*, 2018), que são transportadores para dopamina e serotonina no terminal pré-sináptico das membranas relacionadas ao sistema monoaminérgico envolvido na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017). Foi demonstrado que o colesterol se liga ao DAT em dois locais diferentes, localizados em uma

bolsa hidrofóbica (PENMATSA *et al.*, 2013). Uma pesquisa demonstrou que o colesterol da membrana aumenta a ligação específica de DAT em regiões do encéfalo, como o núcleo caudado e putâmen, além do núcleo accumbens de macacos (MORISSETTE *et al.*, 2018). Enquanto Ferraro *et al.* (2016) relataram seis sítios de ligação de colesterol putativos no SERT. Em estudos *in vitro*, a depleção de colesterol induzida por estatina leva a uma diminuição na ligação específica do ligante ao receptor de serotonina 5-HT1A, envolvido na ansiedade (SHRIVASTAVA *et al.*, 2010).

Existem relatos de que baixos níveis de colesterol estão associados à personalidade antissocial (VIRKKUNEN, 1979, VIRKKUNEN, 1983). O LDL baixo foi associado ao aumento da hostilidade, que, junto com o aumento da ansiedade, gerou comportamentos violentos (AMORE *et al.*, 2008, PALMSTIERNA *et al.*, 1989). Outros estudos relacionam o tratamento com estatina com o desenvolvimento de comportamento agressivo e com ansiedade (CHAM *et al.*, 2016, SUNESON *et al.*, 2019).

Como mencionado na sessão anterior, o colesterol é uma molécula importante para conformação e função de proteínas e receptores na membrana plasmática. Relatos de que o colesterol em excesso pode alterar indiretamente essa conformação, reduzindo a fluidez da membrana neuronal e alterando ou interrompendo a função das *lipid rafts* (OHVO-REKIKKA *et al.*, 2002). O colesterol também se liga a canais iônicos, enzimas e receptores e afeta diretamente sua função (HAINES, 2002; OHVO-REKIKKA *et al.*, 2002). Esses efeitos com a influência direta ou indiretamente do colesterol, ocorrem nos receptores GABA-A, tanto com o aumento como com a depleção de colesterol nas membranas neuronais hipocâmpais (PAPAKOSTAS *et al.*, 2004).

Camundongos submetidos a uma dieta rica em colesterol apresentaram comprometimento psicomotor e comportamento semelhante à depressão, acompanhados por reduções nos níveis de serotonina no córtex e de dopamina no corpo estriado (PAUL *et al.*, 2017). Além de alterações nos sistemas envolvidos nos transtornos de ansiedade, o colesterol está envolvido disfunção cognitiva, processos neurodegenerativos e alterações psicomotoras. Para aprofundamento no assunto, ver a revisão de CHEON (2023).

1.6 ESTRESSE E RECEPTORES DE GLICOCORTICÓIDES

O sistema de resposta ao estresse nos mamíferos envolve duas vias fisiológicas distintas, porém correlacionada, no organismo. O sistema simpático-adrenomedular (SAM) e o sistema hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HHA) (GUNNAR *et al.*, 2007). O sistema SAM está

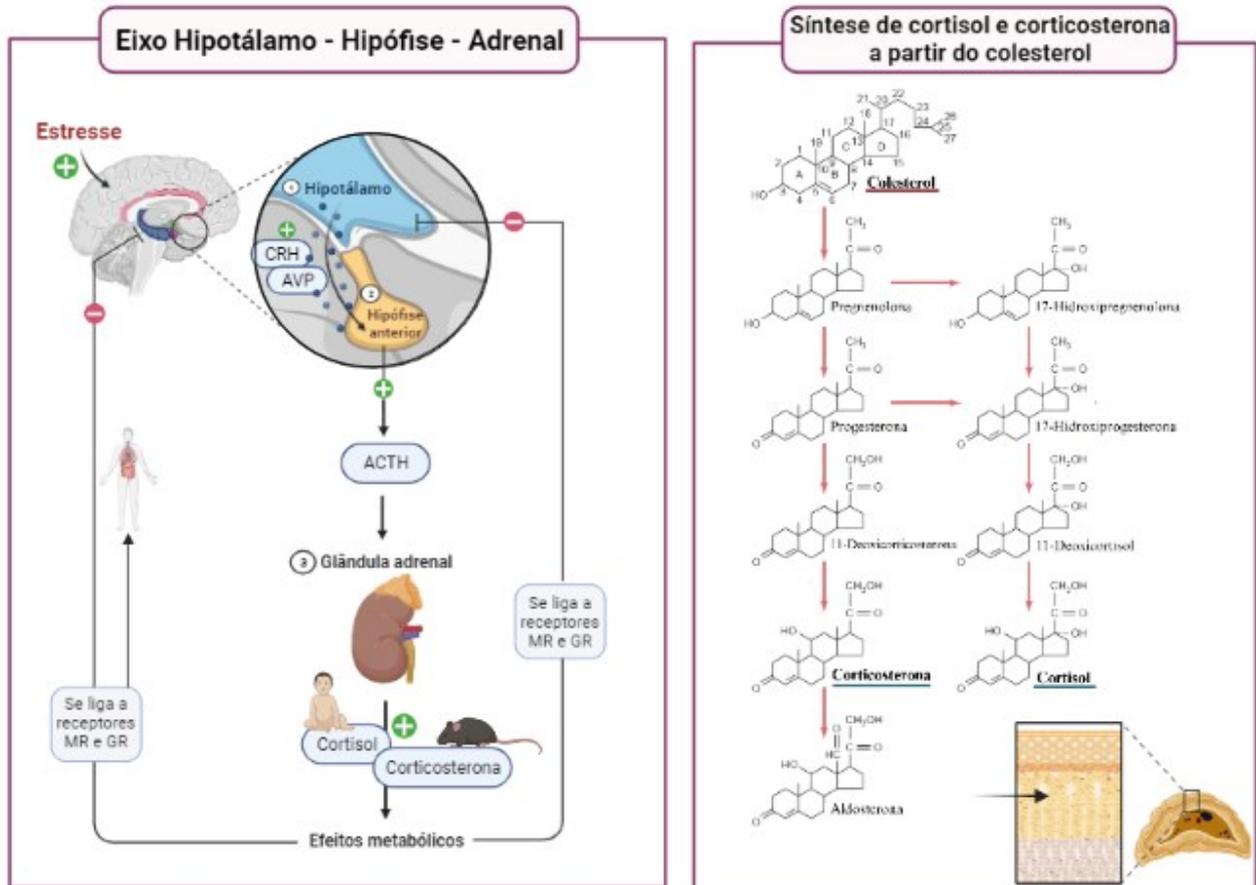
relacionado à reação de luta e fuga do sistema nervoso simpático. Estímulos estressores ativam neurônios pré-ganglionares simpáticos, que enviam axônios pela raiz ventral da medula espinal, formando sinapses colinérgicas com as células cromafins na medula das glândulas adrenais. As células cromafins quando estimuladas secretam catecolaminas, como epinefrina e norepinefrina, as quais se ligam a adrenorreceptores em vários órgãos, desencadeando as respostas de luta ou fuga, que incluem o aumento da frequência cardíaca e do volume sistólico, e aumento da circulação sanguínea, garantindo suprimento de sangue para o cérebro e músculos. Além disso, o sistema SAM também está relacionado a processos que ativam o eixo HHA (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017, GUNNAR *et al.*, 2007)

O eixo HHA é responsável pela produção e liberação de glicocorticoides pelo córtex adrenal em resposta ao estresse. Nos seres humanos, o principal hormônio esteroide produzido em resposta ao estresse é o cortisol, correspondente à corticosterona em roedores (MARTIN *et al.*, 2009). A amígdala é a estrutura encefálica responsável por mandar projeções neurais até o hipotálamo estimulando a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e da arginina vasopressina (AVP) pelas células dos núcleos paraventriculares do hipotálamo. Esses hormônios, por sua vez, irão sinalizar na hipófise anterior à liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual vai interagir com receptores do córtex adrenal, estimulando a produção e liberação de glicocorticoides (Figura 3) (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017, GUNNAR *et al.*, 2007). Os glicocorticoides podem se ligar a receptores, como os receptores mineralocorticoides (MR) e receptores glicocorticoides (GR), os quais são receptores nucleares capazes de acarretar mudanças de transcrição gênica, e de gerar efeitos fisiológicos e comportamentais prolongados de resposta e adaptação ao estresse (NELSON; COX, 2014). Por outro lado, os GR podem ser expressos na membrana plasmática, na forma de mbGR, agindo como um receptor acoplado a proteína G (Gs) estimuladora, podendo acarretar a reações rápidas de excitabilidade neural quando estimulado pela ligação de glicocorticóides (TASKER *et al.*, 2006).

Os glicocorticoides, como o cortisol e a corticosterona, são hormônios produtos de reações que acontecem em uma molécula bastante falada neste trabalho: o colesterol (NELSON; COX, 2014). O colesterol (80%) utilizado na síntese de esteroides são fornecidos pelas LDL circulantes, quando se fundem ao líquido intersticial e ligam-se a receptores das membranas as células adrenocorticais e fundem-se a elas por endocitose. O ACTH estimula a síntese de esteroides aumentando o número de receptores para LDL nas membranas ou aumentando a atividade da enzima que libera o colesterol da LDL dentro das células. Dentro das células, o colesterol vai ser clivado pela enzima *colesterol desmolase* mitocondrial para

formar a pregnenolona. A Figura 4 demonstra a síntese de cortisol e corticosterona a partir do colesterol. (BRAINKART,2011).

Figura 4: Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e síntese de cortisol e corticosterona.



Legenda: **Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal** - Quando ocorre um estresse agudo, a amígdala sinaliza, via projeções neuronais, o núcleo paraventricular (PVN) no hipotálamo. O hipotálamo responde com a liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP) na hipófise anterior. Isto faz com que a hipófise anterior libere hormônio adrenocorticotrófico - corticotrofina (ACTH). O ACTH vai atuar nas glândulas suprarrenais, provocando a liberação de glicocorticoides, como o cortisol (humanos) e a corticosterona (roedores) nessas glândulas. Esses hormônios circulam pelo corpo todo e pelo encéfalo, ligando-se a receptores esteroides intracelulares nucleares e a receptores glicocorticoides (GR) do hipocampo e do hipotálamo para suprir a atividade do eixo HHA, exercendo um papel de feedback negativo que evita a ativação crônica e prejudicial do eixo HHA. Fonte: Da autora, modificado de Bertoluzzi (2016).

No encéfalo, os glicocorticoides se ligam tanto em GR quanto em MRr, portanto, a quantidade desses receptores nas estruturas encefálicas pode influenciar na resposta ao estresse. Por exemplo, a ligação dos glicocorticoides aos GR hipocâmpais, pode prejudicar a plasticidade neural em processos envolvidos no aprendizado e memória. Além disso, os GR inibem a utilização de glicose no cérebro, botando em risco a sobrevivência celular (GUNNAR *et al.*, 2007). O hipocampo é uma estrutura importante na regulação da resposta ao estresse, em que a

ativação dos GR inicia um eixo de retroinibição, inibindo a liberação de CRH pelo hipotálamo e conseqüentemente todo o sistema HHA (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017). Esse *feedback* é muito importante para a homeostase do organismo, porém o mau funcionamento do hipocampo pode impactar o funcionamento adequado do eixo HHA. O mecanismo de retroinibição do eixo HHA ocorre também pelo controle dos glicocorticóides em receptores da hipófise anterior e dos núcleos paraventriculares do hipotálamo (LEVONE *et al.*, 2015).

Sabe-se que a ativação prolongada do eixo HHA causa anormalidades em resposta ao evento estressante, o que pode contribuir para o desenvolvimento dos transtornos de humor e ansiedade (FARAVELLI *et al.*, 2012). O hipocampo, pela alta densidade de GR, é particularmente vulnerável aos efeitos do estresse, e concentrações elevadas de glicocorticóides podem contribuir para redução da neuroplasticidade, morte celular e atrofia do hipocampo induzida pelo estresse (MCEWEN; SAPOLSKY, 1995). Além disso, estudos demonstram uma redução volumétrica no hipocampo de pacientes com depressão, que pode estar associada a alterações no eixo HHA (BREMNER *et al.*, 2000; FRODL *et al.*, 2002; VIDEBECH; RAVNKILDE, 2004). Do mesmo modo que pacientes com TEPT apresentam disfunção no eixo HHA, com níveis elevados de CRH no líquido cefalorraquidano (BREMNER *et al.*, 1997) e baixos níveis de cortisol na urina (YEHUDA *et al.*, 1995), indicando uma desregulação dos mecanismos de retroinibição do eixo HHA (KLOET *et al.*, 2006).

1.6.1 Protocolos de indução de estresse em animais e comportamentos associados à ansiedade

O estresse pode ser induzido em animais a fim de gerar sintomas semelhantes à ansiedade e depressão, que ocorrem nos seres humanos. Toth e Newmann (2013) descrevem em sua revisão diferentes paradigmas de estresse não social, como exposição ao choque nas patas, estresse de contenção agudo e crônico; e estresse social, como isolamento social, derrota social aguda e crônica e, também, estresse por separação materna, os quais promoveram aumento do comportamento do tipo-ansioso e da esquiva social. A submissão de roedores a protocolos de estresse pode levar ao aumento endógeno de glicocorticóide, e conseqüente aumento na ativação do GR (MCEWEN *et al.*, 2012), gerando uma ativação prolongada do eixo HHA (MARTIN *et al.*, 2009), semelhante ao que ocorre em seres humanos (FARAVELLI *et al.*, 2012)

Uma pesquisa recente demonstrou que o estresse crônico, além de aumentar o comportamento do tipo-ansioso nos animais, também reduz a expressão de GR em relação ao

grupo não estressado (controle) (LIU *et al.*, 2020). Além dos glicocorticóides endógenos, os sintéticos, como a dexametasona (Dexa), possuem grande afinidade pelos GR. A ação esteroide da DEX se assemelha à do cortisol; portanto, devido à sua alta afinidade aos GR, seu uso a longo prazo se assemelha a uma exposição prolongada a altas concentrações de glicocorticóides (GREGORIO, 2020). Pesquisas demonstraram que o uso prolongado de glicocorticóides sintéticos pode levar a sintomas depressivos e ansiosos em camundongos e aumento na concentração sérica de corticosterona (DELANOGARE *et al.*, 2020; SKUPIO *et al.*, 2015).

A sociabilidade proativa está relacionada negativamente com a atividade do eixo HHA, já a alta reatividade do eixo HHA está relacionada a uma personalidade menos social (RAULO; DANTZER, 2018). Raulo e Dantzer (2018) mostraram que os glicocorticóides teriam um papel inibitório na proatividade, que a elevação intensa ou crônica de glicocorticóides pode reduzir o comportamento social através do aumento na produção do fator de liberação de corticotrofina, reduzindo o comportamento social por meio da ativação de circuitos relacionados ao medo (RAULO; DANTZER, 2018). Berger *et al.* (2019) demonstraram que a administração crônica de corticosterona diminui consideravelmente a sociabilidade de camundongos C57BL/6 fêmeas, avaliadas no teste das três câmaras. Porém, ainda não existem estudos investigando o papel do aumento dos níveis de glicocorticóides causados por protocolos de estresse no comportamento tipo-ansioso e social em camundongos da linhagem LDLr^{-/-}.

Além disso, foi demonstrada uma redução na neurogênese no hipocampo de camundongos GR^{+/-}, relacionando com sua suscetibilidade ao estresse de contenção subcrônico (KRONENBERG *et al.*, 2009). Camundongos com diminuição de GR no SNC apresentaram redução no comportamento tipo-ansioso, além de níveis aumentados de glicocorticóides (TRONCHE *et al.*, 1999). Foi demonstrado que a superexpressão de GR resulta em redução do comportamento tipo-depressivo e diminuição da resposta a glicocorticóides sintéticos, assim como um aumento da expressão de BDNF (RIDDER *et al.*, 2005, SCHULTE-HERBRÜGGEN *et al.*, 2006).

1.7 O PAPEL DO BDNF E TRKB NA SOBREVIVÊNCIA NEURONAL E SUA RELAÇÃO COM A ANSIEDADE

As neurotrofinas são um grupo de proteínas envolvidas no desenvolvimento, plasticidade e função do sistema nervoso, seu principal papel é auxiliar o funcionamento e reparo neuronal (YANEVA-SIRAKOVA *et al.*, 2023). As neurotrofinas são capazes de

promover neuroplasticidade e sobrevivência neuronal, reduzindo processos de apoptose (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017).

Em 1940 foi descoberto pela bióloga Rita Levi-Montalcina o primeiro fator trófico, o fator de crescimento do nervo (NGF – do inglês *nerve growth factor*) (HAMBURGER; LEVI-MONTALCINI, 1949). Seu trabalho, que lhe rendeu o prêmio Nobel em 1986, demonstrou que o NGF promove a sobrevivência neuronal quando produzido pelos axônios dos tecidos-alvo. Posteriormente, descobriu-se outras neurotrofinas, hoje em dia sabe-se que a família de neurotrofinas clássica compreende NGF, neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4) e BDNF (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017), porém existem outras dentro das classificações de ligantes do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e citocinas neuroprotetoras (SOBUS *et al.*, 2016).

O BDNF é um importante fator neurotrófico no SNC, sendo expresso em larga escala no encéfalo e influência na função neuronal, como crescimento, morfologia, estrutura e plasticidade sináptica (PARK; POO, 2013). O papel central do BDNF é promover a plasticidade sináptica, que está por trás dos processos de aprendizagem e memória. Ao auxiliar na formação e estabilização de sinapses, o BDNF facilita a comunicação eficiente entre os neurônios, contribuindo para a adaptação neural em resposta a experiências e mudanças ambientais. Pesquisas demonstram funções importantes do BDNF no encéfalo, como os efeitos anti-apoptóticos, pois o BDNF ativa vias de sinalização intracelular que combatem a apoptose, o processo de morte celular programada. Ao aumentar as proteínas anti-apoptóticas e inibir os fatores pró-apoptóticos, o BDNF promove a sobrevivência celular e previne a morte neuronal prematura (AGUIRRE *et al.*, 2022).

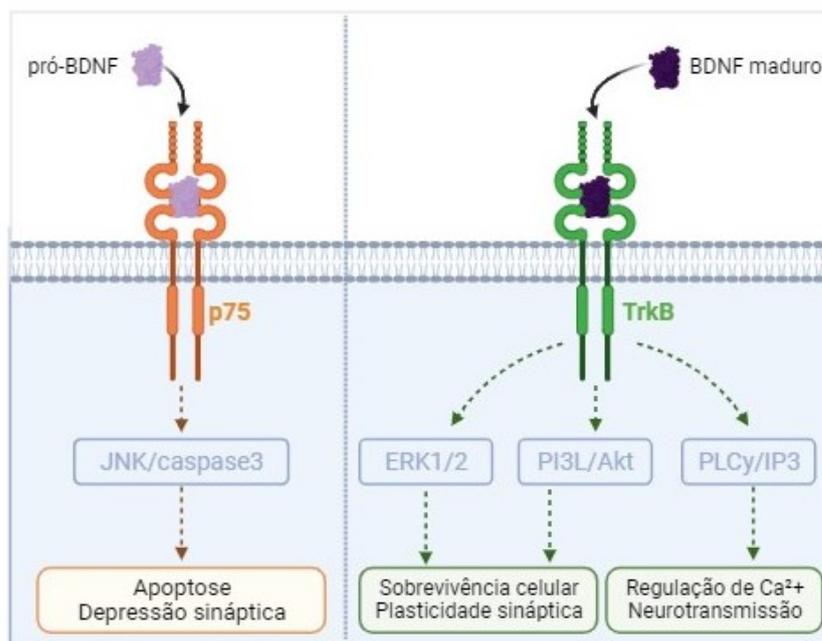
O BDNF também exibe atividade antioxidante, mitigando os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo nos neurônios. Aumenta a produção de enzimas antioxidantes, neutralizando as espécies reativas de oxigênio e protegendo os neurônios dos danos oxidativos (TRINDADE *et al.*, 2021). Além disso, o BDNF modula o equilíbrio dos neurotransmissores excitatórios, especialmente o glutamato, para prevenir a excitotoxicidade. Essa função neuroprotetora garante que sinais excitatórios excessivos não levem a uma superestimulação neuronal prejudicial, preservando assim as conexões sinápticas e os circuitos neuronais (CHOI *et al.*, 2020). E ainda pode causar supressão da neuroinflamação, em que os processos inflamatórios podem ser prejudiciais aos neurônios, mas o BDNF age para suprimir a neuroinflamação. Ao influenciar as células gliais e inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, o BDNF ajuda a reduzir o dano neuronal induzido pela inflamação (SILVA *et al.*, 2023). O BDNF pode ser secretado como proteína precursora, o pró-BDNF, que é então clivado para gerar o BDNF

maduro. O BDNF maduro é importante, mas o pró-BDNF também exerce diversas funções, sendo necessário para o desenvolvimento de sinapses GABAérgicas (PARL; POO, 2013), promove depressão de longo prazo (LTD) (JE *et al.*, 2012), retração dos dendritos e apoptose (PARL; POO, 2013).

A secreção de neurotrofinas, como o BDNF pode ocorrer a partir da despolarização da membrana e a consequente liberação da vesícula no terminal sináptico, ou pode ser desencadeada por fatores extracelulares a partir de um processo mediado pelo aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e AMPc (PARL; POO, 2013). O BDNF tem ligação preferencial por receptores tirosina quinase B (TrkB), porém sua forma anterior, o pró-BDNF se liga a receptores pan-neurotrofina p75 (p75 NTR) (YANEVA-SIRAKOVA *et al.*, 2023). Ambas as isoformas apresentam ações diferentes e opostas na regulação da morte e sobrevivência celular, sendo que o pró-BDNF se liga a receptores p75 de neurotrofina nos axônios e terminais axonais (TENG *et al.*, 2005), a ativação desses receptores é implicada na apoptose, alongamento de axônios e transmissão sináptica (DECHANT, BARDE 2002). Evidências mostram que a via do pró-BDNF pode prejudicar a plasticidade sináptica no hipocampo, que requer a conversão de pró-BDNF para BDNF maduro para facilitar a LTP mediada por TrkB, em contraste, o pró-BDNF facilita a LTD pela ativação do receptor p75NTR suprimindo o crescimento de espinhos dendríticos (MARTINOWICH *et al.*, 2007). Logo, a clivagem do pró-BDNF é essencial para a neuroplasticidade (SIGWALT *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que o pró-BDNF é amplamente distribuído e expresso no encéfalo de roedores (ZHOU *et al.*, 2004).

O BDNF maduro, assim como o pró-BDNF ativam vias intracelulares, porém ambos irão agir em vias diferentes. Podendo estimular a sobrevivência neural, ajudando no crescimento e na neuroplasticidade, com a ativação de BDNF/TrkB (ALAM *et al.*, 2016) ou promover apoptose neural e depressão sináptica com a ativação do pró-BDNF/p75 (NUMAKAWA *et al.*, 2021) (Figura 5).

Figura 5: Cascatas de sinalização BDNF e pró-BDNF.



Legenda: Esquema da sinalização das duas isoformas de BDNF. O próBDNF se liga preferencialmente ao receptor p75 e ativa as vias JNK/caspase 3 que podem causar apoptose neural e depressão sináptica. Já sua forma madura, o BDNF maduro se liga ao receptor TrkB ativando entre outras vias a ERK1/2 e PI3K/Akt para manter a sobrevivência celular e a plasticidade sináptica, mas também a via PLC γ /IP₃, que regula a homeostase do Ca²⁺ e a neurotransmissão. Fonte: Numakawa *et al.* (2021) e ALAM *et al.*, (2016) adaptado em Biorender pela autora.

Ao longo dos anos, a comunidade científica mostrou um interesse crescente no papel do BDNF na fisiopatologia da ansiedade. Algumas investigações relataram diminuição dos níveis periféricos de BDNF em indivíduos diagnosticados com transtornos de ansiedade, incluindo transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de ansiedade social (TAS) e transtorno do pânico. Níveis mais baixos de BDNF também foram associados à gravidade dos sintomas de ansiedade (RAHMANI *et al.*, 2021; Uchida *et al.*, 2018).

Além disso, variações genéticas do BDNF, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), têm sido associadas a um risco aumentado de condições relacionadas à ansiedade (CHEN *et al.*, 2017). Uma mutação, como a substituição de metionina (Met) por valina (Val) no códon 66 (Val66Met), associa-se a alterações neuroanatomia do encéfalo em humanos, quando gerado camundongos BDNF variante (BDNF^{Met/Met}) que reproduz as marcas fenotípicas em humanos com o alelo variante, a secreção de BDNF_{Met} é defeituosa. Esses camundongos, quando submetidos a protocolos de estresse, exibem comportamentos do tipo ansioso, e fármacos como fluoxetina não são capazes de normalizar esse perfil (CHEN *et al.*, 2006).

Em roedores, demonstrou-se que as manipulações dos níveis de BDNF em regiões específicas do encéfalo influenciam os resultados relacionados à ansiedade. Por exemplo, a expressão aumentada de BDNF no hipocampo foi associada a efeitos ansiolíticos, enquanto a expressão reduzida de BDNF na amígdala foi associada ao aumento de comportamentos do tipo ansiedade (LIU *et al.*, 2019; LIAO *et al.*, 2021). Verificou-se que a ativação da sinalização TrkB modula comportamentos de ansiedade em humanos e roedores (TALIAZ *et al.*, 2011; GAJEWSKI *et al.*, 2020). Além disso, o BDNF interage com outros sistemas de neurotransmissores, como serotoninérgico, dopaminérgico e GABAérgico, que são conhecidos por desempenhar papéis críticos na regulação da ansiedade (GONUL *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2017).

Existem evidências de que a exposição crônica aos glicocorticoides apresenta um impacto negativo na sobrevivência e função neuronal (TOTH; NEWMANN, 2013). Sob condições de estresse, a expressão do BDNF pode ser reduzida, resultando em perda neuronal e disfunção sináptica no hipocampo e córtex pré-frontal (DUMAN; LI, 2012). Em estudos que avaliaram os níveis de expressão do BDNF no hipocampo, foram observadas reduções significativas de BDNF após o estresse de contenção e a exposição crônica a glicocorticoides (TOTH E NEWMANN, 2013). O estudo de Berton *et al.* (2006) induziu a redução da expressão de BDNF especificamente na via dopaminérgica mesolímbica, demonstrando que o BDNF é necessário para o desenvolvimento da aversão social dependente da experiência causada pelo estresse crônico de derrota social, com a “ansiedade social” sendo presente somente com a presença de BDNF.

Em relação ao colesterol, vale ressaltar que em uma pesquisa utilizando-se de probucol, um agente hipolipidêmico, promoveu o crescimento dendrítico e a sinaptogênese, além de aumentar a proliferação de células progenitoras neuronais do hipocampo. Adicionalmente, o probucol aumentou a expressão de BDNF e a ativação de do seu receptor TrkB (CHEN *et al.*, 2023). Níveis mais baixos de BDNF no hipocampo estiveram relacionados a um comportamento tipo ansioso em animais submetidos à uma dieta rica em colesterol (CHEON *et al.*, 2023).

Um estudo anterior com ratos alimentados com dieta rica em colesterol, demonstrou perda de plasticidade sináptica e neurodegeneração (KOUKINOV; KOUKINOVA, 2003). Culturas primárias de neurônios hipocámpais tratados com 27-hidroxicolesterol (principal metabólito do colesterol) apresentaram uma redução no comprimento dendrítico e na densidade dos espinhos dendríticos, além de diminuição do marcador pós-sinápticos PSD-95. Camundongos que exibem uma alta expressão de 27-hidroxicolesterol também apresentam

redução da densidade de arborização dendrítica no hipocampo (MERINO-SERRAIS *et al.*, 2019).

1.8 ALTERAÇÕES NO SNC OBSERVADAS EM CAMUNDONGOS COM A DELEÇÃO DO LDLR

Grande parte dos trabalhos que abordam alterações no SNC e aspectos neurocomportamentais em camundongos LDLr^{-/-} abordam a investigação de prejuízos cognitivos. Por exemplo, prejuízos relacionados à memória espacial e de procedimento avaliadas em testes como labirinto aquático, labirinto em T, realocação e reconhecimento de objetos e medo condicionado (MULDER *et al.*, 2004, MOREIRA *et al.*, 2012, JHONSON *et al.*, 2014, DE OLIVEIRA *et al.*, 2014, WANG *et al.*, 2014, LOPES *et al.*, 2015, DE PAULA *et al.*, 2020). Além disso, uma dieta rica em colesterol é capaz de acentuar os problemas cognitivos (THIRUMANGALAKUDI *et al.*, 2008, ELDER *et al.*, 2008, MACHADO *et al.*, 2019), embora existam resultados conflitantes (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020), indicando que tanto os níveis plasmáticos de colesterol quanto a própria deleção do LDLr afetariam os processos de aprendizado e memória.

No estudo de Zhang *et al.* (2017) foram investigados os efeitos da hipercolesterolemia sobre a neuroinflamação e a função cognitiva em camundongos LDLr^{-/-}. Os pesquisadores observaram que os camundongos LDLr^{-/-} alimentados com uma dieta rica em colesterol apresentaram níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias no cérebro, que foram associadas a déficits cognitivos no teste de reconhecimento de novos objetos. Chen *et al.* (2020) investigaram o impacto de uma dieta rica em colesterol na função cognitiva e na plasticidade sináptica do hipocampo em camundongos LDLr^{-/-}. Os pesquisadores descreveram que os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram deficiências cognitivas associadas a alterações na potencialização de longo prazo (LTP) do hipocampo, um mecanismo celular ligado de neuroplasticidade envolvido na formação das memórias.

Camundongos LDLr^{-/-} além de apresentarem comprometimento da memória espacial e alterações morfológicas no giro denteado do hipocampo, apresentaram fendas sinápticas mais amplas, marcadores sinápticos reduzidos no hipocampo, morte celular induzido por apoptose e edema na mesma estrutura (WANG *et al.*, 2014). Da mesma maneira, De Oliveira *et al.* (2020) observaram aumento da expressão de aquaporinas (AQP-4), que foi relacionado a um sinal de edema cerebral e a consequente patologia de distúrbios neurológicos. Além disso, foi observado uma ruptura da barreira hematoencefálica dos animais LDLr^{-/-} com aumento da permeabilidade no hipocampo e córtex pré-frontal (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020 A). Ainda há um aumento na

expressão de proteínas relacionadas a apoptose, como a Bax e na imunorreatividade de caspase-3 no córtex pré-frontal e hipocampo de animais LDLr^{-/-} (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Animais LDLr^{-/-} exibem expressão reduzida de genes associados à síntese de colesterol, como 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase (HMGCR) e esqualeno sintase (FDFT1). Este mesmo trabalho demonstrou que a neurogênese adulta é danificada no hipocampo, e é responsável pela proliferação e diferenciação prejudicadas de células precursoras neurais no giro denteado do hipocampo dos animais LDLr^{-/-} (ENGEL *et al.*, 2019). Diversos trabalhos descreveram alterações sinápticas, indicadas por alterações na proteína sinaptofisina em idades mais avançadas (MULDER *et al.*, 2004, 2007; WANG *et al.*, 2014), e redução de SNAP-25 em camundongos LDLr^{-/-} (OLESCOWICZ, 2021). Adicionalmente, foi descrito prejuízo na LTP hipocampal em camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas (OLESCOWICZ, 2021). Considerando as evidências do prejuízo na neuroplasticidade em camundongos LDLr^{-/-}, é possível que estes sejam mais susceptíveis ao estresse do que os animais da linhagem controle, exibindo assim o comportamento do tipo-ansioso e diminuição da investigação social de maneira mais pronunciada, sendo que esta relação não foi investigada até o momento.

O comportamento do tipo-depressivo e anedônico já foi demonstrado em camundongos LDLr^{-/-} em testes como suspensão pela cauda e de borrifarem com sacarose (ENGEL, 2016). Entretanto, são escassos os trabalhos avaliando respostas relacionadas à ansiedade em animais LDLr^{-/-}, principalmente comparando possíveis diferenças entre animais machos e fêmeas. O trabalho de Szczepanik (2015) indicou que camundongos fêmeas LDLr^{-/-} apresentam redução de respostas relacionadas à ansiedade avaliadas no teste do labirinto em cruz elevado. Trabalhos anteriores da autora corroboram esses achados, demonstrando que as fêmeas LDLr^{-/-} apresentam uma diminuição do comportamento tipo-ansioso no teste em labirinto em cruz elevado e no teste de enterrar esferas, além de apresentarem hiperlocomoção (PINHO, 2021). Diversos trabalhos vêm demonstrando o comportamento de hiperatividade locomotora nas fêmeas LDLr^{-/-}, em diversos paradigmas comportamentais (ELDER *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2012; SZCZEPANIK *et al.*, 2016; PINHO, 2021). Neste sentido, foi demonstrado que camundongos com depleção genética de BDNF e TrkB exibiram comportamento hiperativo (TOTH; NEWMANN, 2013).

Engel *et al.* (2016) demonstraram que há um aumento na atividade mitocondrial da enzima MAO-A e MAO-B no hipocampo nos animais LDLr^{-/-}, o que poderia ser um fator relevante para um aumento do comportamento social nesses animais. Resultados anteriores em nosso laboratório demonstraram uma tendência ao aumento da investigação social dos

camundongos LDLr^{-/-} machos no teste da sociabilidade no campo aberto e no teste das três câmaras (PINHO, 2021).

Diferenças sexuais são observadas no modelo da deleção do LDLr, por exemplo, embora ambos os sexos tenham aumento de 2-3x nos níveis de colesterol, apenas as fêmeas apresentam aumento significativo nos níveis de 27-OH, que pode ser neurotóxico (OLESCOWICZ, 2021). Além do aumento da locomoção apresentada somente em fêmeas LDLr^{-/-}, como mencionado anteriormente (SZCZEPANIK *et al.*, 2016; PINHO, 2021). Apesar disso, poucos são os trabalhos que comparam diferenças sexuais nos comportamentos dos animais LDLr^{-/-}. Ainda, o possível envolvimento do estresse e de proteínas relacionadas à neuroplasticidade não foi investigado até o momento no contexto de comportamentos tipo-ansiosos nos animais LDLr^{-/-} machos e fêmeas.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

Os transtornos de ansiedade apresentam uma prevalência de 9% na população brasileira e em tornos de 1 bilhão de pessoas no mundo, sendo que situações de estresse, agudo ou crônico podem levar ao aumento exponencial nos transtornos de ansiedade em humanos, esse fato já foi visto em modelos animais submetidos à protocolos de estresse. Resultados preliminares da autora demonstram uma diminuição do comportamento tipo-ansioso nas fêmeas LDLr^{-/-} e aumento do comportamento social. Até o momento, nenhum estudo investigou possíveis diferenças na resposta ao estresse em animais LDLr^{-/-} e, conseqüentemente, o impacto de paradigmas de estresse no comportamento tipo-ansioso de animais LDLr^{-/-} machos e fêmeas. Portanto, torna-se relevante a utilização de diferentes protocolos de estresse, como o paradigma de estresse agudo de contenção e estresse crônico com a administração de dexametasona, a fim de investigar alterações comportamentais e neuroplásticas no dimorfismo sexual dos camundongos LDLr^{-/-}.

Diante do exposto, nossa **hipótese 1** foi de que haveria um dimorfismo sexual nos comportamentos dos animais LDLr^{-/-} em relação à sensibilidade aos diferentes paradigmas de estresse, sendo os animais LDLr^{-/-} mais susceptíveis ao estresse do que os dos grupos controle e, assim, as fêmeas mais sensíveis que os machos. A **hipótese 2** é de que os paradigmas de estresse irão aumentar de maneira mais pronunciada o comportamento tipo-ansioso e diminuir o comportamento social dos animais LDLr^{-/-}, além de aumentar os níveis de corticosterona.

A redução de neurogênese hipocampal e a diminuição do comportamento tipo-ansioso também está presente em animais com diminuição da expressão de GR. A literatura mostra que o aumento de GR pode influenciar no aumento da expressão de BDNF, portanto, uma baixa expressão de GR, poderia acarretar baixa expressão de BDNF. Além disso, animais nocaute para BDNF apresentam comportamento hiperativo. Considerando o perfil comportamental basal dos animais LDLr^{-/-} em relação à ansiedade e comportamento social, a **hipótese 3** deste trabalho é de que camundongos LDLr^{-/-} apresentam reduções basais nos níveis de BDNF, TrkB e de GR, relacionando essa diminuição à sensibilidade destes animais ao estresse. Por fim, a **hipótese 4** é de que os paradigmas de estresse diminuirão ainda mais os níveis de BDNF, TrkB e GR nos camundongos LDLr^{-/-}.

Destas forma, esta pesquisa tem o potencial de fornecer informações valiosas sobre a relação entre estresse, hipercolesterolemia e transtornos de ansiedade, bem como os efeitos diferenciados em machos e fêmeas com diminuição da expressão de LDLr, abrindo caminho para abordagens mais eficazes na compreensão e tratamento desses complexos transtornos.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o impacto do dimorfismo sexual e estresse agudo e crônico em comportamentos associados à ansiedade e neuroplasticidade em camundongos machos e fêmeas LDLr^{-/-}, usados como modelo animal da HF.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I: Investigar o dimorfismo sexual na sensibilidade ao estresse agudo de contenção em parâmetros de ansiedade em animais LDLr^{-/-} e WT.

II: Analisar alterações nos níveis de BDNF, e dos receptores TrkB e do GR no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais LDLr^{-/-} e WT machos e fêmeas submetidos ao estresse de contenção.

III: Investigar o dimorfismo sexual na sensibilidade ao estresse crônico com dexametasona em parâmetros de ansiedade dos animais WT e LDLr^{-/-}.

IV: Analisar alterações nos níveis de BDNF, e dos receptores TrkB e do GR no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais LDLr^{-/-} e WT machos e fêmeas submetidos ao estresse por tratamento crônico com dexametasona.

4 MATERIAL E MÉTODOS

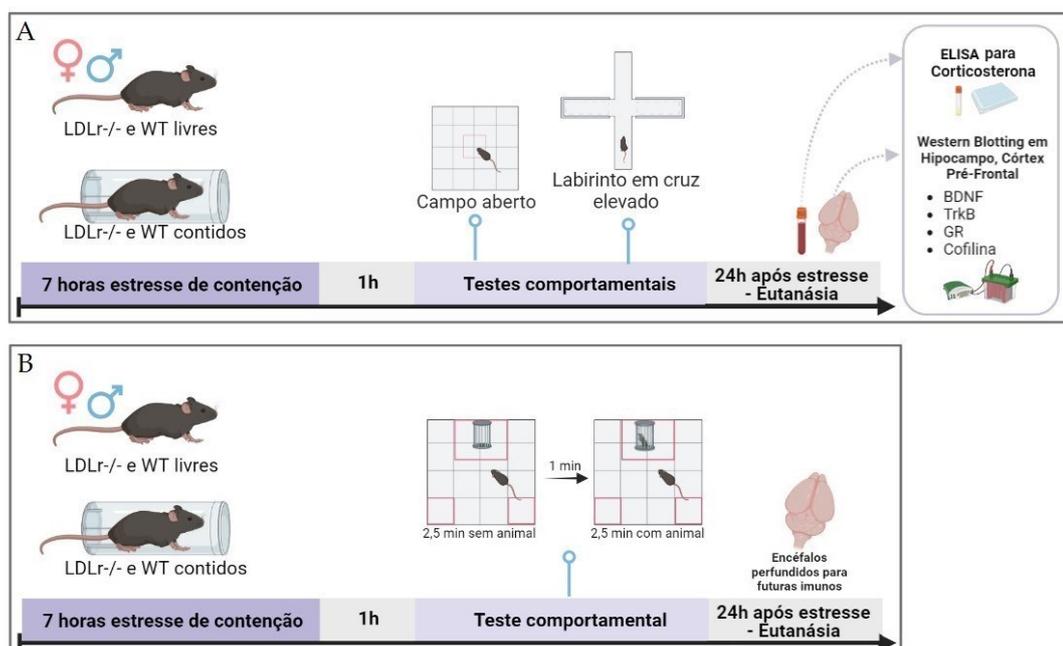
4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas e machos com idade entre 4-5 meses (pesando 25-30 g) das linhagens tipo selvagens C57BL6 (WT – do inglês *Wild-Type*) e LDLr^{-/-} fornecidos pelo biotério do Departamento de Bioquímica da UFSC. Os animais foram alojados em grupos de 2-5 animais por caixa e mantidos em câmaras ventiladas (INSIGHT®) a uma temperatura de 22 ± 2 °C, umidade entre 60 – 80% e ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. CEUA-UFSC nº 7816220421.

4.2 DESENHOS EXPERIMENTAIS

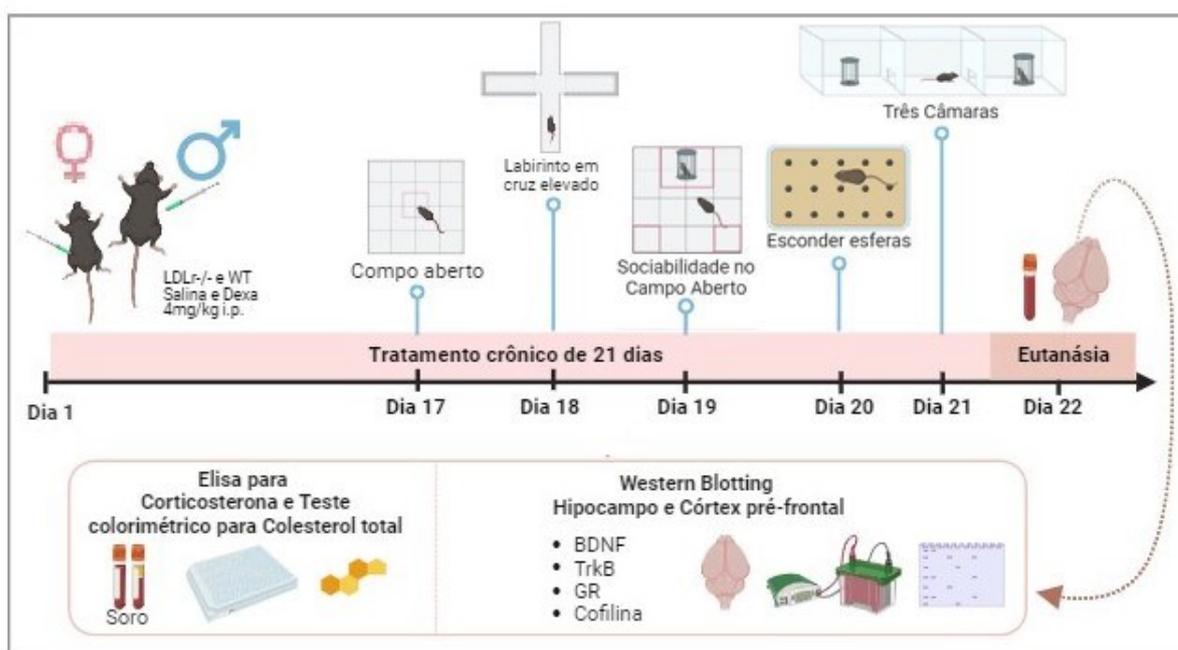
Os desenhos dos protocolos experimentais utilizados estão ilustrados abaixo (Figura 6 e 7). Os quais foram delineados com a intenção de avaliar dois aspectos diferentes, conforme já comentado nos objetivos específicos: **(I)** Sensibilidade ao estresse agudo de contenção nos animais WT e LDLr^{-/-} machos e fêmeas em relação a diferentes parâmetros de ansiedade e modificações bioquímicas relacionadas à neuroplasticidade; **(II)** Sensibilidade ao estresse crônico com dexametasona nos animais LDLr^{-/-} machos e fêmeas em relação a diferentes parâmetros de ansiedade, e modificações bioquímicas relacionadas à neuroplasticidade.

Figura 6: Desenho experimental I – Sensibilidade ao estresse de contenção e alterações relacionadas à neuroplasticidade.



Legenda: O primeiro bloco experimental foi dividido em A e B. No Bloco A, os animais LDLr^{-/-} e WT, machos e fêmeas, passaram por 7 h de estresse de contenção (os grupos controle se mantiveram na mesma sala, na caixa moradia), 1 h após o término do protocolo de estresse, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, 1 h após, ao teste do labirinto em cruz elevado, 12 h após, os animais foram eutanasiados (entre 14 h às 18 h), o sangue coletado para análise de corticosterona sérica por ELISA, e estruturas como hipocampo e córtex-pré-frontal foram dissecadas e armazenadas a -80 °C para avaliação dos níveis de BDNF, TrkB, GR e Cofilina por *Western Blotting*. No bloco B, os animais passaram pelo mesmo estresse de contenção de 7 h, com 1 h de intervalo até o teste comportamental da Sociabilidade no Campo Aberto, a fim de analisar o comportamento tipo-ansioso relacionado à sociabilidade, 12 h após (entre 14 h e 18 h), os animais foram anestesiados e perfundidos para coleta do encéfalo para protocolos futuros. Fonte: Imagens produzidas pela autora (2023).

Figura 7: Desenho experimental II – Sensibilidade ao estresse crônico com dexametasona e alterações relacionadas à neuroplasticidade.



Legenda: No segundo bloco experimental, os animais LDLr^{-/-} e WT machos e fêmeas foram submetidos ao estresse crônico. Os animais receberam um tratamento crônico durante 21 dias consecutivos com dexametasona (4 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) conforme protocolo descrito por Delanogare *et al.* (2020). Foram utilizados 8 a 10 animais por grupo, divididos em: LDLr^{-/-} macho salina, LDLr^{-/-} macho dexametasona, LDLr^{-/-} fêmea salina, LDLr^{-/-} fêmea dexametasona, WT macho salina, WT macho dexametasona, WT fêmea salina, WT fêmea dexametasona. Os grupos salinas foram tratados com injeção i.p. de solução salina a 0,1 ml por 10 g de peso do animal. O tratamento foi realizado no período claro entre as 7:00 – 9:00 h e os testes comportamentais foram realizados durante o período claro, no período vespertino (a partir das 13 h) para a aplicação de dexametasona não agir como um indutor de estresse agudo. O ciclo estral foi analisado ao fim de cada teste comportamental para controle interno. No dia 22 do protocolo, os animais foram eutanasiados, o sangue coletado e centrifugado e o soro utilizado para análise de corticosterona por ELISA e de colesterol por teste colorimétrico, além das estruturas encefálicas para análise de proteínas, como BDNF, TrkB, GRr e Cofilina por *Western Blotting*. Fonte: Imagens produzidas pela autora com Biorender (2023).

4.3 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS: EXPERIMENTOS IN VIVO

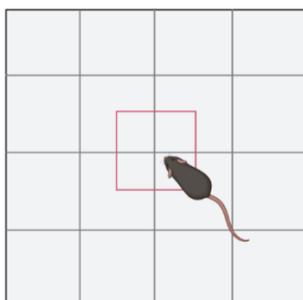
Para as avaliações dos comportamentos relacionados à ansiedade e sociabilidade, os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais. Os testes foram realizados

durante o ciclo claro (entre 7 h e 19 h), em baixa iluminação (12 lux), em sala própria para camundongos, onde todos foram ambientados na antessala por pelo menos 1 h antes do início dos testes. Todos os aparatos foram limpos antes do teste com álcool 70%, e entre cada animal, com álcool 30%. Os testes foram gravados com sistema de câmeras posicionadas a fim de obter imagens do comportamento do animal no aparato inteiro, as imagens foram analisadas posteriormente com auxílio do software ANY-maze® (Stoelting Co., IL, EUA) ou com cronometro digital e contadores.

4.3.1 Teste do Campo aberto

O teste do campo aberto (Figura 8) consiste em um aparato contendo uma área central aversiva que representa um modelo amplamente utilizado e possibilita a avaliação tanto da atividade locomotora como do comportamento relacionado à ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). O aparato consiste em uma caixa de acrílico transparente (40 x 40 cm), sem cobertura e com assoalho cinza. Cada camundongo foi colocado no centro da arena, permitindo sua movimentação livremente no aparato durante o período de 5 min. Após o término do teste de cada animal, a superfície foi limpa com álcool 30%. Com a utilização do *software* ANY-maze® foram avaliados os seguintes parâmetros: a distância total percorrida e o tempo de permanência no centro. Sendo o último indicativo de comportamento relacionado à ansiedade (MOREIRA *et al.*, 2014).

Figura 8: Aparato do campo aberto.



Legenda: Ilustração do campo aberto com a delimitação da área central “aversiva” no centro do aparato. Fonte: Ilustração adaptada de *Biorender*® (2023).

4.3.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O teste do labirinto em cruz elevado é amplamente usado para investigar efeitos tipo-ansiolítico e tipo-ansio gênico em camundongos (LISTER, 1987). O aparato de madeira consiste em dois braços fechados (18 x 6 cm) opostos a dois braços abertos (18 x 6 cm), elevados 60 cm

do chão. O experimento foi conduzido com baixa luminosidade (12 lux) e capturado por câmeras de vídeo. Cada camundongo foi colocado no quadrante central dos braços, de frente para o braço fechado e o teste teve duração de 5 min. Durante o teste, foram avaliados o tempo de exploração nos braços fechados e abertos e o tempo no centro, além do número de entradas em cada braço. Ao final, foi calculado o percentual de tempo no braço aberto, sendo: % tempo no braço aberto = $(Tempo\ braço\ aberto * 100) / (Tempo\ braço\ aberto + tempo\ braço\ fechado)$, o percentual de entradas no braço aberto também será calculado: % entradas no braço aberto = $(N^o\ entradas\ braço\ aberto * 100) / (N^o\ entradas\ braço\ aberto + N^o\ entradas\ braço\ fechado)$, e o número de entradas nos braços fechados. Um aumento da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado corresponde a um perfil menos ansioso neste teste (Figura 9).

Figura 9: Aparato do labirinto em cruz elevado.



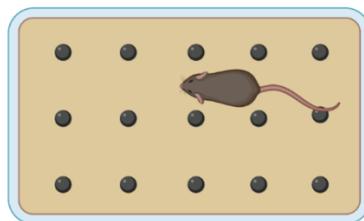
Legenda: Da esquerda para direita: Vista lateral dos braços abertos, vista lateral dos braços fechados, vista superior do aparato. Fonte: Ilustração realizada pela autora, com o uso do software *Mind The Graph*® (2023).

4.3.3 Teste de esconder esferas

O teste de esconder esferas é um método usado para avaliar respostas relacionadas à ansiedade, sendo útil para investigar a ação de fármacos ansiolíticos e avaliar o comportamento de enterrar em resposta a estímulos ansiogênicos (HART *et al.*, 2016; KEDIA; CHATTARJI, 2014). Esse teste também pode indicar o nível de ansiedade, visto que os roedores exibem o comportamento de esconder (enterrar) objetos estranhos, alimentos nocivos ou objetos inanimados, como as esferas de vidro. Essa ação deve-se ao medo ou aversão, que é medido a cada esfera escondida, ou seja, quanto maior o número de objetos escondidos maior o comportamento tipo-ansioso do animal (BROEKKAMP *et al.*, 1986). O aparato consiste em uma caixa (17,5 x 10 x 5,5 cm) contendo 5 cm de maravalha distribuídas uniformemente na base do aparato (Figura 10). Vinte esferas de vidro (1,4 cm de diâmetro) são alocadas enfileiradas com 4 x 5 esferas na superfície da maravalha. Durante 20 min é registrada a

quantidade de esferas enterradas (até 2/3 de profundidade) nos tempos 5 min, 10 min, 15 min e 20 min de duração do teste (COLLA *et al.*, 2015).

Figura 10: Ilustração do teste de esconder esferas.



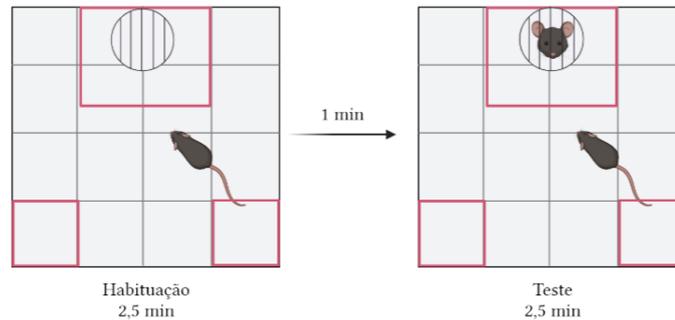
Legenda: Caixa de maravalha com as bolinhas de gude usadas. Fonte: Imagem adaptada de *Biorender*® (2023).

4.3.4 Sociabilidade no campo aberto

O comportamento social de animais de laboratório pode ser avaliado medindo os movimentos de camundongos em direção ou em esquivas de um alvo social desconhecido, no caso, outro camundongo. O teste se deu na arena do campo aberto (anteriormente mencionado), foi adicionada uma pequena gaiola de malha de arame no meio de um dos lados (Figura 11), a zona que circunda essa gaiola (contêm 7 x 7 cm em torno da gaiola) é chamada de Zona de Interação Social (ZIS), as zonas mais distantes são chamadas de zonas periféricas (que contém 7 x 7 cm). Os movimentos do animal foram gravados com um sistema de vídeo. O camundongo teste foi introduzido na arena em duas sessões consecutivas de 2,5 min. Durante a primeira sessão, sem objetivo social, a pequena gaiola de malha de arame estava vazia. Durante o segundo momento, um camundongo desconhecido (chamado de camundongo alvo), do mesmo sexo, idade e peso do animal testado (que foi alojado em condições semelhantes) foi colocado na gaiola de malha de arame. Entre os testes, o camundongo experimental foi removido da arena e colocado em sua gaiola por 1 min (KRISHNAN *et al.*, 2007, BERTON *et al.*, 2006). Com a ajuda do *software ANY-maze*® é analisado, nas duas fases do teste, a distância percorrida no aparato e o tempo permanecido em cada zona a fim de analisar a preferência a um estímulo social. Com o tempo permanecido na ZI, calculamos o índice de interação social, o qual é calculado pela razão entre o tempo total na ZI, na fase com o alvo, e o tempo na ZI, na fase sem o alvo:

$$\text{Índice de interação social (IIS)} = \frac{\text{Tempo na ZIS na presença do alvo}}{\text{Tempo na ZIS na ausência do alvo}}$$

Figura 11: Aparato da sociabilidade no campo aberto.

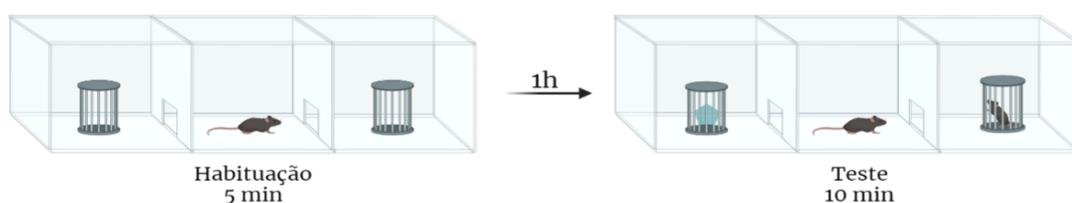


Fonte: Ilustração da autora com base em Krishnan *et al.* (2007); Berton *et al.* (2006). Biorender®.

4.3.5 Teste das três câmaras

O teste das três câmaras foi também usado para avaliar o comportamento social dos camundongos (O'TUATHEIGH *et al.*, 2007; DESBONNET *et al.*, 2012). O experimento foi realizado conforme Silverman *et al.* (2010), em uma arena de madeira que consiste em três câmaras (cada uma com 20 x 40 cm), separadas por uma parede de madeira com uma pequena porta aberta (5 x 8 cm). Em um dos compartimentos foi inserido um alvo social (outro camundongo desconhecido, de caixa diferente e do mesmo sexo, idade aproximada e peso do animal testado) protegido por uma pequena gaiola de malha de arame. Em outro compartimento foi inserido um estímulo neutro (gaiola de malha de arame com um lego dentro) e a câmara do meio estava vazia. O camundongo teve um tempo de 5 min para habituação ao ambiente (sem nenhum estímulo nas gaiolas), após uma hora ele foi observado durante a exploração da arena contendo o animal novo e o lego por 10 min. Foi analisado o tempo que o animal se manteve em cada câmara, número de entradas em cada câmara e distância total percorrida. Sendo que é considerado um comportamento social quando o animal explora o local que contém a gaiola com um animal alvo (O'TUATHEIGH *et al.*, 2007; DESBONNET *et al.*, 2012).

Figura 12: Ilustração do teste das três câmaras.



Fonte: Ilustração da autora, adaptada de Biorender®. Com base em O'Tuatheigh *et al.* (2007); Desbonnet *et al.* (2012).

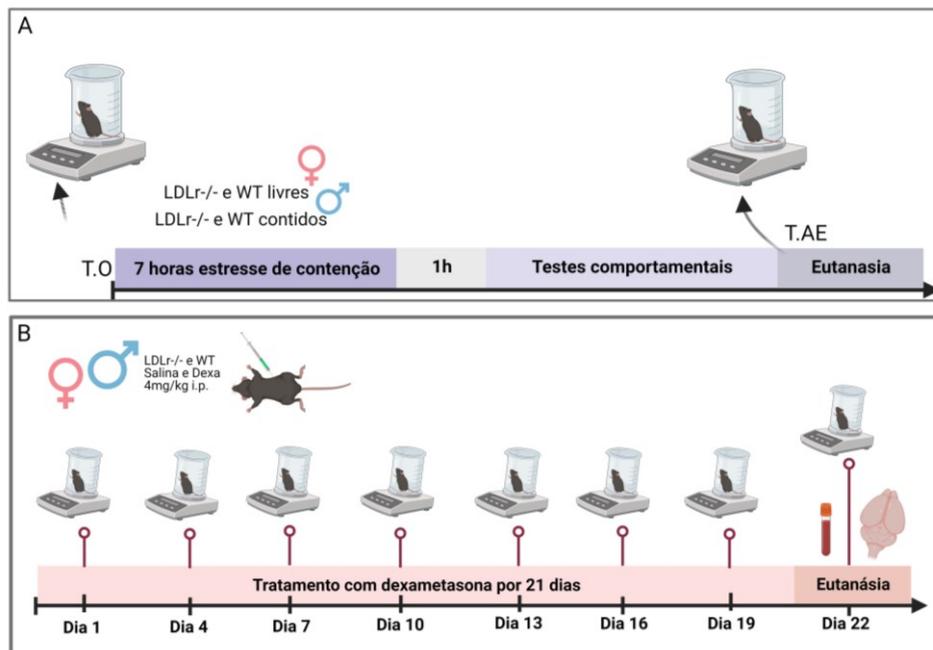
4.3.6 Avaliação de parâmetros relacionados ao bem-estar geral dos animais

4.3.6.1 Avaliação do peso corporal

No Protocolo I – Estresse de Contenção, os animais foram pesados no instante anterior ao início da contenção e à eutanásia, para analisarmos a diferença do peso do dia da eutanásia (T.AE) menos o peso da hora anterior à contenção (T.0) (Figura 13 – A).

No Protocolo II – Estresse Crônico, os animais foram pesados desde o 1º dia da administração de Dexametasona, a cada dois dias até o dia 22 do protocolo, para analisar o ganho ou perda de massa corporal devido ao estresse crônico, fazendo assim um gráfico temporal dos 21 dias de tratamento, além da análise do último dia em relação ao primeiro (Dia 22 – Dia 01) (Figura 13 – B).

Figura 13: Ilustrações das avaliações de peso corporal nos protocolos I e II.



Legenda: A) Ilustração dos tempos de pesagem no protocolo I de estresse de contenção. B) Ilustração dos tempos de pesagem no protocolo crônico com dexametasona. Fonte: Imagem feita pela autora com auxílio do Biorender® (2023).

4.4 COLETA DE SANGUE E DE ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS

No dia indicado em cada protocolo como dia da eutanásia, todos os animais foram levados à sala de comportamento para não haver estresse dentro do biotério. Os animais foram submetidos à decapitação rápida sem analgésico devido à dosagem de corticosterona posteriormente, todos do protocolo I-A e III da mesma forma. O sangue dos animais foi coletado

a partir da decapitação rápida (entre 14 h e 18 h), logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 12 min para a separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas a -20°C até a realização dos ensaios de ELISA para dosagem de corticosterona e colorimétrico para dosagem do colesterol.

Para os protocolos I-A e II, nos quais as amostras foram destinadas à técnica de Western Blotting, após a decapitação, os encéfalos foram rapidamente dissecados e as amostras de córtex pré-frontal e hipocampo congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C até a realização das análises. No protocolo II-B, onde os encéfalos serão utilizados para a realização da técnica de imuno-histoquímica (experimentos ainda em andamento), os animais foram anestesiados profundamente com superdose de cetamina e xilazina e perfundidos transcardiacamente com 50 ml de salina e 50 ml de paraformaldeído 4% (PFA 4%) para a fixação dos encéfalos, os quais foram dissecados e armazenados por 24 h em PFA 4% e armazenados em sacarose 30% até o procedimento de fatiá-los.

4.5 PROTOCOLOS BIOQUÍMICOS: EXPERIMENTOS EX VIVO

4.5.1 Quantificação do colesterol sérico por teste colorimétrico

A quantificação do colesterol total no soro dos camundongos foi realizada utilizando reagentes comerciais (Gold Analisa®). Foi pipetado 1 ml de reagente e 10 ul de cada amostra em microtubos, deixando-se as amostras no banho-maria (37 °C) por 10 min. Em seguida, 200 ul de cada amostra foram pipetados em placa de 96 poços, juntamente com 200 ul de reagente (Branco) e 200 ul de Padrão (1 ml de reagente + 10ul de padrão), como manda as especificações do fabricante. Os resultados feitos em duplicatas e expressos em mg/dL.

4.5.2 Quantificação dos níveis de corticosterona no sangue por ELISA

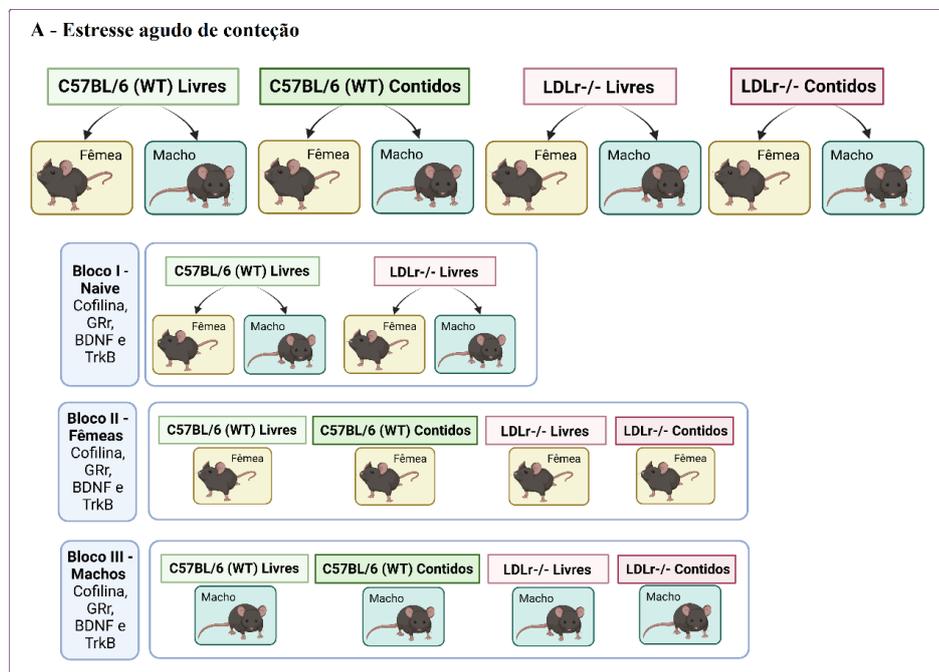
Essa quantificação foi realizada no sangue dos animais do protocolo II-A e III, com o objetivo de ter um controle do protocolo de estresse, o sangue foi coletado como descrito anteriormente e os níveis de corticosterona foram mensurados a partir do soro sanguíneo, empregando o método de ELISA, utilizando kit comercial IBL International®. Após a remoção das amostras do freezer, foram pipetados 20 ul de cada amostra, padrão e controle em seus devidos poços, sendo em seguida colocado 200 ul do conjugado enzimático em cada poço, misturado por 10 segundos e incubado por 60 min em temperatura ambiente. O conteúdo dos poços foi vigorosamente descartado e a placa foi enxaguada 3 vezes com 400 ul de solução de

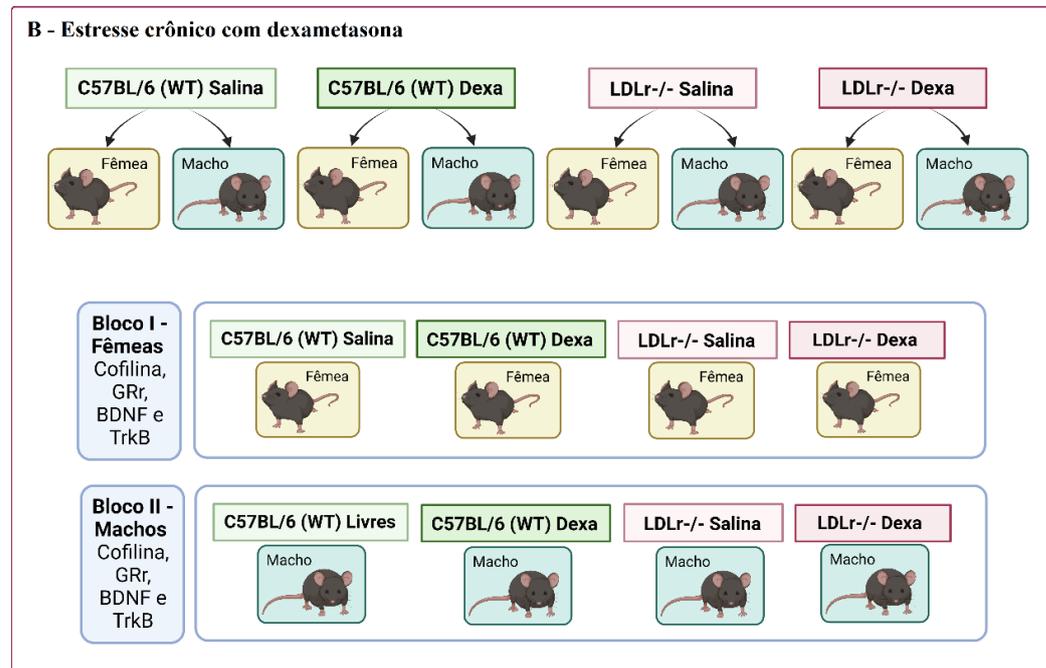
lavagem diluída por poço, a placa foi golpeada com força no papel para a remoção eficiente das gotas residuais. Após isso, 100 μ l de solução do substrato foi adicionada em cada poço e incubada por 15 min em temperatura ambiente. Para o término da reação enzimática, foi adicionado 50 μ l de solução de parada em cada poço e determinado a absorbância da solução em cada poço em 450 nm na Multileitora Infinite M200 – TECAN no LAMEB/UFSC.

4.5.3 Imunodeteção de proteínas por *Western Blotting*

Os grupos experimentais para as análises dos imunocorrelatos da neurotrofina BDNF e dos receptores TrkB e GR foram divididos conforme a Figura 14.

Figura 14: Grupos experimentais utilizados para análises de Western Blotting.





Legenda: A) Grupos experimentais do protocolo de estresse agudo de contenção; os animais dos grupos, submetidos aos testes comportamentais, foram divididos em III blocos: Bloco I, foi formado somente com animais naive, ou seja, os animais controles, não submetidos ao estresse agudo de contenção. O Bloco II, foi constituído somente com as fêmeas, controles e estressadas. O Bloco III, foi feito apenas com os machos, controles e estressados. Para todos os blocos foram analisadas as proteínas BDNF, TrkB, GR e cofilina nas estruturas de Córtex Pré-frontal e Hipocampo. B) Grupos experimentais do protocolo de estresse crônico com dexametasona; aqui os animais dos grupos, submetidos aos testes comportamentais, foram divididos em dois blocos: Bloco I, onde se analisou somente as fêmeas submetidas ao protocolo e o Bloco II, onde foi analisado somente os machos submetidos ao protocolo. Para todos os blocos foram analisadas as proteínas BDNF, TrkB, GR e cofilina (usada para normalização) nas estruturas de Córtex Pré-frontal e Hipocampo. Fonte: *Imagens A e B produzidas pela autora com Biorender® (2023).*

4.5.3.1 Preparação de amostras

Para a detecção do imunoconteúdo das proteínas alvo, foram preparadas amostras de membranas totais de CPF e HIP. As estruturas foram homogeneizadas manualmente com pistilo de plástico em 350 μ L (para CPF e HIP) de tampão RIPA (do inglês *Radio Immuno Precipitation Assay Buffer*; Merc Cat. #20-188, Lot #3905925, com a formulação de 100 ml de 0,5M Tris-HCl, pH 7,4, 1,5M de NaCl, 2,5% de Ácido Deoxicolato, 10% NP-40 e 10mM EDTA). Foi diluído 1 parte de RIPA #20-188 em 9 partes de água destilada e acrescentado para cada 20 ml de RIPA os inibidores de proteína (PMSF 200 μ L, NaF 500 μ L, Na₃VO₄ 100 μ L e Coquetel Inibidor de protease 200 μ L). O homogenato foi centrifugado (12000 x g por 20 min a 4°C) para o assentamento dos debris celulares, e alíquotas de 40 μ L (CPF e HIP) foram retiradas para a quantificação das proteínas totais. Foi então acrescentado 270 μ L (CPF e HIP) de solução *Laemmli 2x* (Catalog #161- 0737 BIO-RAD, contendo Tris-HCl 65,8mM pH 6,8, SDS 2,1%,

glicerol 26.3%, azul de bromofenol 0,01% - onde foi adicionado 50 ul de 2-mercaptoetanol para cada 950 ul de *Laemmli 2X*) para a quebra das ligações não-covalentes, pontes dissulfeto, adição de carga aniônica das proteínas e aumento da densidade da amostra. Após homogeneização a amostra foi aquecida por 10 min a 70°C para a desnaturação físico-química das proteínas e armazenada a -20°C até a etapa de eletroforese.

4.5.3.2 *Dosagem de proteínas*

As proteínas totais foram determinadas pelas alíquotas de amostra, retiradas para dosagem na etapa de preparo das amostras. A concentração de proteínas totais se deu pelo método colorimétrico de Lowry (1951). Portanto, foi utilizado o reagente de Lowry (código L3540 – Sigma) adicionado em 5 ul de amostra diluídas em 95 ul de água MiliQ, para a determinação da curva padrão, foi utilizada a proteína albumina de soro bovino (BSA). Em seguida, aguardou-se 10 min até o passo de se acrescentar 50 ul do reagente de Folin Ciocalteau's (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) 0,45N no escuro em cada poço, após isso se esperou 30 min, ao fim a placa foi levada ao LAMEB/UFSC para a leitura de absorbância (750 nm) na Multileitora Infinite M200 – TECAN.

4.5.3.3 *Eletroforese e eletrotransferência*

As amostras (60 µg/µL de proteína) e o padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™/Bio-Rad®) foram colocados em gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE, em meio tampão superior (1X – glicina, SDS, TRIS e MiliQ) onde, por meio de eletroforese, em V=90 por 20 min, depois V=130 por 1h10, foi feita a corrida. Após a migração, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (6 X 8,5 cm) com o equipamento *Semy-dry* (1,2mA/cm² - 245 mV e 30 mV por 1,5 h). O gel foi colocado em “sanduíche” entre camadas de filtro grosso e fino embebidos em tampão de transferência (TRIS 25mM, Glicina 192mM, Metanol 10% e MiliQ p/ 1L). Para confirmar a eficiência da corrida e transferência, foi realizada a coloração com Ponceau 0,5%. Após 5 min, as membranas foram lavadas três vezes com ácido acético 1% e duas vezes com água MiliQ para a retirada do corante. Após a membrana secar, foi devidamente anotado as bandas indicativas do padrão de massa molecular com uma caneta e a membrana foi armazenada em filtro até seu uso.

4.5.3.4 Imunodeteccção de proteínas

Com as proteínas aderidas à membrana de nitrocelulose, é possível fazer com que anticorpos se liguem e ocorra a deteção de proteínas específicas. Para isso, a membrana foi incubada por 1 h com solução de bloqueio, na qual foi usada albumina de soro bovino (BSA – 5% diluída em TBS (Tris 10mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) que ocupa os sítios de ligações possíveis. Após três lavagens com TBS-T (Tween-20 1% em TBS), foi realizada a incubação *overnight* a 4°C com os anticorpos primários diluídos em BSA 2% em TBS-T, como demonstrado na Tabela 1. Para remoção de ligações inespecíficas, foram realizadas três lavagens com TBS-T por 5 min e incubadas por 1 h a temperatura ambiente com os seus devidos anticorpos secundários. Após mais três lavagens com TBS-T e duas lavagens com TBS, as membranas foram reveladas com o kit super ECL (GE Healthcare[®]) no equipamento *Chemidoc* (Bio-Rad[®]/LAMEB/UFSC).

Tabela 1: Proteínas analisadas por Western Blotting.

| <i>Anticorpo</i> | <i>Peso molecular</i> | <i>Fabricante/ Código do produto</i> | <i>Titulação do 1º</i> | <i>Titulação do 2º</i> |
|------------------|-----------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
| BDNF | 28 kDa | Cell Signalling #47808 | 1:1000 | 1:5.000 |
| GR | 67 – 95 kDa | Santa Cruz – sc-1002 | 1:1000 | 1:10.000 |
| TrkB | 95 e 145 kDa | Santa Cruz - sc-8316 | 1:200 | 1:5.000 |
| Cofilina | 19 kDa | Cell-Signaling #D3F9 | 1:1000 ou 1:3000 | 1:5.000 |
| Rabbit anti-goat | - | Invitrogen #31466 | - | 1:10.000 ou 1:5.000 |

Fonte: Da autora (2023).

4.5.3.5 Quantificação dos níveis de proteínas

A imunorreatividade das bandas foi analisada pela quimiluminescência, a partir da razão da densidade óptica (D.O.) das proteínas alvo pela D.O. da Cofilina, utilizada como controle endógeno. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle. As bandas foram quantificadas utilizando o programa *ImageJ*[®] (versão 1:52R; NIH, MD, EUA).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do *software Statistica*[®] 8.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, EUA). Os dados brutos foram testados para *outliers* usando o teste de *Grubbs* e verificados quanto à normalidade da distribuição (*Kolmogorov-Smirnov*). O teste

t de Student em relação a 33% foi feito no teste das 3 câmaras para analisar a % de tempo de permanência em cada uma das 3 câmaras. A análise de variância (ANOVA) de duas ou três vias, com ou sem medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc de Newman-Keuls*, quando significativo, foi aplicada para comparações múltiplas nos testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado, sociabilidade no campo aberto e 3 câmaras, além do controle de peso e nas análises bioquímicas de dosagem de colesterol, corticosterona e western blotting. O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparar duas amostras independentes no teste de enterrar esferas e quando os dados nos demais testes e análises eram não normais pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados foram representados como valores individuais, média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Os gráficos foram construídos usando o *software GraphPad Prism 7®* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

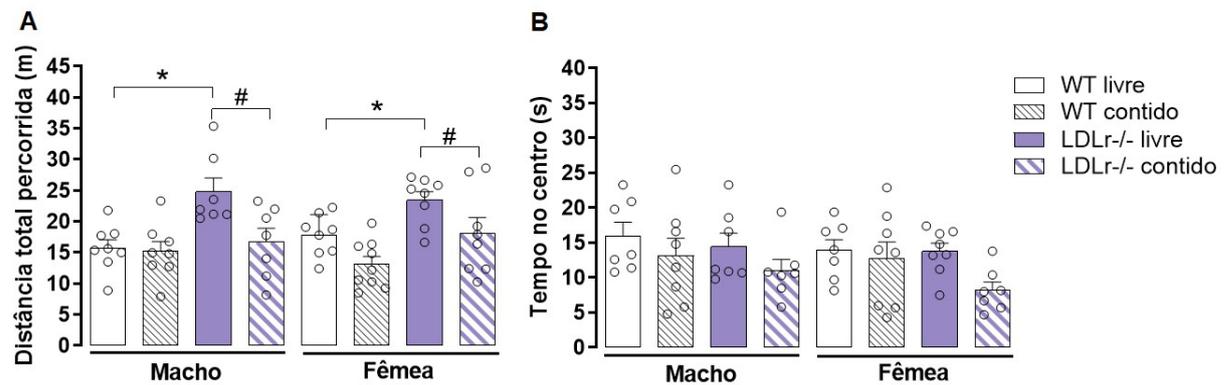
5.1 ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO NOS ANIMAIS WT E LDLR^{-/-} MACHOS E FÊMEAS

5.1.1 Avaliação do comportamento locomotor e tipo-ansioso – Protocolo II-A

A Figura 15 ilustra os resultados obtidos no teste do campo aberto realizado 1 h após término do estresse de contenção. A distância total percorrida foi utilizada como parâmetro de locomoção espontânea, sendo que a ANOVA de três vias indicou um efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,55)=19,550$, $p=0,00005$] e estresse [$F(1,55)=14,849$, $p=0,00031$], sem efeitos significativos para o fator sexo [$F(1, 55)=0,04773$, $p=0,82788$], interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,55)=2,6903$, $p=0,10667$], estresse e sexo [$F(1,55)=0,00080$, $p=0,97756$], linhagem e sexo [$F(1,55)=,04154$, $p=0,83925$] e a interação de todos os fatores [$F(1,55)=1,4106$, $p=0,24006$]. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* indicou que o estresse de contenção agudo não causou alterações na locomoção no campo aberto nos animais WT machos e fêmeas ($p<0,05$). Contudo, com relação à linhagem, os animais LDLr^{-/-}, tanto machos quanto fêmeas, apresentaram uma hiperlocomoção quando comparado aos WT do mesmo sexo ($p<0,05$). Quando os efeitos do estresse de contenção foram comparados nos animais LDLr^{-/-}, foi observado que o estresse de contenção reduziu a locomoção nos animais machos e fêmeas do grupo LDLr^{-/-} quando comparado aos animais LDLr^{-/-} controle ($p<0,05$) (Figura 15 A).

O comportamento relacionado à ansiedade foi analisado pelo parâmetro de tempo no centro do teste do campo aberto. A ANOVA de três vias indicou um efeito significativo para o fator estresse [$F(1, 52)=6,7760$, $p=0,01201$], todavia, sem efeito significativo para os fatores linhagem [$F(1,52)=3,5541$, $p=0,06499$], sexo [$F(1,52)=1,3655$, $p=0,24792$], interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1, 52)=0,14669$, $p=0,70328$], estresse e sexo [$F(1,52)=0,46913$, $p=0,49643$], linhagem e sexo [$F(1,52)=0,00025$, $p=0,98749$] e nem para a interação dos fatores [$F(1,52)=1,9663$, $p=0,16679$]. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* não apresentou significância (Figura 15 B).

Figura 15: Teste do Campo Aberto – Estresse Agudo de Contenção.



Legenda: A) Distância total percorrida (m) (* $p < 0,05$, # $p < 0,05$). B) Tempo (s) que os animais permaneceram na região central do aparato. Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM ($n=7-9$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a ANOVA de três vias (A e B) seguidas do teste *post-hoc* de *Newman Keuls* (A). Fonte: Da autora (2023).

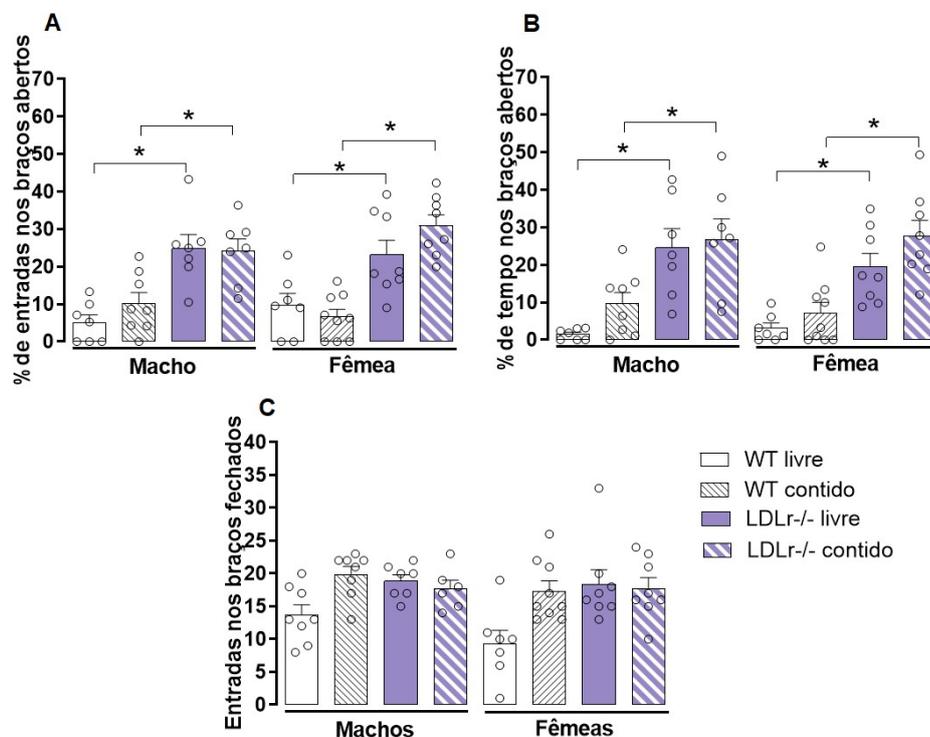
A sensibilidade dos animais LDLr-/- e WT machos e fêmeas aos possíveis efeitos comportamentais do estresse também foi analisada no teste do labirinto em cruz elevado quanto aos parâmetros relacionados ao comportamento tipo-ansioso (Figura 16). Em relação a percentagem de entradas nos braços abertos, a ANOVA de três vias indicou um efeito significativo no fator linhagem [$F(1, 53)=70,543$, $p=0,00000$], e para a interação dos fatores estresse, linhagem e sexo [$F(1,53)=3,3109$, $p=0,07447$], mas não apresentou efeitos significativos para o fator estresse [$F(1,53)=1,5337$, $p=0,22101$], sexo [$F(1,53)=0,52413$, $p=0,47227$], interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,53)=0,57230$, $p=0,45270$], estresse e sexo [$F(1,53)=0,02073$, $p=0,88606$] e linhagem e sexo [$F(1,53)=0,25550$, $p=0,61533$]. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* indicou que nos animais WT machos e fêmeas o estresse de contenção não causou alterações na percentagem de entradas nos braços abertos do aparato ($p < 0,05$). Um efeito da linhagem foi observado visto que os grupos LDLr-/- controle machos e fêmeas apresentaram maior número de entradas nos braços abertos quando comparado a animais WT do mesmo sexo ($p < 0,05$), um indicativo de redução nos níveis de ansiedade. Ainda, o estresse agudo de contenção não foi capaz de mudar o perfil de redução nos níveis de ansiedade observados nos animais LDLr-/- machos e fêmeas, e um aumento no número de entradas nos braços abertos foi observado quando comparado aos animais WT submetidos ao estresse de contenção machos e fêmeas ($p < 0,05$) (Figura 16 A).

Em relação à percentagem de tempo nos braços abertos (Figura 16 B), a ANOVA de três vias, a análise estatística indicou um efeito significativo no fator linhagem [$F(1,53)=57,087$, $p=0,000001$], mas não apresentou efeito significativo no fator estresse [$F(1,53)=3,1515$, $p=0,08160$], sexo [$F(1,53)=0,24132$, $p=0,62528$], a interação dos fatores estresse e linhagem

[F(1,53)=0,36656, p=0,54747], estresse e sexo [F(1,53)=0,35482, p=0,55393], linhagem e sexo [F(1,53)=0,09622, p=0,75763] e a interação de todos os fatores [F(1,53)=1,9888, p=0,16431]. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* indicou que nos animais WT machos e fêmeas o estresse de contenção não causou alterações na percentagem de tempo nos braços abertos do aparato (p<0,05). Um efeito da linhagem foi observado visto que os grupos LDLr^{-/-} controle machos e fêmeas passaram mais tempo nos braços abertos quando comparado a animais WT do mesmo sexo (p<0,05), um indicativo de redução nos níveis de ansiedade. Ainda, o estresse agudo de contenção não foi capaz de mudar o perfil de redução nos níveis de ansiedade observados nos animais LDLr^{-/-} machos e fêmeas, e um aumento no tempo nos braços abertos foi observado quando comparado aos animais WT submetidos ao estresse de contenção machos e fêmeas (p<0,05) (Figura 16 B).

Como um parâmetro locomotor adicional, foi usado o número de entradas nos braços fechados do aparato (Figura 16 C). Os resultados não tiveram distribuição normal e foram avaliados por um teste não paramétrico. O teste de *Kruskal-Wallis* indicou efeito significativo [H (7, N= 61) =18,26727 p=0,0108], porém a tabela de comparação não demonstrou efeito significativo entre os grupos.

Figura 16: Teste do Labirinto em Cruz Elevado – Estresse Agudo de Contenção.



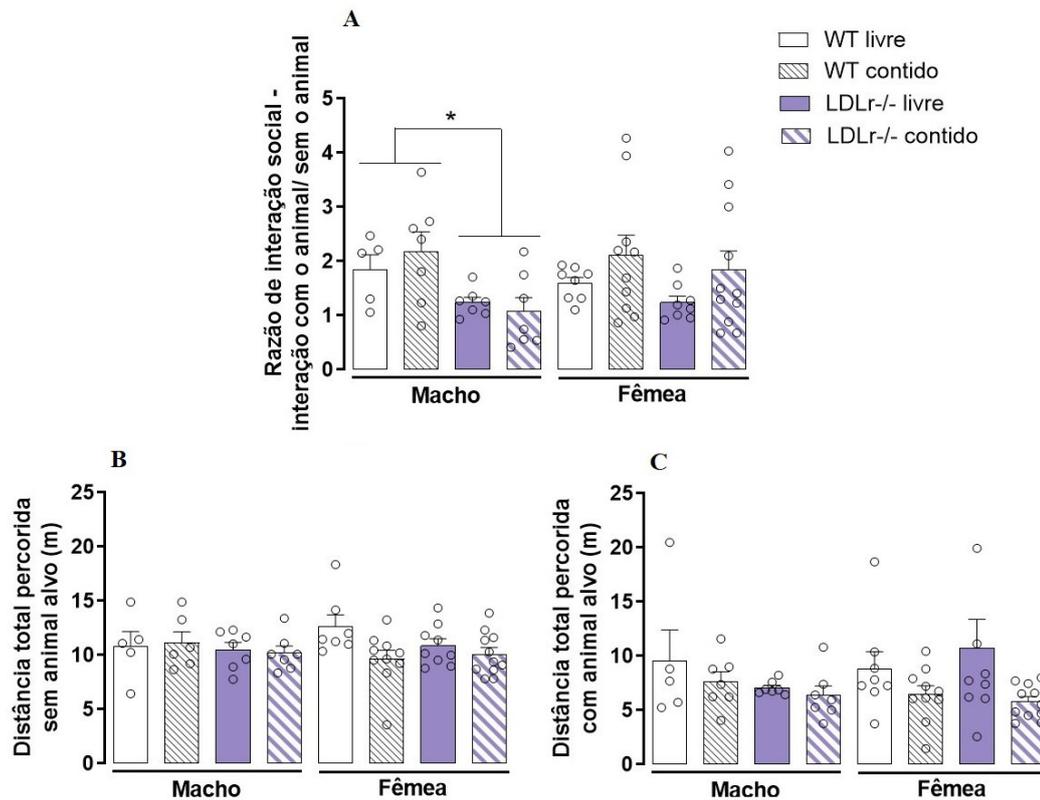
Legenda: A) % entradas nos braços abertos. B) % tempo nos braços abertos. C) Número de entradas nos braços fechados. Os dados representam os valores individuais, média ± EPM (n=7-9). As análises estatísticas foram

realizadas utilizando-se a ANOVA de três vias (A, B) seguidas do teste *post-hoc* de *Newman Kells*. Análises realizadas com Teste de *Kruskal-Wallis* (C). * $p < 0,05$, # $p < 0,05$. Fonte: Da autora (2023).

5.1.2 Avaliação do comportamento relacionado à ansiedade social em animais submetidos ao estresse agudo de contenção– Protocolo II-B

Para analisar os dados obtidos no teste de sociabilidade no campo aberto, foi considerado o índice de ansiedade social como uma razão de interação social, onde o tempo no quadrante social, com o animal alvo presente, foi dividido pelo tempo no quadrante social com o animal alvo ausente. A ANOVA de três vias demonstrou efeito significativo para o fator genótipo [$F(1,54)=10,047$, $p=0,00251$], mas sem efeitos para os demais fatores, sexo [$F(1,54)=0,08279$, $p=0,77466$], estresse [$F(1,54)=1,7540$, $p=0,19095$], interação sexo e genótipo [$F(1,54)=1,1676$, $p=0,28470$], interação sexo e estresse [$F(1,54)=0,80565$, $p=0,37340$], interação genótipo e estresse [$F(1,54)=0,63129$, $p=0,43036$] e a interação de todos os fatores [$F(1, 54)=0,21534$, $p=0,64448$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* demonstrou que os animais LDLr^{-/-} machos tem uma maior ansiedade social, tendo uma menor preferência social do que os animais WT machos ($P < 0,05$) (Figura 17 A). O teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* não demonstrou significância estatística quanto à distância total percorrida durante a sessão sem o animal alvo [$H(7, N= 60) = 6,668954$ $p=0,4641$] (Figura 17 B). Também não houve diferenças estatísticas durante a sessão com o animal alvo em relação à distância total percorrida analisada com o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* [$H(7, N= 60) = 7,686637$ $p=0,3610$] (Figura 17 C).

Figura 17: Teste da sociabilidade no campo aberto – Estresse de contenção / Protocolo II B.

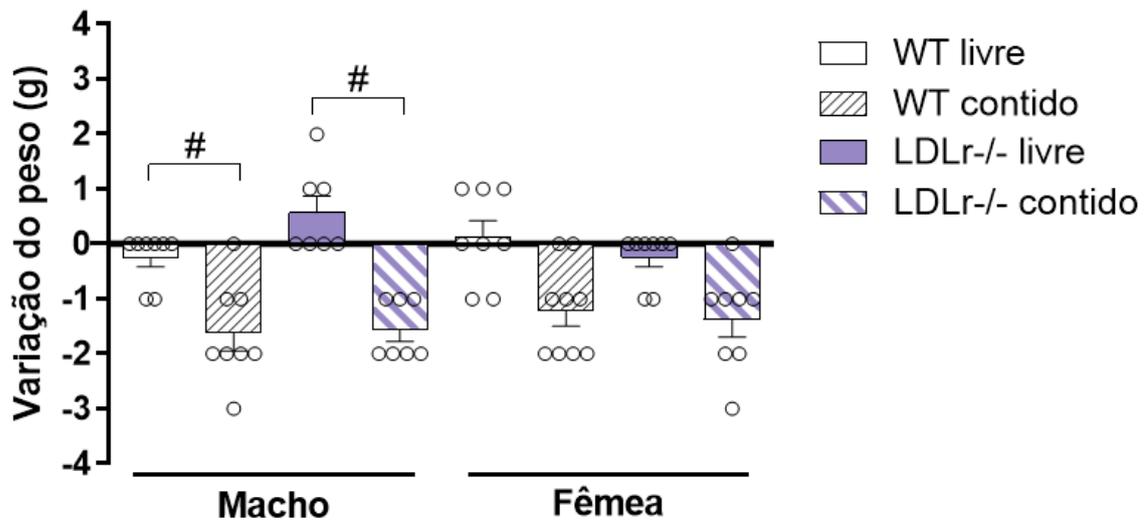


Legenda: A) Razão de interação social (tempo de interação com o animal alvo presente/ tempo de interação com o animal alvo ausente). B) Distância total percorrida sem o animal alvo presente (m). C) Distância total percorrida com o animal alvo presente (m). Os dados representam valores individuais, média \pm EPM (n=7-9). Análises estatísticas foram realizadas com Teste ANOVA de três vias seguidas pelo de *Newman-Keuls* quando significativo. * $p < 0,05$ em relação a linhagem. Fonte: Da autora (2023).

5.1.3 Variação de peso durante o protocolo de estresse agudo de contenção - Protocolo II-A

A variação de peso foi analisada diminuindo o peso do dia da eutanásia (dia 2 do protocolo) do peso anterior ao momento de estresse (dia 1), sendo que os grupos controles foram pesados anteriormente ao comportamento e anterior à eutanásia. O teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* demonstrou diferenças significativas [$H(7, N=63) = 35,61618$ $p = 0,0000$] nos grupos de machos, sendo que machos WT contidos perderam peso quando comparados aos WT livres. O grupo LDLr-/- macho contido também apresentou uma redução no ganho de peso quando comparado ao grupo LDLr-/- controle. Não foram observadas diferenças estatísticas no ganho de peso das fêmeas (Figura 18).

Figura 18: Variação do peso no protocolo de estresse agudo de contenção.



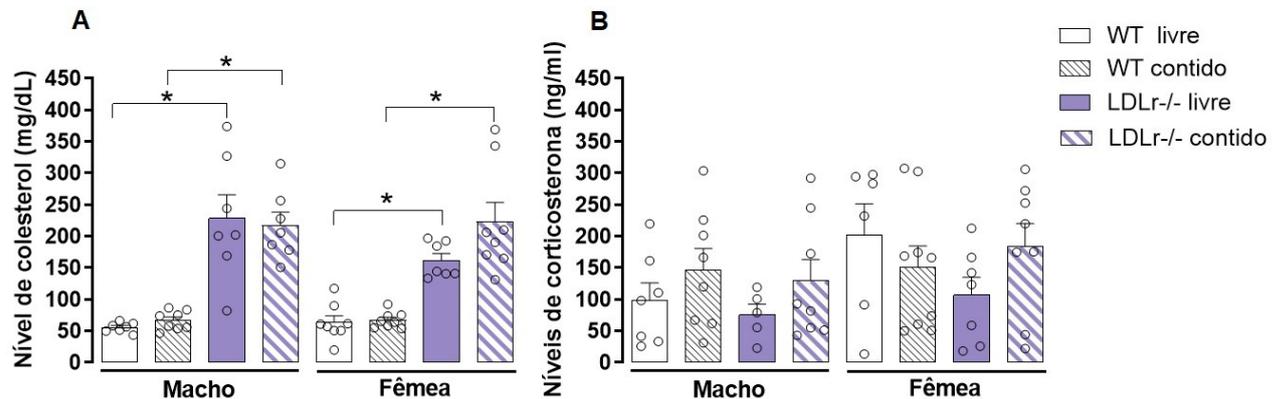
Legenda: Variação de peso dos animais. Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=7-8). Análises estatísticas foram realizadas com Teste de *Kruskal-Wallis*. # $p < 0,05$. Fonte: Da autora (2023).

5.1.4 Quantificação dos níveis de colesterol e corticosterona séricos – Protocolo II-A

Os níveis séricos de colesterol total dos animais foram avaliados a partir do soro sanguíneo retirado durante a eutanásia, os resultados estão apresentados na Figura 19 A. A ANOVA de três vias indicou um efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,52)=114,87$, $p=0,00000$], mas sem efeitos para o fator sexo [$F(1,52)=0,93714$, $p=0,33749$], estresse [$F(1,52)=1,4642$, $p=0,23174$], interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,52)=0,42466$, $p=0,51749$], estresse e sexo [$F(1,52)=1,4526$, $p=0,23356$], linhagem e sexo [$F(1,52)=1,6371$, $p=0,20640$], e interação de todos os fatores [$F(1,52)=2,2045$, $p=0,14364$]. Conforme esperado, o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que os níveis séricos de colesterol total são em torno de 3 vezes superiores nos animais LDLr-/- de ambos os sexos em relação aos grupos WT ($p < 0,05$) (Figura 19 A).

Os níveis de corticosterona séricos estão representados na Figura 19 B. A ANOVA de três vias não indicou efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,50)=1,1016$, $p=0,29897$], fator sexo [$F(1,50)=3,8175$, $p=0,05632$], estresse [$F(1,50)=1,6747$, $p=0,20157$], interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,50)=1,8286$, $p=0,18238$], estresse e sexo [$F(1,50)=0,61306$, $p=0,43733$], linhagem e sexo [$F(1,50)=0,04625$, $p=0,83060$], e interação de todos os fatores [$F(1,50)=1,5522$, $p=0,21862$].

Figura 19: Colesterol e Corticosterona séricos nos animais submetidos ao estresse agudo de contenção.

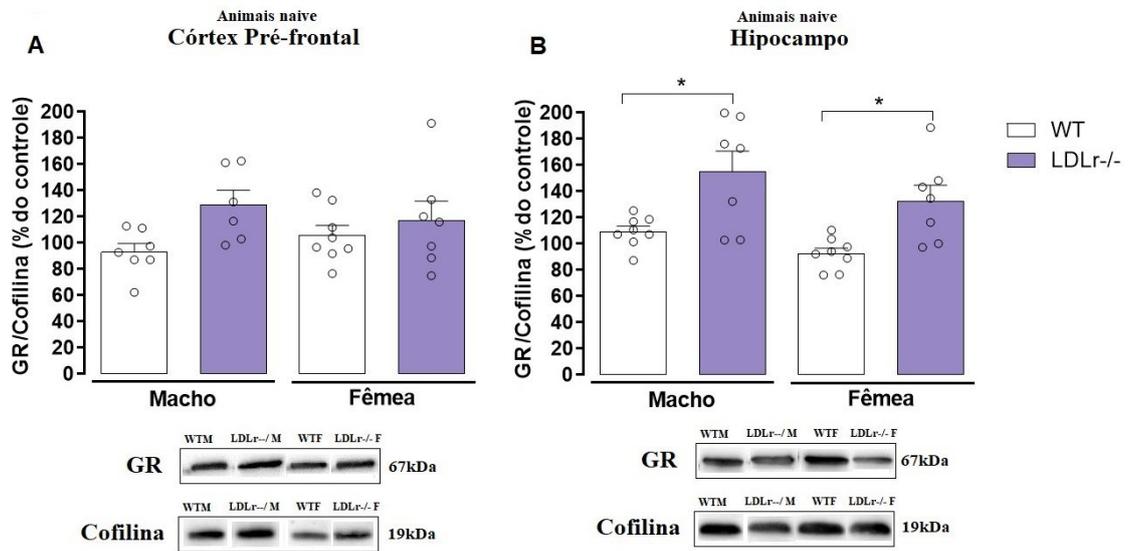


Legenda: A) Nível de colesterol sérico em mg/dL. B) Nível de corticosterona sérica em ng/mL. Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=7-8). Análises estatísticas foram realizadas com Teste ANOVA de três vias seguidas pelo teste de *Newman-Keuls*. * $p < 0,05$ em relação a linhagem. Fonte: Da autora (2023).

5.1.5 Avaliação neuroquímica das amostras encefálicas de córtex pré-frontal e hipocampo de animais LDLr-/- e WT naive

Foram analisadas as alterações no imunoconteúdo proteico dos receptores GR no córtex pré-frontal e no hipocampo dos animais LDLr-/- machos e fêmeas (Figura 20-A e B). Para o córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator linhagem [F(1,24)=5,3081, $p=0,03019$], mas sem efeito para os fatores sexo [F(1,24)=,00536, $p=0,94227$] e a interação dos fatores sexo e linhagem [F(1,24)=1,4123, $p=0,24631$]. Por outro lado, o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* não indicou diferenças significativas entre os grupos (Figura 20 – A). Quanto ao imunoconteúdo do receptor GR no hipocampo, A ANOVA de duas vias apresentou efeitos significativos para o fator linhagem [F(1,26)=19,249, $p=0,00017$], mas sem efeitos significativos para o fator sexo [F(1, 26)=3,9942, $p=0,05622$] e para a interação dos fatores [F(1, 26)=0,07342, $p=0,78856$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que o imunoconteúdo proteico dos receptores GR no hipocampo dos animais LDLr-/- machos e fêmeas é maior do que seus devidos grupos controle (Figura 20-B).

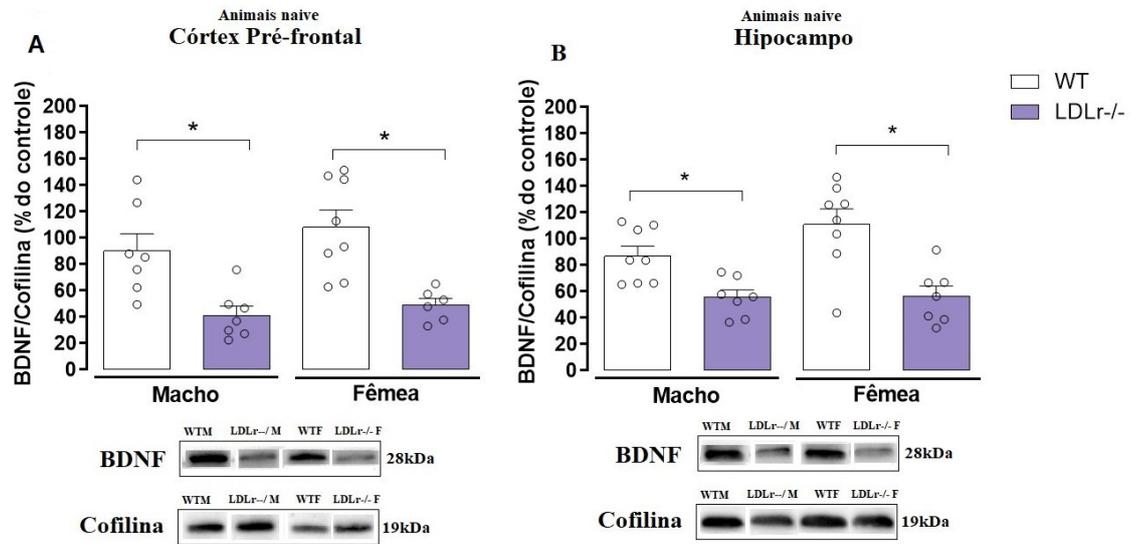
Figura 20: Análise do imunocnteúdo proteico do GR no córtex pré-frontal e hipocampo de animais naive.



Legenda: A) Representação dos níveis proteicos de GR no córtex pré-frontal de animais naive. B) Representação dos níveis proteicos de GR no hipocampo de animais naive. Os dados representam os resultados individuais, média \pm EPM (n=6-8) Análises estatísticas foram realizadas com ANOVA de duas vias seguidas pelo teste post-hoc de *Newman-Keuls*. * $p < 0,05$. Fonte: Da autora (2023).

O imunocnteúdo proteico de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo estão apresentados na Figura 21. Quanto ao BDNF no córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,24)=25,905$, $p=0,00003$], mas sem efeitos significativos para o fator sexo [$F(1,24)=1,4663$, $p=0,23773$] e para a interação dos fatores sexo e linhagem [$F(1, 24)=0,23083$, $p=0,63526$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que tanto o grupo LDLr-/- macho quanto fêmea apresentam diminuição dos níveis proteicos de BDNF quando comparados ao seu determinado grupo controle (Figura 21 A). O mesmo perfil acontece no hipocampo, onde a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,26)=25,079$, $p=0,00003$], mas sem efeitos significativos para o fator sexo [$F(1,26)=2,0694$, $p=0,16221$] e para a interação dos fatores [$F(1,26)=1,8366$, $p=0,18701$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que tanto o grupo LDLr-/- macho quanto fêmea, apresentam uma diminuição dos níveis proteicos de BDNF quando comparados ao seu determinado grupo controle (Figura 21-B).

Figura 21: Análise do imunocônteuído proteico de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de animais naíve.



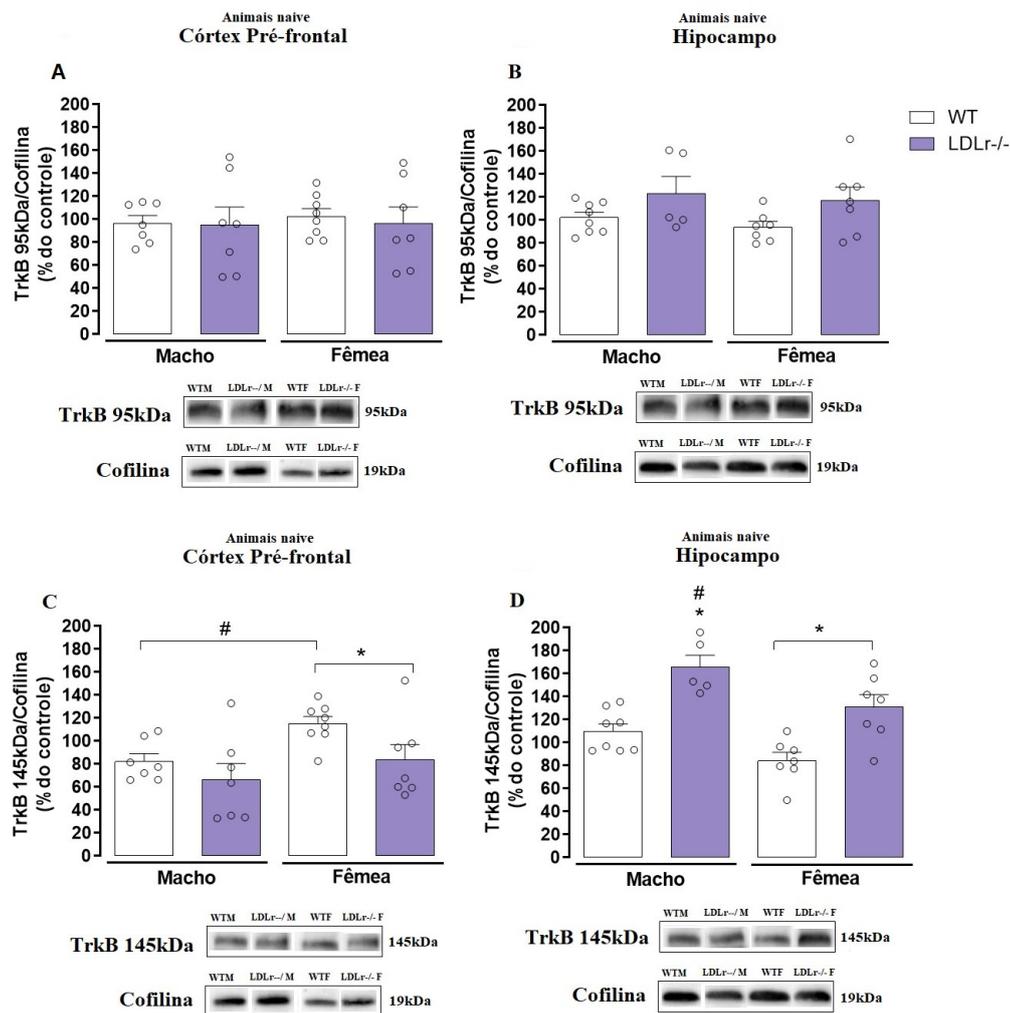
Legenda: A) Representação dos níveis proteicos de BDNF no córtex pré-frontal de animais naíve. B) Representação dos níveis proteicos de BDNF no hipocampo de animais naíve. Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=6-8) Análises estatísticas foram realizadas com Teste ANOVA de duas vias seguidas pelo teste de *Newman-Keuls*. *p<0,05. Fonte: Da autora (2023).

Foram analisados os imunocônteuídos do receptor TrkB totalmente fosforilado (145kDa) e truncado (95kDa) (Figura 22). Quanto ao imunocônteuído de TrkB 145kDa truncado no córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias não indicou nenhum efeito significativo para nenhum dos fatos, sexo [F(1,25)=0,10444, p=0,74925], linhagem [F(1,25)=0,13312, p=0,71829] e a interação [F(1,25)=0,04245, p=0,83844] (Figura 22 A). O mesmo perfil foi visto no imunocônteuído de TrkB 95kDa truncado no hipocampo, onde a ANOVA de duas vias não indicou nenhum efeito significativo em nenhum dos fatores, sexo [F(1,23)=0,60576, p=0,44432], linhagem [F(1,23)=6,0370, p=0,02197] e a interação [F(1,23)=0,01575, p=0,90121] (Figura 22 B).

No entanto, quanto ao receptor TrkB 145kDa no córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator linhagem [F(1,25)=5,2187, p=0,03110] e sexo [F(1,25)=5,7870, p=0,02387], mas sem efeito para a interação dos fatores sexo e linhagem [F(1,25)=0,55933, p=0,46151]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que o grupo LDLr-/- fêmeas apresentou redução no imunocônteuído proteico de TrkB em comparação ao seu grupo controle, ainda que o grupo controle de fêmeas WT apresenta maior conteúdo proteico de TrkB 145kDa que os machos WT (Figura 22 C). Em relação ao imunocônteuído de TrkB 145kDa no hipocampo, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator linhagem

[F(1,23)=33,743, $p=0,00001$] e sexo [F(1, 23)=11,637, $p=0,00239$], mas sem efeito para a interação dos fatores sexo e linhagem [F(1,23)=0,26966, $p=0,60852$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que o grupo LDLr^{-/-} machos apresentou aumento no imunocontéudo proteico de TrkB 145kd em comparação a todos os outros grupos, também que esse perfil é o mesmo nas fêmeas LDLr^{-/-} quando comparado ao seu grupo controle (Figura 22-D).

Figura 22: Análise do imunocontéudo proteico do receptor TrkB 95kDa e 145kDa no hipocampo e córtex pré-frontal de animais naive.



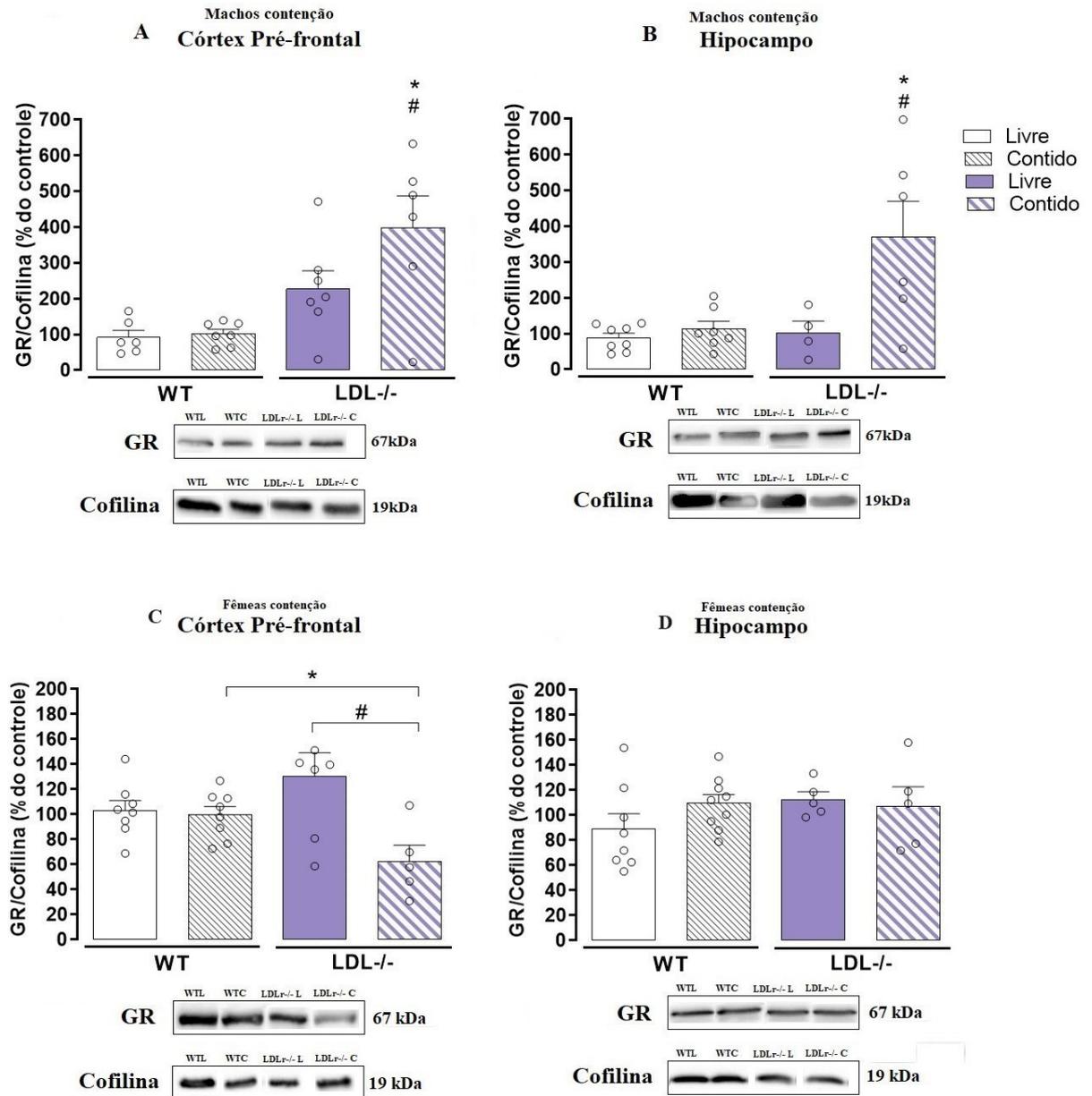
Legenda: A) Representação dos níveis proteicos de TrkB 95kDa no córtex pré-frontal de animais naive. B) Representação dos níveis proteicos de TrkB 95kDa no hipocampo de animais naive. C) Representação dos níveis proteicos de TrkB 145kDa no córtex pré-frontal de animais naive. D) Representação dos níveis proteicos de TrkB 145kDa no hipocampo de animais naive. Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=5-8). Análises estatísticas foram realizadas com Teste ANOVA de duas vias seguidas pelo teste de *Newman-Keuls* com $*p < 0,05$ (em relação a linhagem), $\# < 0,05$ (em relação ao estresse). Fonte: Da autora (2023).

5.1.6 Avaliação neuroquímica das amostras encefálicas de córtex pré-frontal e hipocampo de machos e fêmeas LDLr^{-/-} e WT e submetidas ao estresse agudo de contenção

Foi analisado as alterações no imunocontéudo proteico dos receptores GR no hipocampo e no córtex pré-frontal dos machos WT e LDLr^{-/-} (Figura 23 A e B). Para o córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias indicou significativo para o fator linhagem [$F(1,22)=18,506$, $p=0,00029$], mas sem efeitos para os fatores estresse [$F(1,22)=3,2529$, $p=0,08501$] e para a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,22)=2,5879$, $p=0,12194$] (Figura 26 A). O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que o grupo LDLr^{-/-} machos contidos apresentam um maior imunocontéudo do GR que todos os outros grupos. Em relação ao imunocontéudo de GR no hipocampo, a ANOVA de duas vias apresentou efeitos significativos para o fator linhagem [$F(1,21)=6,7604$, $p=0,01671$], estresse [$F(1,21)=7,8873$, $p=0,01053$], e para a interação dos fatores [$F(1,21)=5,4626$, $p=0,02941$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que o imunocontéudo proteico dos GR no hipocampo dos machos LDLr^{-/-} contidos é maior do que todos os outros grupos (Figura 26 B).

As alterações no imunocontéudo proteico dos receptores GR no córtex pré-frontal e no hipocampo das fêmeas WT e LDLr^{-/-} estão representadas na Figura 23 C e D). Em relação ao imunocontéudo de GR no córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias apresentou efeitos significativos para o fator estresse [$F(1,24)=8,9801$, $p=0,00625$], e a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,24)=7,1643$, $p=0,01319$], mas sem efeitos significativos para o fator linhagem [$F(1,24)=0,16184$, $p=0,69103$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que o imunocontéudo proteico dos receptores GR no córtex pré-frontal das fêmeas LDLr^{-/-} contidas é menor que das fêmeas LDLr^{-/-} livres e do seu grupo controle (WT contida) (Figura 23 C). No hipocampo, a ANOVA de duas vias indicou ausência de efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,23)=0,91923$, $p=0,34765$], estresse [$F(1,23)=0,46157$, $p=0,50367$] ou para a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,23)=1,3812$, $p=0,25192$] (Figura 23 D).

Figura 23: Análise do imunoconteúdo proteico de GR córtex pré-frontal e hipocampo dos animais WT e LDLr^{-/-} do estresse de contenção.

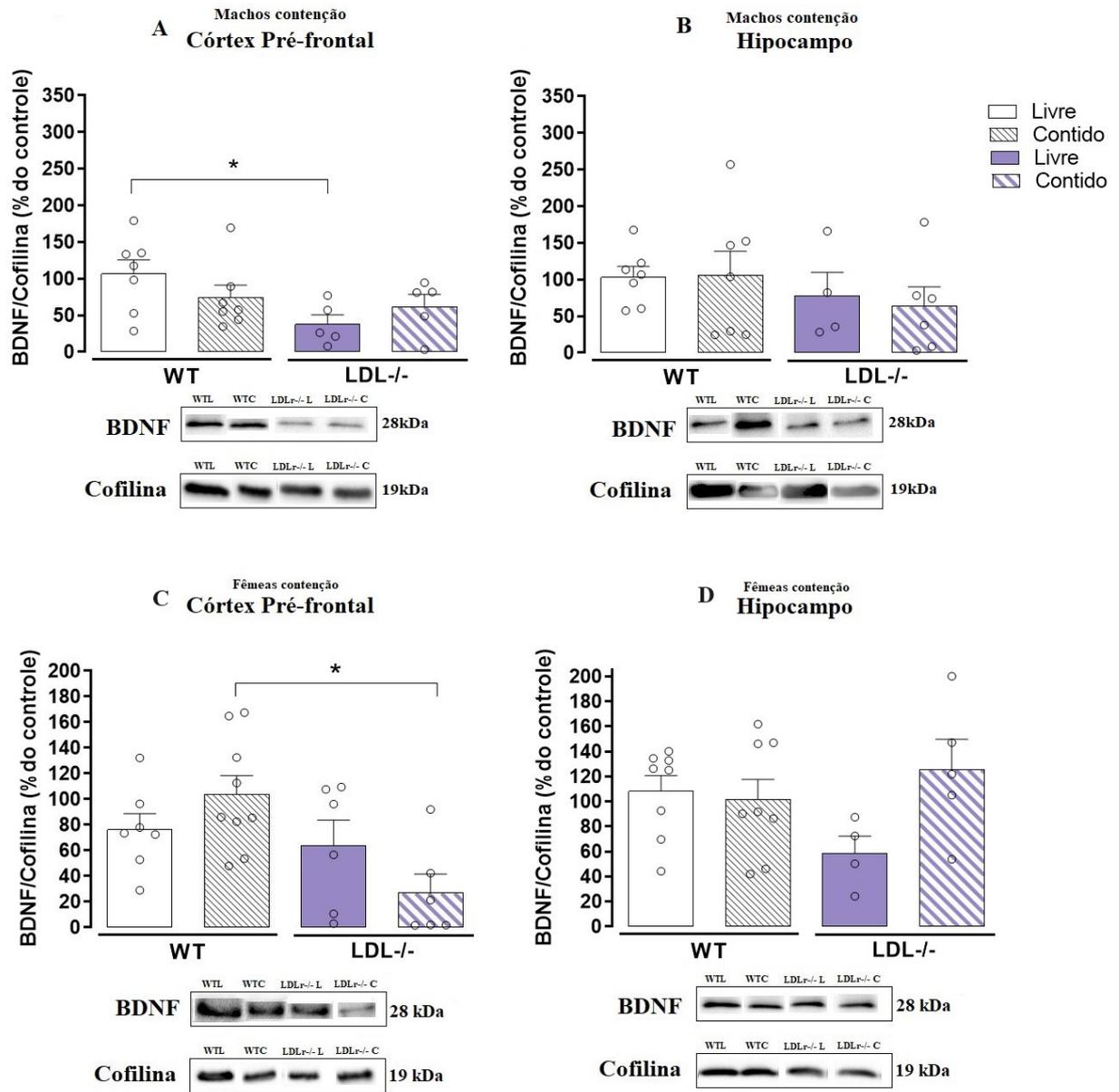


Legenda: A) Representação dos níveis proteicos de GR no córtex pré-frontal dos machos submetidos ao estresse de contenção. B) Representação dos níveis proteicos de GR no hipocampo dos machos submetidos ao estresse de contenção. C) Representação dos níveis proteicos de GR no córtex pré-frontal das fêmeas submetidas ao estresse de contenção. D) Representação dos níveis proteicos de GR no hipocampo das fêmeas submetidas ao estresse de contenção. Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=4-8). Análises estatísticas foram realizadas com ANOVA de três vias seguidas pelo teste post-hoc de *Newman-Keuls*. * $p < 0,05$ em relação a linhagem, # $< 0,05$ para o estresse. Fonte: Da autora (2023).

O imunocontéudo proteico de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo dos machos e das fêmeas livres e contidos estão apresentados na Figura 24. Quanto ao BDNF no córtex pré-frontal dos machos, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator linhagem [F(1,20)=5,0964, p=0,03531], mas sem diferenças estatísticas para os fatores estresse [F(1,20)=0,05854, p=0,81128] e para a interação dos fatores [F(1,20)=2,5052, p=0,12916]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que os machos LDLr^{-/-} livres exibiram uma diminuição do imunocontéudo de BDNF no córtex pré-frontal quando comparado com os machos WT livre (seu grupo controle) (Figura 24 A). O mesmo perfil não foi observado no hipocampo dos machos, onde a ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo para os fatores linhagem [F(1,20)=1,4919, p=0,23613], estresse [F(1,20)=0,05076, p=0,82403] e nem para a interação dos fatores [F(1,20)=0,09142, p=0,76550] (Figura 27 B).

Quanto ao BDNF no córtex pré-frontal das fêmeas, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator linhagem [F(1,24)=8,1821, p=0,00862], e para a interação dos fatores estresse e linhagem [F(1,24)=4,2658, p=0,04985], mas sem efeitos significativos para o fator estresse [F(1,24)=0,09685, p=0,75833]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que as fêmeas LDLr^{-/-} contidas exibem uma diminuição do imunocontéudo de BDNF no córtex pré-frontal quando comparado com as fêmeas WT contidas (seu grupo controle) (Figura 24 C). O mesmo perfil não acontece no hipocampo das fêmeas, onde a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para a interação dos fatores linhagem e estresse [F(1,21)=4,3654, p=0,04903], mas sem efeitos significativos para o fator linhagem [F(1,21)=0,51822, p=0,47954] e estresse [F(1,21)=0,51822, p=0,47954]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* não indicou efeitos significativos (Figura 24 D).

Figura 24: Análise do imunocônteúdo proteico da neurotrofina BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais WT e LDLr^{-/-} do estresse de contenção.



Legenda: A) Representação dos níveis proteicos de BDNF no córtex pré-frontal dos machos submetidos ao estresse de contenção. B) Representação dos níveis proteicos de BDNF no hipocampo dos machos submetidos ao estresse de contenção. C) Representação dos níveis proteicos de BDNF no córtex pré-frontal das fêmeas submetidas ao estresse de contenção. D) Representação dos níveis proteicos de BDNF no hipocampo das fêmeas submetidas ao estresse de contenção. Os dados representam a média \pm EPM (n=4-8). Análises estatísticas foram realizadas com ANOVA de duas vias seguidas pelo teste post-hoc de *Newman-Keuls*. * $p < 0,05$ em relação a linhagem. Fonte: Da autora (2023).

Foram analisados os imunocônteuídos do receptor TrkB totalmente fosforilado (145kDa) e truncado (95kDa) (Figura 25 A - D) nos machos livres e contidos. Quanto ao receptor TrkB 95kDa truncado no córtex pré-frontal dos machos, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos para nenhum dos fatores, para o fator linhagem [$F(1,22)=0,05871$, $p=0,81079$],

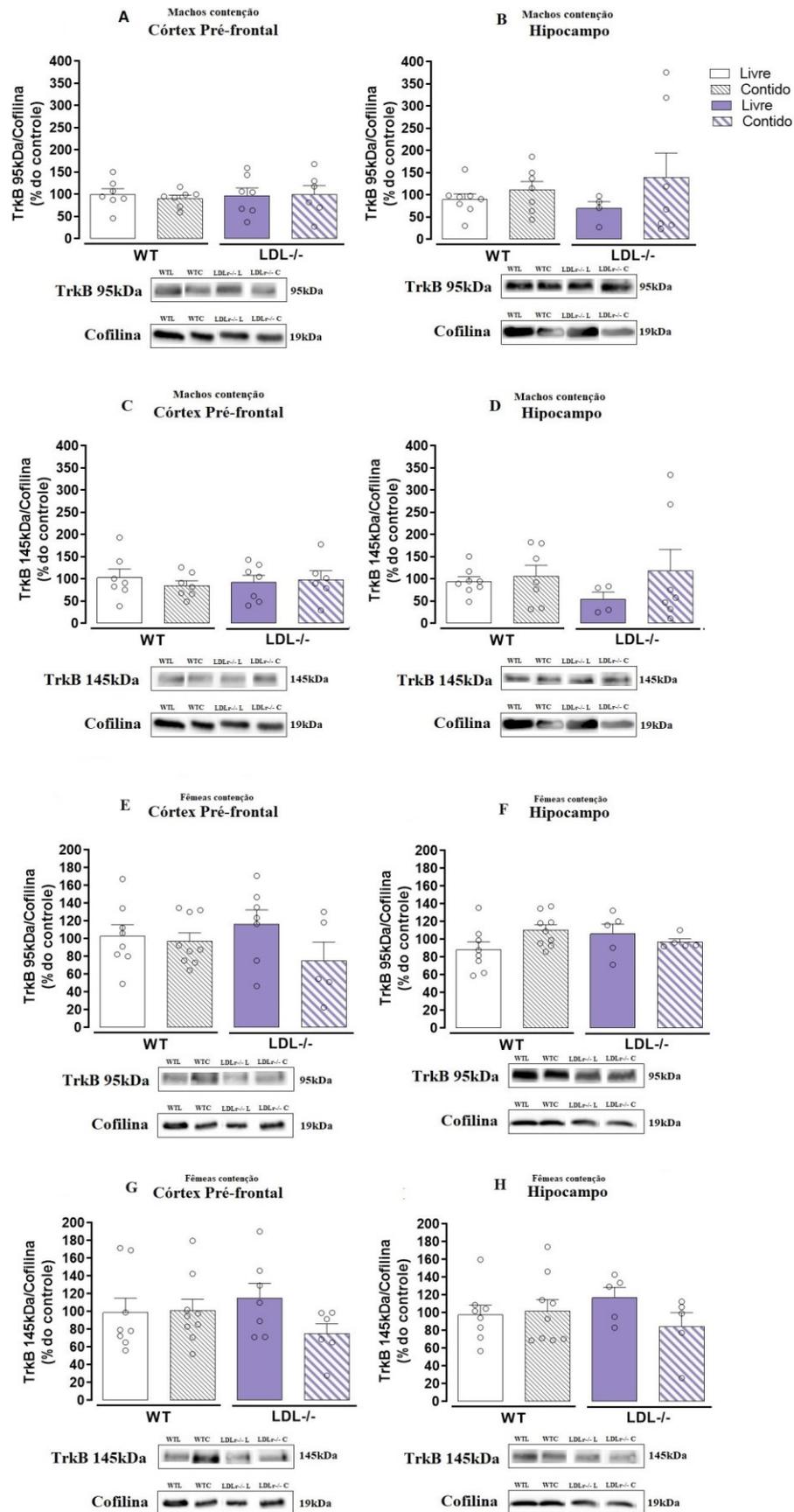
estresse [$F(1,22)=0,09050$, $p=0,76636$], e interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,22)=0,17485$, $p=0,67989$] (Figura 25 A). Quanto ao imunocontéudo de TrkB 95kDa truncado no hipocampo dos machos, o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* não indicou diferenças estatísticas significativas [$H(3, N=36) = 1,667888$ $p=0,6441$] (Figura 25 B).

Quanto ao receptor ao imunocontéudo de TrkB 145kDa no córtex pré-frontal dos machos, a ANOVA de duas vias também não indicou efeitos significativos para os fatores linhagem [$F(1,23)=0,00538$, $p=0,94217$], estresse [$F(1,23)=0,13080$, $p=0,72090$] e a interação dos fatores [$F(1,23)=0,53470$, $p=0,47202$] (Figura 25 C). Resultado similar foi observado no hipocampo dos machos, onde o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* não indicou diferenças estatísticas significativas [$H(3, N=26) = 3,443834$ $p = 0,3281$] (Figura 25 D).

Foram analisados o imunocontéudo do receptor TrkB totalmente fosforilado (145 kDa) e truncado (95 kDa) (Figura 25 E - H) nas fêmeas livres e contidas. Quanto ao imunocontéudo de TrkB 95kDa córtex pré-frontal das fêmeas, a ANOVA de duas vias não indicou nenhum efeito significativo para nenhum dos fatores: estresse [$F(1,25)=2,6930$, $p=0,11331$], linhagem [$F(1,25)=0,08514$, $p=0,77286$] e a interação dos fatores [$F(1,25)=1,5671$, $p=0,22221$] (Figura 25 E). Quanto ao imunocontéudo de TrkB 95kDa truncado no hipocampo das fêmeas, a ANOVA de duas vias indicou efeito significativo na interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,23)=4,5616$, $p=0,04357$], mas sem efeito para os fatores linhagem [$F(1,23)=0,70804$, $p=0,40876$] e estresse [$F(1,23)=1,5456$, $p=0,22632$] isoladamente. Porém o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* não indicou diferenças significativas entre os grupos (Figura 25 F).

Quanto ao receptor TrkB 145kDa no córtex pré-frontal das fêmeas, o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* não indicou diferenças entre os grupos [$H(3, N=30)=3,021889$ $p = 0,3883$] (Figura 24 G). Quanto ao receptor TrkB 145kDa no hipocampo das fêmeas, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos para nenhum dos fatores, para o fator linhagem [$F(1, 23)=0,00383$, $p=0,95118$], estresse [$F(1,23)=1,1146$, $p=0,30204$], e interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,23)=1,9003$, $p=0,18131$] (Figura 25 H).

Figura 25: Análise do imunoc conteúdo proteico do receptor TrkB 145kDa e 95kDa no córtex pré-frontal e hipocampo das fêmeas WT e LDLr^{-/-}



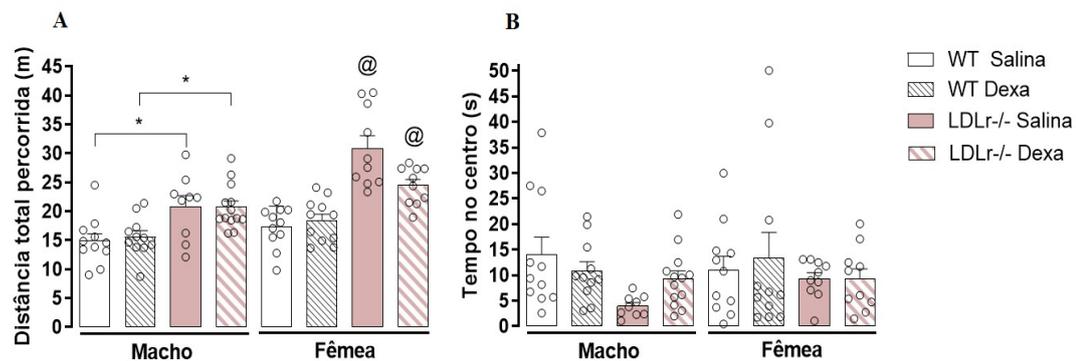
Legenda: A) Representação dos níveis proteicos de TrkB 95kDa no córtex pré-frontal das fêmeas que passaram pelo protocolo de contenção. B) Representação dos níveis proteicos de TrkB 95kDa no hipocampo frontal das fêmeas que passaram pelo protocolo de contenção. C) Representação dos níveis proteicos de TrkB 145kDa no córtex pré-frontal das fêmeas que passaram pelo protocolo de contenção. D) Representação dos níveis proteicos de TrkB 145kDa no hipocampo frontal das fêmeas que passaram pelo protocolo de contenção. Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=5-8). Análises estatísticas foram realizadas com ANOVA de três vias seguidas pelo teste post-hoc de *Newman-Keuls* (A, B e D) ou teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Fonte: Da autora (2023).

5.2 SENSIBILIDADE DOS ANIMAIS LDLR^{-/-} MACHOS E FÊMEAS AO ESTRESSE CRÔNICO COM DEXAMETASONA

5.2.1 Avaliação comportamental dos animais submetidos ao estresse crônico com dexametasona

A Figura 26 mostra os resultados obtidos no teste do campo aberto. A distância total percorrida foi utilizada como parâmetro de locomoção espontânea, sendo que a ANOVA de três vias indicou um efeito significativo para o fator sexo [F(1, 78)=25,014, p=0,000001] e linhagem [F(1, 78)=65,358, p=0,000001], sem efeitos significativos para o fator estresse [F(1, 78)=1,5189, p=0,22149], a interação dos fatores estresse e linhagem [F(1, 78)=4,7976, p=0,03149], estresse e sexo [F(1, 78)=2,4711, p=0,12001], linhagem e sexo [F(1, 78)=5,1213, p=0,02641] e a interação de todos os fatores [F(1, 78)=3,0485, p=0,08475]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que os grupos LDLr^{-/-} fêmea salina e LDLr^{-/-} fêmea dexta percorreram uma distância maior (em metros) do que todos os outros grupos. O grupo LDLr^{-/-} macho dexta percorreu maior distância do que o grupo WT macho salina e dexta, e o grupo LDLr^{-/-} macho salina percorreu maior distância que WT macho salina (Figura 26 A). O tempo de permanência no centro do aparato foi analisado como parâmetro para o comportamento do tipo-ansioso (Figura 26 B). O teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* não indicou diferenças significativas [H (7, N= 86) =11,42801 p =0,1210].

Figura 26: Efeitos do estresse crônico com dexta sobre a atividade locomotora e respostas de ansiedade em camundongos machos e fêmeas WT e LDLr^{-/-} avaliadas no teste do campo aberto.



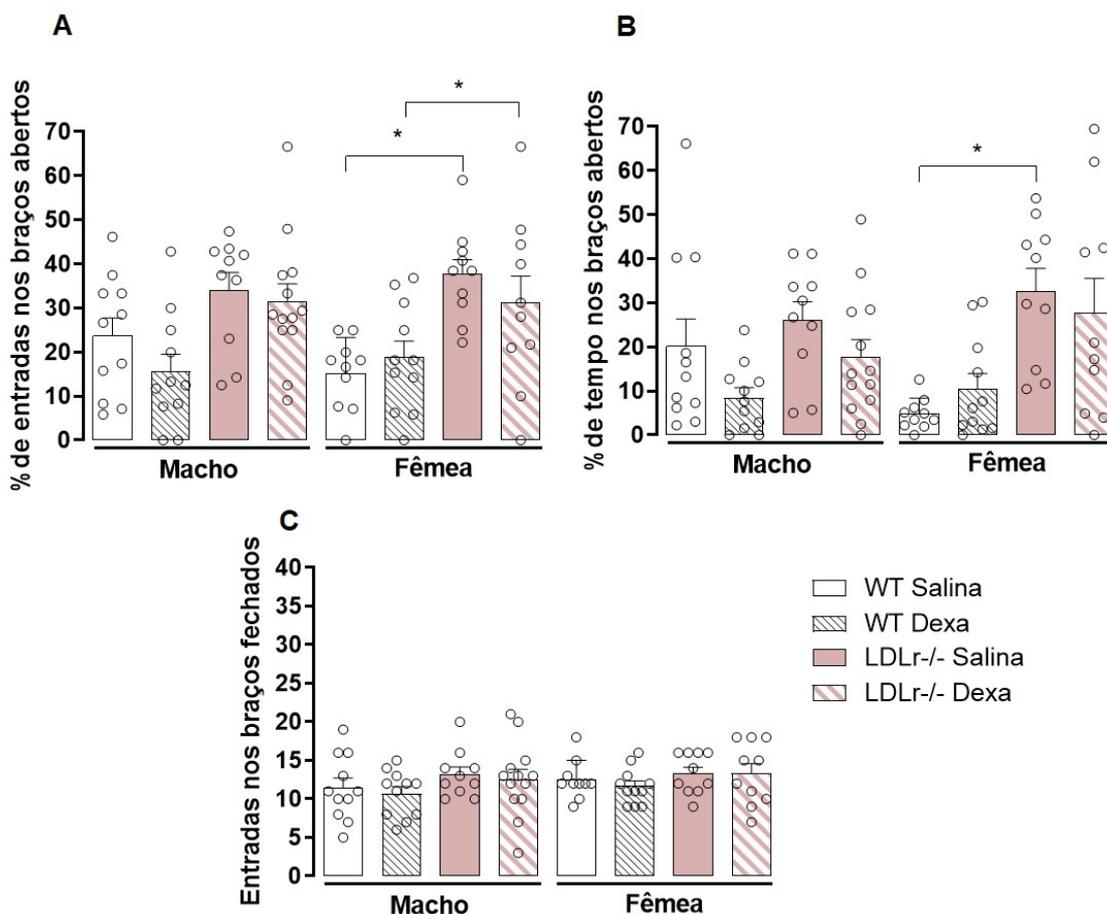
Legenda: A) Distância total percorrida (m) (* $p < 0,05$ em relação ao genótipo, # $p < 0,05$ em relação ao tratamento, @ $p < 0,05$ em relação a todos os grupos/fatores). B) Tempo (s) que os animais permaneceram na região central do aparato. Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM ($n=9-13$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a ANOVA de três vias seguidas do teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* (A) ou o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* (B). Fonte: Da autora (2023).

Os parâmetros relacionados ao comportamento do tipo-ansioso avaliados no teste do Labirinto em Cruz Elevado estão ilustrados na Figura 27. Em relação a percentagem de entradas nos braços abertos, a ANOVA de três vias indicou um efeito significativo no fator linhagem [$F(1,77)=27,462$, $p=0,00000$], mas sem efeito significativo no fator estresse [$F(1,77)=1,2467$, $p=0,26765$], sexo [$F(1,77)=0,04505$, $p=0,83248$], a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,77)=,12304$, $p=0,72672$], estresse e sexo [$F(1,77)=0,37025$, $p=0,54466$], linhagem e sexo [$F(1,77)=0,46382$, $p=0,49789$] e a interação de todos os fatores [$F(1,77)=1,8810$, $p=0,17420$]. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* indicou que o grupo LDLr^{-/-} fêmea salina apresentou maior entrada nos braços abertos do que as fêmeas WT, porém o estresse crônico com dexta não alterou o perfil de comportamentos tipo-ansioso das fêmeas LDLr^{-/-} (Figura 27 A).

Em relação a percentagem de tempo nos braços abertos (Figura 27 B), a ANOVA de três vias indicou um efeito significativo no fator linhagem [$F(1,77)=21,138$, $p=0,00002$] e para a interação dos fatores linhagem e sexo [$F(1,77)=4,9380$, $p=0,02921$], mas indicou ausência de efeitos significativos para os fatores estresse [$F(1,77)=2,0410$, $p=0,15715$], sexo [$F(1,77)=0,04301$, $p=0,83625$], a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,77)=0,26456$, $p=0,60848$], estresse e sexo [$F(1,77)=2,3788$, $p=0,12709$] e a interação de todos os fatores [$F(1,77)=1,2149$, $p=0,27379$]. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* indicou que o grupo LDLr^{-/-} fêmea salina ficou mais tempo nos braços abertos do que o grupo WT fêmea salina. O estresse com dexta não alterou o perfil ansiolítico das fêmeas nocaute.

Como parâmetro locomotor foi usado o número de entradas nos braços fechados do aparato (Figura 27 C). ANOVA de três vias indicou ausência de efeitos significantes para os fatores estresse [$F(1,77)=0,65547$, $p=0,42066$], linhagem [$F(1,77)=3,6699$, $p=0,05911$], sexo [$F(1,77)=0,99060$, $p=0,32271$], a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,77)=0,05693$, $p=0,81206$], estresse e sexo [$F(1,77)=0,05788$, $p=0,81052$], linhagem e sexo [$F(1,77)=0,08555$, $p=0,77069$] e a interação de todos os fatores [$F(1,77)=0,10919$, $p=0,74197$]. Estes resultados indicam o fenótipo de menor ansiedade das fêmeas nocaute pode não ter relação com o aumento da locomoção.

Figura 27: Efeitos do estresse crônico com dexa sobre as respostas de ansiedade em camundongos machos e fêmeas WT e LDLr^{-/-} avaliadas no Labirinto em Cruz Elevado.



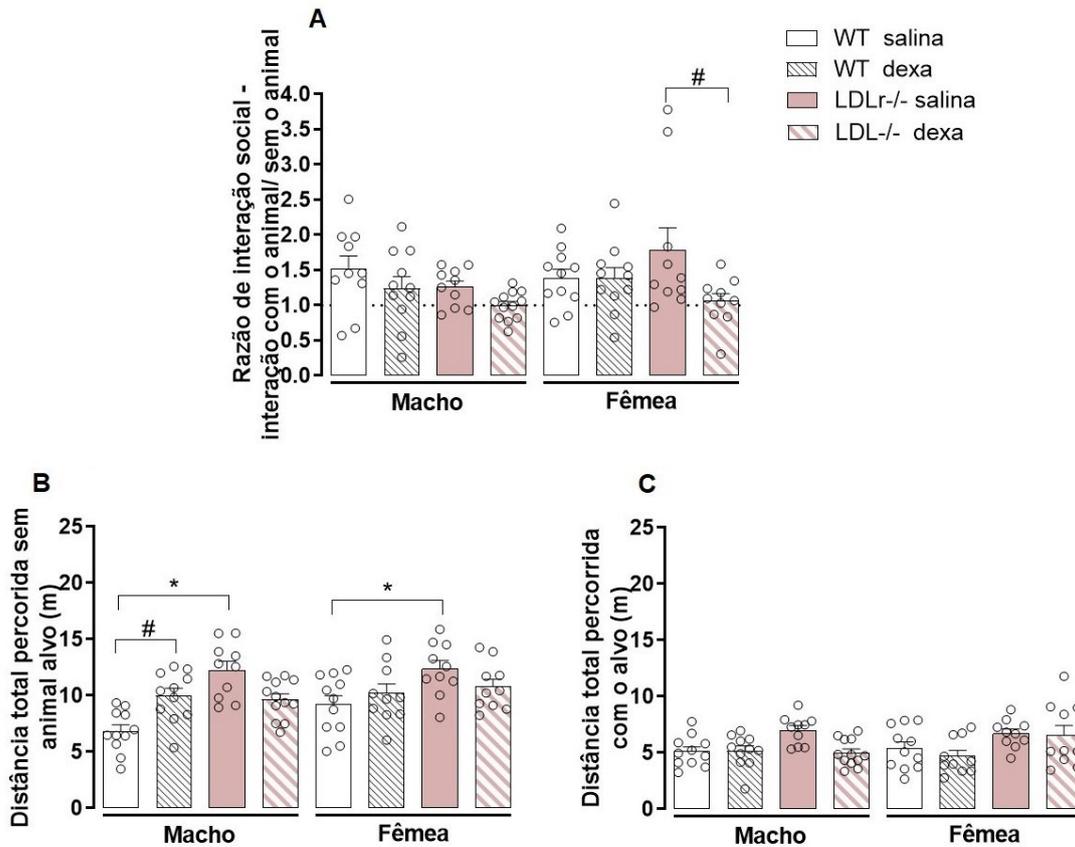
Legenda: A) % entradas nos braços abertos. B) % tempo nos braços abertos. C) Número de entradas nos braços fechados. Os dados representam a média \pm EPM (n=10-13). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a ANOVA de três vias seguidas do teste *post-hoc* de Newman Kells. * $p<0,05$ em relação ao genótipo, # $p<0,05$ em relação ao estresse. Fonte: Da autora (2023).

O primeiro teste para analisar a ansiedade social foi realizado no dia 19 do protocolo experimental através do teste da sociabilidade no campo aberto (Figura 28). Esse teste foi

utilizado a fim de investigar a sociabilidade proativa do animal perante a apresentação de um animal desconhecido, do mesmo sexo e idade aproximada, sendo analisado a razão de interação social como padrão principal (Figura 28 A). A ANOVA de três vias indicou efeito significativo para o fator estresse [$F(1,77)=7,5587$, $p=0,00744$], mas sem efeitos significativos para os fatores linhagem [$F(1,77)=0,90499$, $p=0,34442$], sexo [$F(1,77)=1,7087$, $p=0,19504$], a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,77)=2,4636$, $p=0,12061$], estresse e sexo [$F(1,77)=0,18733$, $p=0,66636$], linhagem e sexo [$F(1,77)=1,5578$, $p=0,21576$] e a interação de todos os fatores [$F(1,77)=2,5220$, $p=0,11637$]. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* indicou que as fêmeas LDLr^{-/-} salina apresentaram um interesse maior no alvo social do que as fêmeas LDLr^{-/-} dexa, demonstrando que o estresse foi capaz de diminuir o perfil menos ansioso em relação à ansiedade social das fêmeas LDLr^{-/-} ($p<0,05$).

Quanto à distância total percorrida com o alvo ausente (Figura 28 B), a ANOVA de três vias apresentou diferenças estatísticas nos fatores linhagem [$F(1,77)=20,298$, $p=0,00002$] e a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,77)=17,886$, $p=0,00006$], mas sem efeito para os fatores estresse [$F(1,77)=,00019$, $p=0,98901$], sexo [$F(1,77)=3,7126$, $p=0,05769$], a interação dos fatores estresse e sexo [$F(1,77)=,32855$, $p=0,56818$], linhagem e sexo [$F(1,77)=0,44732$, $p=0,50561$] e a interação de todos os fatores [$F(1,77)=2,6104$, $p=0,11025$]. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* ($p<0,05$) indicou que os machos WT dexa percorreram maior distância do que os salina, mas que também os LDLr^{-/-} macho salina percorreram maior distância do que seu grupo controle. Ainda, as fêmeas LDLr^{-/-} salina percorreram maior distância do que seu grupo controle. Quanto à distância total percorrida durante a fase com o animal alvo presente, a ANOVA de três vias apresentou diferença estatística para o fator linhagem [$F(1,77)=11,431$, $p=0,00114$], mas sem efeito para os demais fatores: estresse [$F(1,77)=3,8700$, $p=0,05276$], sexo [$F(1,77)=0,51476$, $p=0,47526$], interação de estresse e linhagem [$F(1,77)=1,1413$, $p=0,28871$], estresse e sexo [$F(1,77)=0,57095$, $p=0,45219$], linhagem e sexo [$F(1,77)=0,99627$, $p=0,32134$] e a interação de todos os fatores [$F(1,77)=3,1089$, $p=0,08183$]. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* indicou ausência de diferenças estatísticas significantes, indicando que o estímulo social foi capaz de atenuar a hiperlocomoção apresentada pelos camundongos LDLr^{-/-} (Figura 28 C).

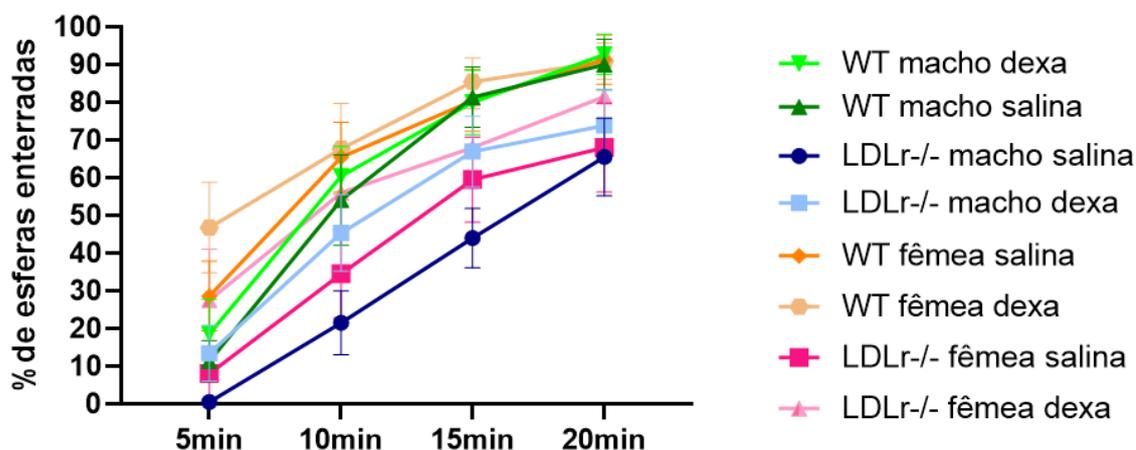
Figura 28: Efeitos do estresse crônico com dexta sobre a sociabilidade em camundongos machos e fêmeas WT e LDLr-/- avaliada no campo aberto.



Legenda: A) Razão de interação social (tempo de interação com o animal alvo presente/ tempo de interação com o animal alvo ausente). B) Distância total percorrida sem o animal alvo presente (m). C) Distância total percorrida com o animal alvo presente (m). Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=10-13). Análises estatísticas foram realizadas com Teste ANOVA de três vias, seguidas pelo de *Newman-Keuls*. * $p < 0,05$ em relação a linhagem, # $< 0,05$ em relação ao estresse. Fonte: Da autora (2023).

No dia 20 do protocolo experimental foi realizado o teste de esconder esferas, o qual não apresentou diferenças significativas em nenhum dos tempos analisados (Figura 29). *Kruskal-Wallis* em 5 min [H (7, N= 87) =21,62039 $p=0,0030$], 10 min [H (7, N=87) =14,54729 $p=0,0423$]. 15 min [H (7, N= 87) =15,61898 $p=0,0288$] e 20 min [H (7, N=87) =15,08359 $p=0,0349$].

Figura 29: Efeitos do estresse crônico com dexta sobre as respostas de ansiedade em camundongos machos e fêmeas WT e LDLr^{-/-} avaliadas no teste de esconder esferas.



Legenda: % de esferas enterradas nos tempos 5, 10, 15 e 20 min. Os dados representam a média \pm EPM (n=10-13). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Teste de *Kruskal-Wallis*. Fonte: Da autora (2023).

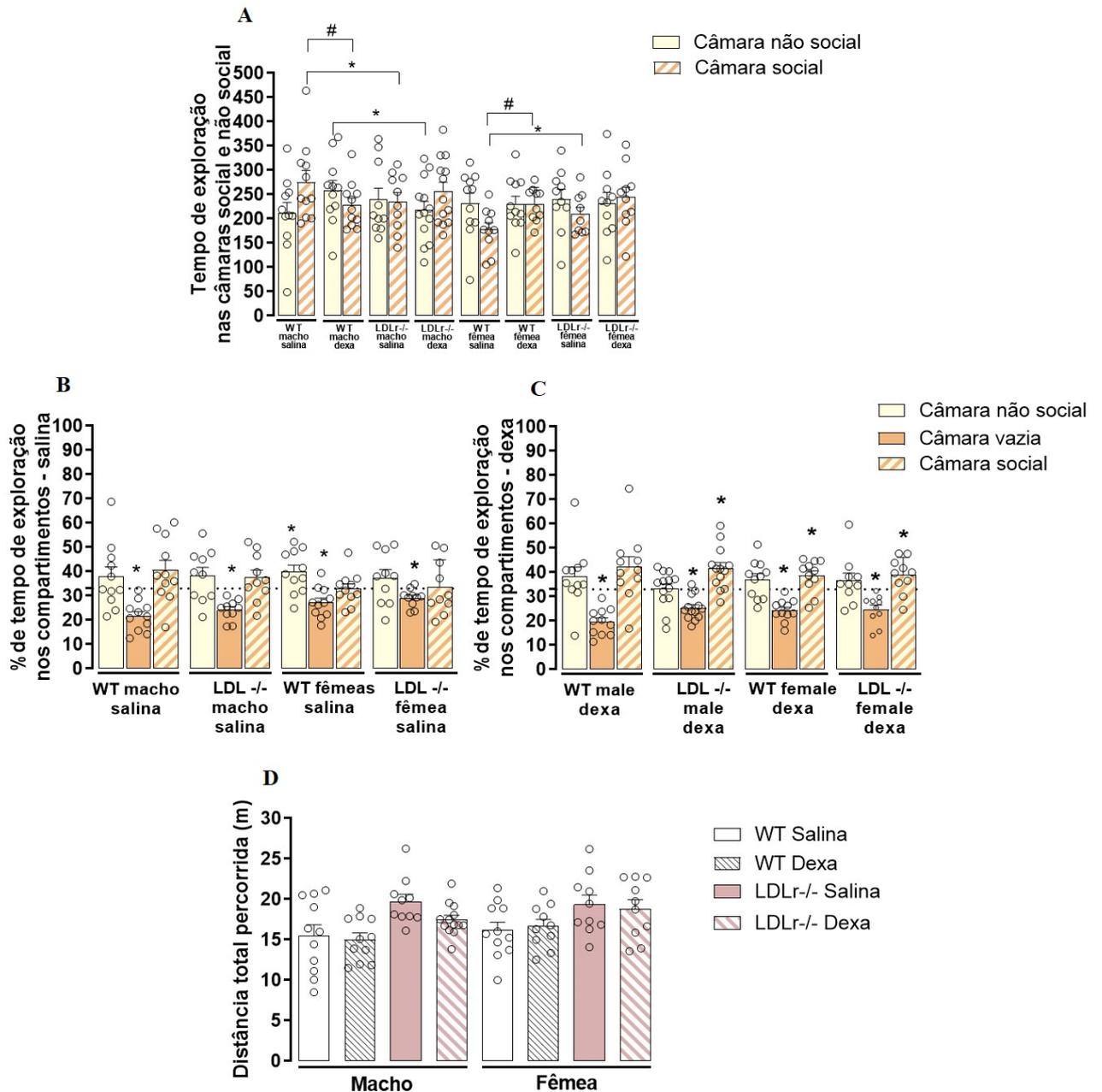
Levando em consideração que, no teste das três câmaras, o parâmetro mais importante é o tempo gasto nas câmaras com um alvo social e com um objeto inanimado, utilizou-se da ANOVA de três vias com medidas repetidas para analisar o tempo de entradas nas duas câmaras durante o teste. A análise estatística indicou efeito significativo para o fator sexo [$F(1,79)=7,92$, $p=0,006162$] e para a interação dos fatores linhagem e sexo [$F(1,79)=5,91$, $p=0,017336$], mas sem efeito para os demais fatores. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* demonstrou que as fêmeas LDLr^{-/-} salina ficaram mais tempo na câmara social do que seu grupo controle (WT fêmea salina), porém a WT fêmea dexta também ficou mais tempo na câmara social do que a WT fêmea salina. Os camundongos LDLr^{-/-} machos dexta ficaram menos tempo na câmara com o objeto do que os WT macho dexta, assim como os LDL macho salina ficaram menos tempo na câmara social do que os WT macho salina. Esse último ficou mais tempo na câmara social do que os WT macho dexta, indicando uma possível diminuição da sociabilidade em WT machos quando estressados. Porém não houve diferenças entre os tempos de exploração na câmara social e câmara não social dentro do próprio grupo (Figura 30 A).

No entanto, quando mudamos a forma de analisar os dados, usando o teste T em relação ao valor teórico de 33% (Figura 30 B e C), devido o aparato conter 3 câmaras, observamos que os animais WT fêmea dexta [$t=2,791$, $p=0,0191$], LDLr^{-/-} macho dexta [$t=3,496$, $p=0,0044$], e LDLr^{-/-} fêmea dexta [$t=2,473$, $p=0,0354$] ficaram mais de 33% na câmara social, porém as WT fêmea salina [$t=2,627$, $p=0,0253$] ficaram mais de 33% na câmara não social. Todos os grupos ficaram menos de 33% na câmara vazia, WT macho salina [$t=6,162$, $p=0,0001$], WT macho

dexa [t=8,131, p=0,0001], LDLr^{-/-} macho salina [t=6,551, p=0,0001], LDLr^{-/-} macho dexa [t=5,538, p=0,0001], WT fêmea salina [t=3,110, p=0,0111], WT fêmea dexa [t=6,495, p<0,0001], LDLr^{-/-} fêmea salina [t=3,328, p=0,00889], LDLr^{-/-} fêmea dexa [t=4,420, p=0,0017]. Estes resultados indicam uma maior sociabilidade nos animais LDLr^{-/-} dexa, a depender da análise estatística usada.

Quanto à distância total percorrida, a ANOVA de três vias indicou um efeito significativo para o fator linhagem [F(1,78)=18,234, p=0,00005], mas sem efeitos para os fatores estresse [F(1,78)=0,94864, p=0,33308], sexo [F(1,78)=1,3496, p=0,24889], a interação dos fatores estresse e linhagem [F(1,78)=1,0450, p=0,30981], estresse e sexo [F(1,78)=0,88966, p=0,34848], linhagem e sexo [F(1,78)=0,21606, p=0,64336] e nem a interação de todos os fatores [(1,78)=0,06926, p=0,79310]. O teste *post-hoc* de *Newman Keuls* não demonstrou diferenças significativas (Figura 30 D).

Figura 30: Efeitos do estresse crônico com dexta sobre as respostas de sociabilidade em camundongos machos e fêmeas WT e LDLr-/- avaliada no teste das três câmaras.

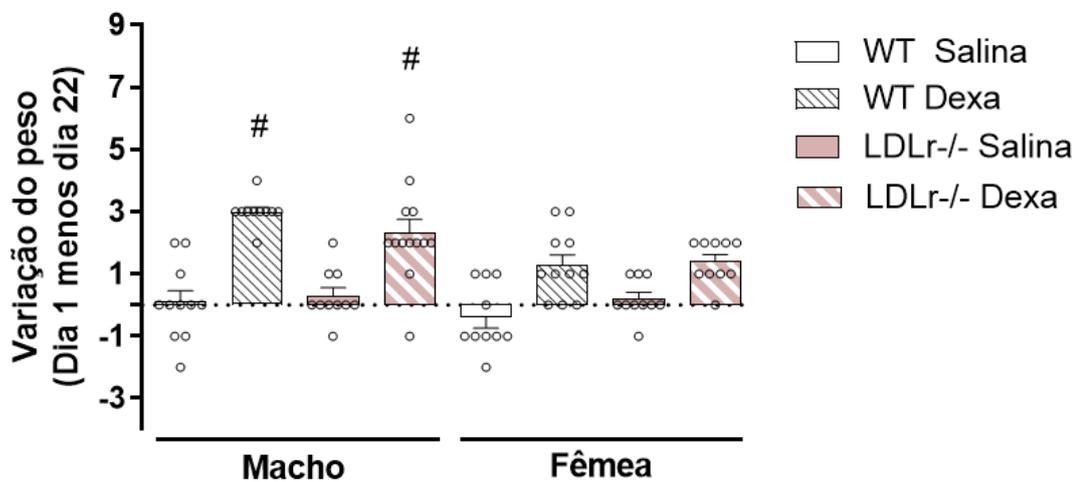


Legenda: A) Tempo de exploração nas câmaras social e não social. B) % de tempo de exploração nos compartimentos, animais salina – relação ao valor teórico de 33%. C) % de tempo de exploração nos compartimentos, animais dexta – relação ao valor teórico de 33%. D) Distância total percorrida (m). Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=10-13). Análises estatísticas foram realizadas com ANOVA de três vias, seguidas pelo teste post-hoc de *Newman-Keuls* (A e D - *p<0,05 em relação a linhagem, #<0,05 em relação ao estresse) e teste T em relação a 33% (B e C - *p<0,05 em relação a 33%). Fonte: Da autora (2023).

5.2.2 Variação de peso durante o protocolo de estresse crônico por administração de Dexametasona

A variância do peso (dia 1 menos dia 22) está representado pela Figura 31. O teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* apresentou diferenças significativas [$H(7, N=85) = 48,61664$ $p = 0,0000$], demonstrando que os animais WT e LDLr-/- machos dexta tiveram um aumento de peso quando comparado ao seu devido grupo salina (Figura 31).

Figura 31: Variação do peso dos animais WT e LDLr-/- machos e fêmeas submetidos ao protocolo de estresse crônico.



Legenda: A) Variação do peso dos animais, diferença do dia 1 – dia 22. Os dados representam a média \pm EPM ($n=10-13$). Análises estatísticas foram realizadas com o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. # $<0,05$ em relação ao estresse (A). Fonte: Da autora (2023).

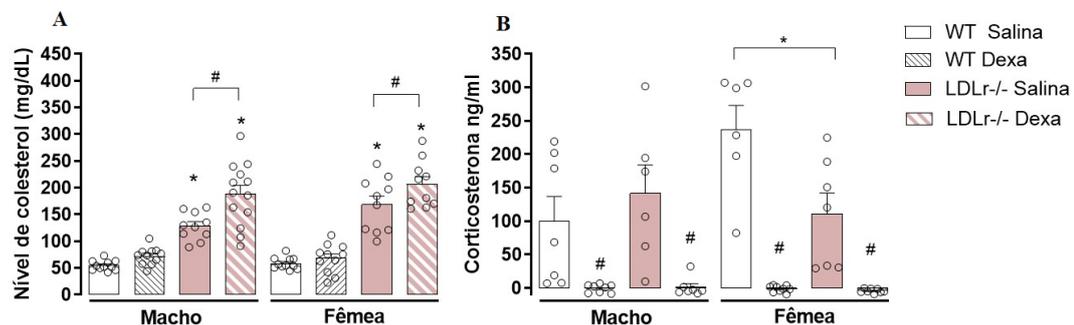
5.2.3 Quantificação do colesterol e corticosterona séricos dos animais submetidos ao estresse crônico

Os níveis séricos de colesterol total dos animais que passaram pelo protocolo de estresse crônico com dexta estão ilustrados na Figura 32 A. A ANOVA de três vias indicou um efeito significativo para o fator estresse [$F(1,79)=16,7342$, $p=0,000103$], linhagem [$F(1,79)=203,8897$, $p=0,00000$] e para a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,79)=5,3217$, $p=0,023682$], mas sem efeitos para o fator sexo [$F(1,79)=3,5954$, $p=0,061597$], interação dos fatores estresse e sexo [$F(1,79)=0,9349$, $p=0,0,336551$], linhagem e sexo [$F(1, 79)=3,7614$, $p=0,056017$], e interação de todos os fatores [$F(1, 79)=0,1757$, $p=0,676255$]. Conforme esperado, o teste *post-hoc* de *Newman Keuls* indicou que os níveis plasmáticos de colesterol total são superiores nos animais LDLr-/- de ambos os sexos em

relação aos grupos WT, além disso, os animais LDLr^{-/-} tratados com dexametasona apresentaram níveis mais altos de colesterol do que os animais LDLr^{-/-} controle, de ambos os sexos (Figura 32 A).

Os níveis de corticosterona sérica estão representados na Figura 32 B. A ANOVA de três vias indicou um efeito significativo para o fator estresse [$F(1,50)=82,666$, $p=0,00000$], interação dos fatores linhagem e sexo [$F(1,50)=6,8771$, $p=0,01154$] e para a interação de todos os fatores [$F(1,50)=6,1261$, $p=0,01675$], mas sem efeitos para o fator linhagem [$F(1,50)=1,7126$, $p=0,19663$], sexo [$F(1,50)=2,3395$, $p=0,13244$] e para a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,50)=1,6167$, $p=0,20944$], e estresse e sexo [$F(1,50)=2,9484$, $p=0,09215$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que todos os grupos tratados com dexametasona apresentaram níveis reduzidos de corticosterona em comparação aos seus respectivos grupos controle. Além disso, as fêmeas WT salina apresentam níveis maiores de corticosterona do que as LDLr^{-/-} fêmeas.

Figura 32: Níveis séricos de colesterol e corticosterona dos animais submetidos ao protocolo de estresse crônico.



Legenda: A) Níveis de colesterol séricos (mg/dL). B) Níveis de corticosterona sérica (ng/mL). Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM ($n=7-10$). Análises estatísticas foram realizadas com ANOVA de três vias seguidas pelo teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. * $p<0,05$ em relação a linhagem, # $<0,05$ em relação ao estresse. Fonte: Da autora (2023).

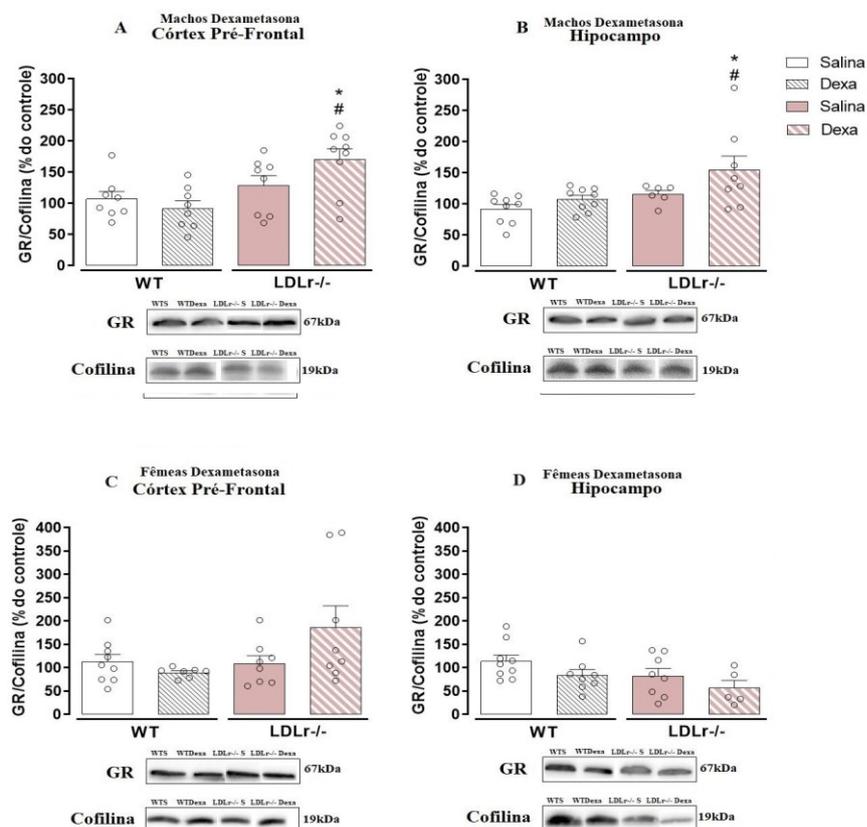
5.2.4 Avaliação de parâmetros neuroquímicos das amostras encefálicas de córtex pré-frontal e hipocampo de machos e fêmeas LDLr^{-/-} e WT submetidas ao estresse crônico

Foram analisadas as alterações no imunoconteúdo proteico dos receptores GR no córtex pré-frontal e no hipocampo dos machos WT e LDLr^{-/-} submetidos ao estresse crônico (Figura 33 A e B). Em relação ao imunoconteúdo de GR no córtex pré-frontal dos machos, a ANOVA de duas vias apresentou efeitos significativos para o fator linhagem [$F(1, 29)=11,751$, $p=0,00184$], mas sem efeitos para os fatores estresse [$F(1, 29)=0,90583$, $p=,34909$], e para a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1, 29)=3,8210$, $p=,06031$]. O teste *post-hoc* de

Newman-Keuls indicou que o grupo LDLr^{-/-} dexta apresentou um conteúdo proteico GR no córtex pré-frontal maior do que todos os outros grupos (Figura 33 A). O mesmo perfil foi observado no hipocampo dos machos, onde a ANOVA de duas vias indicou efeito significativo para o fator linhagem [F(1, 28)=7,1976, p=,01211], e estresse [F(1, 28)=4,3010, p=,04740], mas sem efeito para a interação dos fatores estresse e linhagem [F(1, 28)=,76044, p=,39061], o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que o grupo LDLr^{-/-} dexta apresentou um conteúdo proteico GR no hipocampo maior do que todos os outros grupos (Figura 33 B).

Foram analisadas as alterações no imunocntéudo proteico dos receptores GR no córtex pré-frontal e no hipocampo das fêmeas WT e LDLr^{-/-} submetidas ao estresse crônico (Figura 33 C e D). Em relação ao imunocntéudo de GR no córtex pré-frontal das fêmeas, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos para o fator estresse [F(1,27)=0,98188, p=0,33053], linhagem [F(1,27)=2,9907, p=0,09516], nem para a interação dos fatores estresse e linhagem [F(1,27)=3,5009, p=0,07221] (Figura 33 C). No hipocampo, a ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo para o fator linhagem [F(1,26)=3,9600, p=0,05721], estresse [F(1,26)=3,6526, p=0,06707] ou para a interação dos fatores estresse e genótipo [F(1,26)=0,01434, p=0,90560] (Figura 33 D).

Figura 33: Análise do imunocntéudo proteico de GR no córtex pré-frontal e hipocampo de animais WT e LDLr^{-/-} submetidos ao protocolo crônico com dexametasona.

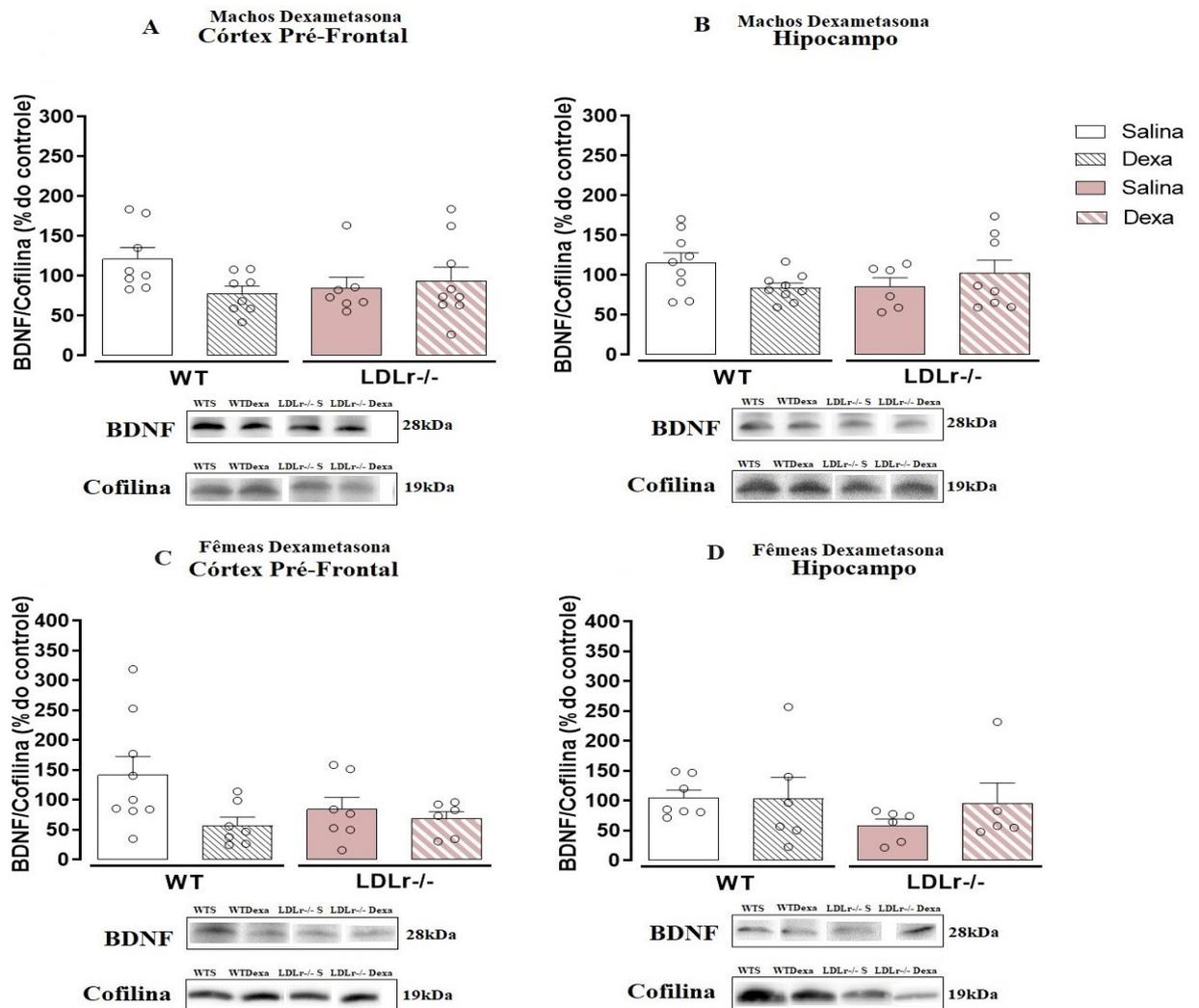


Legenda: A) Representação dos níveis proteicos de GR no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) dos machos submetidos ao estresse crônico através da administração de dexametasona (21 dias, 4 mg/kg i.p). Representação dos níveis proteicos de GR no córtex pré-frontal (C) e hipocampo (D) em fêmeas submetidas ao estresse crônico por administração de dexametasona (21 dias, 4 mg/kg i.p). Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=5-9). Análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA de duas vias seguidas pelo teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*, * $p < 0,05$. Fonte: Da autora (2023).

O imunoconteúdo proteico de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo dos machos salina e dexta estão apresentados na Figura 34 A e B. Quanto ao BDNF no córtex pré-frontal dos machos, o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* não indicou diferenças estatísticas significativas [H (3, N= 32) =5,860998 $p = 0,1186$] (Figura 34 A). No hipocampo dos machos, a ANOVA de duas vias apresentou efeitos significativos para a interação dos fatores estresse e linhagem [F(1, 27)=5,0571, $p = 0,03289$], mas sem efeitos para o fator linhagem [F(1, 27)=,55173, $p = 0,46402$], e estresse [F(1, 27)=,76017, $p = 0,39096$]. Porém o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* não indicou efeitos significativos (Figura 34 B).

O imunoconteúdo proteico de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo das fêmeas salina e dexta estão apresentados na Figura 34 C e D. Quanto ao BDNF no córtex pré-frontal das fêmeas, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator estresse [F(1,25)=4,5750, $p = 0,04240$], mas sem efeitos significativos para o fator linhagem [F(1,25)=1,0164, $p = 0,32303$], nem para a interação dos fatores [F(1,25)=2,1167, $p = 0,15814$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou ausência de diferenças significativas entre os grupos (Figura 34 C). O mesmo perfil foi observado no hipocampo das fêmeas, onde a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos para o fator linhagem [F(1,20)=1,2907, $p = 0,26934$], estresse [F(1,20)=0,51907, $p = 0,47958$], nem a interação dos fatores [F(1,20)=0,59456, $p = 0,44968$] (Figura 34 D).

Figura 34: Análise do imunocônteúdo proteico da neurotrofina BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais WT e LDLr^{-/-} submetidos ao protocolo de estresse crônico com a administração de dexametasona.



Legenda: Representação dos níveis proteicos de BDNF no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) dos camundongos machos submetidos ao estresse crônico por administração de dexametasona (21 dias, 4 mg/kg i.p). Representação dos níveis proteicos de BDNF no córtex pré-frontal (C) e hipocampo (D) das fêmeas submetidas ao estresse crônico por administração de dexametasona (21 dias, 4 mg/kg i.p). Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=6-9). Análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA de duas vias seguidas pelo teste post-hoc de *Newman-Keuls* (B, C e D) e o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* (A).

Foram analisados o imunocônteúdo do receptor TrkB totalmente fosforilado (145 kDa) e truncado (95 kDa) nos machos salina e dexa (Figura 35 A-D). Quanto ao imunocônteúdo de TrkB 95kDa córtex pré-frontal dos machos, a ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo para os fatores estresse [$F(1,28)=0,08293$, $p=0,77548$], linhagem [$F(1,28)=0,61974$, $p=0,43776$], nem para a interação dos fatores [$F(1, 28)=3,5231$, $p=,07098$] (Figura 35 A). Quanto ao imunocônteúdo de TrkB 95kDa truncado no hipocampo dos machos, a ANOVA de duas vias indicou efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,29)=7,1870$,

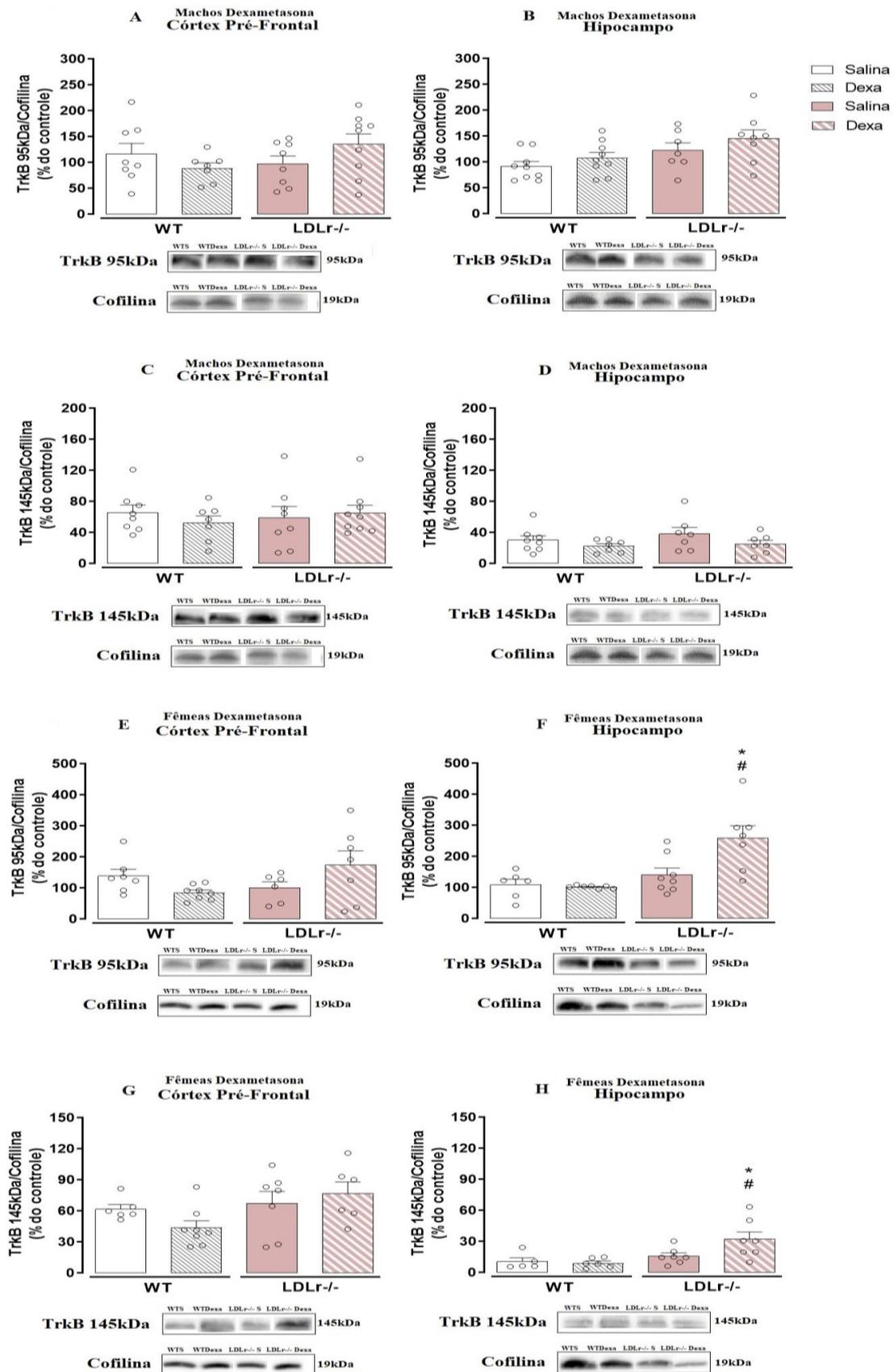
$p=0,01199$], mas sem efeitos para os fatores estresse [$F(1,29)=2,3117$, $p=0,13924$] e na interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,29)=0,06853$, $p=0,79534$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* não indicou efeitos significativos (Figura 35 B).

Quanto ao receptor TrkB 145kDa no córtex pré-frontal dos machos, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos para nenhum dos fatores, linhagem [$F(1,23)=0,42530$, $p=0,52077$], estresse [$F(1,23)=1,1038$, $p=0,30436$], e interação dos fatores [$F(1,23)=,00205$, $p=0,96425$] (Figura 35 C). Quanto ao receptor TrkB 145kDa no hipocampo dos machos, a ANOVA de duas vias também não indicou efeitos significativos para nenhum dos fatores, linhagem [$F(1,25)=0,86758$, $p=0,36053$], estresse [$F(1,25)=3,1829$, $p=0,08655$], e interação dos fatores [$F(1,25)=,20461$, $p=0,65493$] (Figura 35 D).

Foram analisados o imunocontéudo do receptor TrkB totalmente fosforilado (145 kda) e truncado (95kDa) nas fêmeas salina e dexa (Figura 35 E-H). Quanto ao imunocontéudo de TrkB 95kDa córtex pré-frontal das fêmeas, a ANOVA de duas vias indicou efeito significativo para a interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,24)=5,6042$, $p=0,02632$], mas ausência de efeitos significantes para os fatores estresse [$F(1,24)=0,13225$, $p=0,71929$] e linhagem [$F(1,24)=,92857$, $p=0,34484$] separadamente. O teste *post-hoc* de *Newman*-indicou ausência de diferenças significantes entre os grupos (Figura 35 E). Quanto ao imunocontéudo de TrkB 95kDa truncado no hipocampo das fêmeas, a ANOVA de duas vias indicou efeito significativo para todos os fatores: linhagem [$F(1,24)=14,563$, $p=0,00084$], estresse [$F(1,24)=4,9791$, $p=0,03526$] e na interação dos fatores estresse e linhagem [$F(1,24)=6,3507$, $p=0,01879$]. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que o grupo LDLr^{-/-} dexa apresentou um aumento no conteúdo proteico de TrkB 95kDa no hipocampo em comparação a todos os outros grupos (Figura 35 F).

Quanto ao receptor TrkB 145kDa no córtex pré-frontal das fêmeas, o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* não indicou diferenças entre os grupos [$H(3, N= 27) =7,187831$, $p=0,0661$] (Figura 35 G). Quanto ao receptor TrkB 145kDa no hipocampo das fêmeas, a ANOVA de duas vias indicou efeitos significativos para o fator linhagem [$F(1,21)=8,9914$, $p=0,00684$], mas nem efeitos para os fatores estresse [$F(1,21)=2,4875$, $p=0,12970$], e interação dos fatores [$F(1,21)=3,5053$, $p=0,07516$] (Figura 35 H). O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou que o grupo LDLr^{-/-} dexa apresenta um maior conteúdo proteico de TrkB 145kDa no hipocampo em comparação a todos os outros grupos.

Figura 35: Análise do imunoconteúdo proteico do receptor TrkB 145kDa e 95kDa no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais WT e LDLr^{-/-} submetidos ao protocolo de estresse crônico com a administração de dexametasona.



Legenda: A) Representação dos níveis proteicos de TrkB 95kDa no córtex pré-frontal dos machos que passaram pelo protocolo de estresse crônico. B) Representação dos níveis proteicos de TrkB 95kDa no hipocampo frontal dos machos que passaram pelo protocolo de estresse crônico. C) Representação dos níveis proteicos de TrkB 145kDa no córtex pré-frontal dos machos que passaram pelo de estresse crônico. D) Representação dos níveis proteicos de TrkB 145kDa no hipocampo frontal dos machos que passaram pelo protocolo de estresse crônico (21 dias, 4 mg/kg i.p). E) Representação dos níveis proteicos de TrkB 95kDa no córtex pré-frontal das fêmeas submetidas ao protocolo de estresse crônico com dexta. F) Representação dos níveis proteicos de TrkB 95 kDa no hipocampo frontal das fêmeas que passaram pelo protocolo de estresse crônico. G) Representação dos níveis proteicos de TrkB 145kDa no córtex pré-frontal das fêmeas que passaram pelo protocolo de estresse crônico. H) Representação dos níveis proteicos de TrkB 145kDa no hipocampo das fêmeas que passaram pelo protocolo de estresse crônico (21 dias, 4 mg/kg i.p). Os dados representam os valores individuais, média \pm EPM (n=6-9). Análises estatísticas foram realizadas com ANOVA de três vias seguidas pelo teste post-hoc de *Newman-Keuls* (A, B, D, E, F, G e H) ou teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* (C). * $p < 0,05$ em relação a linhagem, # $< 0,05$ em relação ao estresse. Fonte: Da autora (2023).

6 DISCUSSÃO

Protocolos de estresse são comumente empregados em modelos animais para investigar os efeitos do estresse sobre o comportamento, particularmente o comportamento do tipo ansioso. Esses protocolos podem variar em sua duração, intensidade e tipo de estressor, e visam mimetizar os tipos de estressores vivenciados pelo ser humano em diversas situações. Adamec *et al.* (2006) examinaram os efeitos do estresse agudo de contenção no comportamento semelhante à ansiedade em ratos, os resultados demonstraram que os ratos expostos ao estresse agudo de contenção apresentaram aumento do comportamento do tipo ansiedade no teste de campo aberto e caixa claro-escuro. Machos Swiss após estresse de contenção de 4 h (DOMINGUES *et al.*, 2019) e 6h (SULAKHIYA *et al.*, 2016) tiveram uma redução no tempo e no número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (SULAKHIYA *et al.*, 2016, DOMINGUES *et al.*, 2019) e uma redução na quantidade de esferas enterradas no teste das esferas (DOMINGUES *et al.*, 2019). Animais C57BL/6 submetidos ao estresse agudo de contenção de 30 min (SOLOMONOW, TASKER, 2015) e 1 h (MARIANNO *et al.*, 2017) exibem um comportamento mais ansiogênico após o estresse agudo de contenção quando comparado aos controles.

Portanto, para responder se o dimorfismo sexual afeta a sensibilidade aos diferentes tipos de estresse nos animais LDLr^{-/-}, em relação ao comportamento tipo-ansioso e social, os animais do presente estudo foram submetidos ao estresse de contenção agudo e ao estresse crônico pela administração de dexametasona. No presente estudo, um comportamento tipo-ansioso diminuído foi evidenciado nos animais LDLr^{-/-}, no estresse agudo de contenção no teste do labirinto em cruz elevado. O estresse agudo não foi capaz de aumentar o comportamento tipo-ansioso dos animais LDLr^{-/-}, mas também não aumentou dos animais controle.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa já descreveram o aumento da locomoção dos animais LDLr^{-/-}, em especial das fêmeas (PINHO, 2021, OLESCOWICZ, 2021, SZCZEPANIK *et al.*, 2016). Elder *et al.* (2008) demonstraram que machos LDLr^{-/-}, tanto alimentados com dieta padrão quanto alimentados com dieta rica em colesterol, percorreram maior distância e passaram mais tempo em movimento do que os grupos controle. Juntamente com os resultados de Oliveira *et al.* (2020), Elder *et al.* (2008) demonstraram um aumento ainda maior na locomoção de animais alimentados com dieta rica em colesterol, indicando que o aumento do colesterol pode ser o ponto chave na questão da hiperlocomoção. Vale ressaltar que Olescowicz (2021) demonstrou um aumento do metabólito do colesterol 27-OH somente em

fêmeas LDLr^{-/-}, podendo representar uma das explicações para as alterações em fêmeas serem mais pronunciadas. No presente estudo, buscamos investigar se diferentes protocolos de estresse são capazes de alterar a hiperlocomoção de animais LDLr^{-/-}. Para isso, foi utilizado parâmetros de locomoção em testes como campo aberto, sociabilidade no campo aberto e três câmaras. Foram observados resultados significativos apenas no campo aberto nos animais submetidos aos protocolos agudo e crônico de estresse, e no teste da sociabilidade no campo aberto nos animais submetidos ao protocolo crônico de estresse.

Portanto, os resultados deste trabalho demonstraram que houve um aumento na locomoção dos animais LDLr^{-/-} de ambos os sexos, quando comparados aos seus grupos controle, e o estresse agudo de contenção foi capaz de diminuir esse comportamento locomotor elevado no teste do campo aberto. O mesmo perfil de aumento do comportamento locomotor no campo aberto foi visto nos animais LDLr^{-/-} que passaram pelo estresse crônico com dexta, tanto os animais salina quanto os dexta de ambos os sexos apresentaram comportamento locomotor elevado, o estresse com dexta foi capaz de diminuir esse comportamento somente nas fêmeas LDLr^{-/-}.

O protocolo de estresse agudo de contenção utilizado foi adaptado de MORETTI *et al.* (2013) e BUDNI *et al.* (2013), em que não foram observadas alterações motoras em camundongos Swiss no teste do campo aberto após 7h de contenção. Outros protocolos com um menor tempo de contenção, por exemplo com 4h de contenção, também não observaram alterações na atividade locomotora de animais (PAYAMSHAD *et al.*, 2023). Demonstrando aqui que o grupo controle do presente estudo estava em consonância com trabalhos prévios da literatura. Todavia, apesar dos Kumari *et al.* (2007) demonstrarem que o estresse agudo diminui o comportamento locomotor de camundongos após 6h de contenção, vale ressaltar que os estudos acima foram todos realizados com camundongos Swiss. Apesar do estresse agudo ter diminuído o comportamento de hiperlocomoção basal em ambos os sexos de animais LDLr^{-/-} no teste do campo aberto, uma pesquisa anterior mostrou uma diminuição do comportamento voluntário de correr em roda somente em camundongos ICR fêmeas submetidas ao estresse de contenção (YAMAURA *et al.*, 2013).

Estudos mais antigos demonstram que apesar do estresse agudo de contenção causar respostas fisiológicas semelhantes ao estresse emocional em humanos, a diferença de linhagem usada nos protocolos pode interferir nos resultados obtidos (FLINT *et al.*, 2001). Camundongos C57BL/6 parecem ser mais resistentes ao estresse, com concentrações mais baixas de ACTH em resposta a estressores agudos (ANISMAN *et al.*, 1998, SHANKS *et al.*, 1990). Por outro lado, até o momento não existia nenhum estudo com a linhagem de animais LDLr^{-/-},

demonstrando, possivelmente, que apesar dos animais C57BL/6 serem mais resistentes a mudanças do parâmetro locomotor, os animais LDLr^{-/-}, os quais apresentam alterações na locomoção basal, parecem ser sensíveis a estressores agudos, sendo esse capaz de alterar o perfil de hiperlocomoção.

Em relação ao protocolo de estresse crônico com dexametasona, somente as fêmeas LDLr^{-/-} tiveram seu comportamento locomotor hiperativo atenuado pelo efeito do estresse no campo aberto. Podemos levar em consideração os parâmetros antes mencionados sobre as diferenças sexuais já observadas em animais LDLr^{-/-}. No teste da sociabilidade no campo aberto foi visto um aumento da locomoção dos animais LDLr^{-/-} salina somente na fase sem o alvo presente, demonstrando que o interesse no alvo social é capaz de diminuir a hiperlocomoção dos LDLr^{-/-}, porém devemos levar em consideração que o tempo analisado aqui é de 150 segundos e não 300 segundos, como habitualmente no campo aberto normal.

Artigos da literatura demonstram que camundongos machos (JANG *et al.*, 2019; JEONG *et al.*, 2019), fêmeas (STREKALOVA *et al.*, 2015) e ratos (ALREFAIE, 2015) submetidos a uma dieta rica em gordura apresentaram níveis elevados de colesterol e um comportamento do tipo-ansioso exacerbado. Por outro lado, Machado (2016) evidenciou que a dieta rica em gordura faz com que as fêmeas C57BL/6 tenham uma diminuição do comportamento do tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado, mostrando que há controversas na literatura. Além disso, existem poucas pesquisas com animais LDLr^{-/-} que busquem elucidar respostas ao dimorfismo sexual em relação aos comportamentos de emocionalidade nessa linhagem. Resultados prévios também demonstraram um comportamento do tipo-ansioso diminuído nas fêmeas LDLr^{-/-} visto pelo aumento do tempo de permanência nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (SZCZEPANIK, 2015; MACHADO, 2016).

Resultados anteriores da autora demonstram que principalmente fêmeas LDLr^{-/-} apresentam uma redução do comportamento tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado. Contudo, machos e fêmeas LDLr^{-/-} apresentaram um comportamento de enterrar esferas diminuído, fenótipo que se relaciona à diminuição do comportamento tipo-ansioso (PINHO, 2021). No presente estudo, além de apresentarem uma ansiedade social diminuída representada pelo maior tempo explorando o animal alvo no teste da sociabilidade no campo aberto, também observamos uma diferença sexual no teste das três câmaras, onde só os machos LDLr^{-/-} tiveram uma preferência social. Assim, o dimorfismo sexual parece ser um fator determinante de diferenças de sensibilidade aos testes de comportamento tipo-ansioso, diferi também em relação ao teste que o animal é exposto. Portanto, houve um interesse de investir no papel do

dimorfismo sexual na sensibilidade a diferentes protocolos de estresse e ansiedade nos animais LDLr-/-.

Vale ressaltar que outros fatores podem estar envolvidos quando pensamos em alterações neuroquímicas e comportamentais em animais com colesterol alto, incluindo os LDLr/- e a apoE. McLachlan e Yi Xing Soh (2005) demonstram que a depleção genética da apoE em camundongos C57Bl/6 gera uma redução do comportamento ansioso no labirinto em cruz elevado. Além do efeito do genótipo, sobre o comportamento tipo-ansioso, há indícios de uma resposta dependente do sexo, visto que as fêmeas WT passaram mais tempo nos braços abertos em comparação aos machos. Juntamente com estes achados, Raber (2007) também demonstraram efeitos ansiogênicos em animais com depleção genética da apoE, reforçando a ideia de um efeito do metabolismo lipídico no comportamento tipo-ansioso.

De maneira interessante, fazendo um paralelo com a HF em humanos, um estudo de meta-análise revelou que 4 estudos clínicos indicaram que pacientes com HF tinham sintomas ligeiramente mais baixos de ansiedade em relação aos controles da população em geral (AKIOYAMEN *et al.*, 2018). Um outro estudo com pacientes homocigóticos para HF na Turquia, revelou que somente 10% tinham risco aumentado de transtorno de ansiedade e crianças tinham uma propensão ainda menor de desenvolver transtornos de ansiedade (KAYIKCIOGLU *et al.*, 2019). Contudo, essa mesma população apresentava um risco 30,4% maior de desenvolver depressão (KAYIKCIOGLU *et al.*, 2019). No entanto, alguns estudos clínicos envolvendo a investigação da ansiedade em pacientes com HF demonstram que a ansiedade observada é na verdade em relação ao diagnóstico positivo da doença e não a algum tipo de transtorno de ansiedade (CIVEIRA *et al.*, 2004; JONGH *et al.*, 2007; MARTEAU *et al.*, 2004).

Camundongos BALB/6 parecem ser mais sensíveis ao protocolo de estresse agudo do que os camundongos C57BL/6 (O'MAHONY *et al.*, 2010). Deve ser considerado que camundongos C57BL/6 parecem ser mais resistentes ao estresse, com concentrações mais baixas de ACTH em resposta a estressores agudos (ANISMAN *et al.*, 1998, SHANKS *et al.*, 1990). Podemos não ter visto diferenças estatísticas no estresse agudo em C57BL/6 devido a uma possível resistência a esse protocolo em específico.

Quanto ao estresse crônico, existem relatos na literatura que demonstram que diferentes tipos de protocolos de estresse crônico promovem o comportamento tipo-ansioso (ZHAO *et al.*, 2019; LIPPMANN *et al.*, 2007; IÑIGUEZ *et al.*, 2018). Estudos investigaram os efeitos do estresse crônico com dexametasona no comportamento semelhante à ansiedade em ratos, observando que a exposição crônica à dexametasona ou corticosterona aumentou o

comportamento do tipo ansioso no labirinto em cruz elevado e nos testes de campo aberto em ratos (CAO *et al.*, 2017) e camundongos (CASTREN *et al.*, 2007, ARAKAWA *et al.*, 2018, SKUPIO *et al.*, 2015).

No presente trabalho, nos animais submetidos ao tratamento crônico com dexametasona, não observamos diferenças no comportamento tipo-ansioso nos animais WT. Skupio *et al.* (2015) demonstraram um aumento da ansiedade na caixa claro e escuro nos animais tratados com dexametasona. Além disso animais tratados com uma única dose alta de dexametasona (10mg/kg) apresentaram aumento do comportamento tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado (VAFAEI *et al.*, 2008), assim como ratos submetidos ao estresse crônico com dexametasona por 7 dias (PARK *et al.*, 2011). Apesar disso, os animais C57BL/6 não apresentaram diferenças no labirinto em cruz elevado no nosso estudo. Contudo, foi observado nos animais LDLr/- submetidos ao estresse crônico por administração de dexametasona um aumento na % de tempo nos braços abertos somente das fêmeas LDLr/- controle, sendo que aqui também o estresse não foi capaz de aumentar o comportamento tipo-ansioso.

Os dados da literatura demonstram que pacientes com TOC apresentam níveis elevados de colesterol (PETER *et al.*, 2002; PETER; TABRIZIAN; HAND, 2000), estudos clínicos demonstraram que níveis reduzidos de colesterol HDL estariam relacionados ao aumento e gravidade do transtorno de ansiedade relacionado ao TOC (DOUGLAS; NASRALLAH, 2019). O teste de enterrar esferas é usado como parâmetro de avaliação de comportamentos estereotipados (sendo relacionados à comportamentos compulsivos observados no TOC) (NJUNG'E; HANDLEY, 1991). Esse teste é comumente utilizado para triagem de agentes ansiolíticos, descrito primeiramente por Broekkamp *et al.* (1986), os quais relataram que bolinhas de gude não seriam objetos nocivos para os roedores, mas forneceriam estímulos não condicionados eficazes e suficientes para iniciar o comportamento de enterrar. Observamos que o resultado comportamental do teste de enterrar esferas não corrobora os resultados prévios da autora, com ausência de diferença significativa entre os grupos, nem ao mesmo nos animais tratados com salina. Levando a suposição de que o teste de enterrar esferas seja extremamente sensível a qualquer estressor, especulamos que a administração intraperitoneal durante 21 dias possa ter alterado a sensibilidade dos animais LDLr/- ao teste.

O comportamento de sociabilidade apresentou-se diminuído apenas nos machos LDLr/- do grupo controle e submetidos ao estresse de contenção. Contudo, também não foram observadas diferenças de sociabilidade induzidas pelo estresse nos animais WT. Oliveira *et al.* (2022), que usou ratos machos em estresse agudo por 15 min, observou uma diminuição da interação social no teste de interação social no campo aberto nos animais submetidos ao

estresse. Ainda, o estresse agudo de contenção por 3,5h em ratos *Wistar* machos (MANCHANDA *et al.* 2011) e por 90min em ratos *Sprague Dawley* de ambos os sexos (VARLINSKAYA; SPEAR, 2012) induziu uma diminuição da interação social. Porém, faltam estudos investigando a interação social em animais C57BL/6. Além disso, nenhum estudo anterior avaliou animais LDLr/- submetidos a estresse. O comportamento tipo ansioso relacionado à sociabilidade também foi analisado no protocolo de estresse crônico com dexametasona. Aqui observamos que as fêmeas LDLr/- tratadas com dexametasona tiveram uma redução do comportamento de interação social quando comparada ao seu grupo controle, demonstrando um efeito do estresse na ansiedade social somente nas fêmeas LDLr/-.

Para analisar os níveis de colesterol e corticosterona sérica após os protocolos de estresse, o sangue dos animais foi coletado no momento da eutanásia. Com relação aos níveis de colesterol, observamos um aumento de cerca de 3 vezes em todos os grupos de animais LDLr/-, como era o esperado pela literatura (MOREIRA *et al.*, 2012, DE OLIVEIRA, 2012, PINHO, 2021, OLESCOWICZ, 2021). Na literatura, foi demonstrado que em animais C57BL/6 o estresse de contenção de 120min (AHN *et al.*, 2016), e em animais *Swiss* com estresse de contenção por 2h (KULKARNI *et al.*, 2008), aumenta o colesterol circulante, porém quando o sangue é coletado logo após o estresse. No presente estudo, apesar das 7h de contenção, o estresse agudo não alterou os níveis de colesterol nos animais LDLr/-, possivelmente, pelo fato do sangue ter sido coletado 24 h após o estresse agudo.

O sangue foi coletado entre às 14h e 18h, em torno do horário de pico (16h30) do ritmo circadiano na função adrenocortical (ZIMMERMANN; CRITCHLOW, 1967). Porém, a ausência do LDLr e o aumento do colesterol nesses animais parece não ser determinante para a entrega de colesterol na esteroidogênese adrenal. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de corticosterona em nenhum dos grupos LDLr/- controle ou estressados. Esse resultado vai de encontro a resultados anteriores da autora com animais *naive* (PINHO, 2021). Contudo, no presente trabalho, o estresse agudo de contenção não foi capaz de aumentar os níveis de corticosterona, nem ao menos nos animais WT. Apesar de diversas outras pesquisas utilizando outras linhagens de camundongos demonstrarem um aumento dos níveis de corticosterona nos animais contidos (TULI *et al.*, 1995, CASARIL *et al.*, 2019, DOMINGUES *et al.*, 2019), a coleta do sangue foi sempre logo após o estresse de contenção. Por outro lado, devemos considerar que o sangue dos animais deste trabalho foi coletado 24h após o término do estresse agudo de contenção, Kuti *et al.* (2022) demonstrou que os níveis de corticosterona 90min após o estresse de contenção estavam extremamente mais elevados do que 24h após, quando já tinha voltado a níveis inferiores.

Nos animais submetidos ao protocolo crônico com dexta, os níveis de colesterol totais séricos além de estarem três vezes mais elevados nos animais LDLr^{-/-}, comparados aos controles, obtivemos diferenças entre os animais LDLr^{-/-} tratados com dexta, em que houve um aumento ainda maior nos níveis de colesterol quando comparado aos LDLr^{-/-} salina. Esse mesmo perfil de aumento do colesterol já foi descrito após o tratamento crônico com dexametasona em animais *Swiss* (DELANOGARE *et al.*, 2020) e C57BL/6 (SKUPIO *et al.*, 2014). Hormônios glicocorticóides endógenos, mas também os sintéticos como a dexta, podem regular os níveis de PEP-carboxicinas (enzima responsável por clivar o piruvato em glicerol-3-fosfato e iniciar a gliconeogênese), aumentando a expressão dessa enzima no fígado e tecido adiposo. A estimulação da gliconeogênese aumenta a síntese de triacilglicerol no fígado e a consequente liberação dele na corrente sanguínea, já no tecido adiposo os glicocorticóides diminuem a gliconeogênese, diminuindo a ação das PEP-carboxicinas, e a reciclagem de ácidos graxos, assim liberando-os livres no sangue (NELSON; COX, 2014). Ele via consequente influência no aumento dos níveis de colesterol circulantes.

Apesar do alto nível de colesterol apresentado nos grupos de animais LDLr^{-/-}, era esperado que a administração exógena de dexta inibisse a síntese endógena de corticosterona, o que foi confirmado pela diminuição exorbitante nos níveis de corticosterona de todos os grupos tratados com dexametasona. Um efeito de comprometimento do eixo HHA devido ao feedback negativo da administração de corticoide exógeno na via de produção endógena (ARIAS *et al.*, 2021). O artigo que foi utilizado para embasar o protocolo deste trabalho demonstra o mesmo perfil de corticosterona diminuída em camundongos C57BL/6 (SKUPIO *et al.*, 2014) após protocolo de estresse crônico com dexta. Apesar de dosagens diferentes, protocolos com ratos demonstrarem o mesmo perfil de comprometimento do eixo HHA (SIGWALT, *et al.*, 2011, SOMM *et al.*, 2012). O mecanismo acontece por causa da grande quantidade de glicocorticoide circulante pela ativação constante do eixo HHA devido ao estresse e à aplicação diária de mais glicocorticoide por via i.p.. Logo, o aumento de glicocorticoide também vai aumentar a resposta de feedback negativo no hipocampo e no hipotálamo, fazendo com que iniba a liberação de hormônios precursores da corticosterona (BEAR, CONNORS, PARADISO, 2017). Aqui é um importante ponto de suposição de que o colesterol aumentado nos animais LDLr^{-/-} realmente não é importante para a esteroidogênese adrenal.

Para responder às perguntas relacionadas ao perfil neuroplástico nos animais LDLr^{-/-} utilizamos o córtex pré-frontal e hipocampo para quantificar os níveis de proteínas associadas à via do BDNF e GR. Como controle endógeno foi utilizado a proteína Cofilina por ter um peso

molecular menor (19 kDa) e pelo fato da b-actina poder sofrer alterações devido a interações com componentes da matriz extracelular como o colesterol (FARMER *et al.*, 1983).

Apesar de ratos com altos níveis de colesterol induzido por dieta mostrarem um comportamento tipo-ansioso com níveis mais baixos de BDNF (XU *et al.*, 2014). No presente estudo foi evidenciado o perfil de diminuição do imunocontéudo de pró-BDNF (28kDa) nos animais LDLr^{-/-} machos e fêmeas naive. O anticorpo utilizado não foi capaz de revelar a isoforma do BDNF maduro, por conta disso, estudos mais aprofundados deverão ser realizados posteriormente, já que estudos prévios indicaram que a redução da forma maduro do BDNF está vinculada ao aumento da atividade locomotora em animais (HAYES *et al.*, 1997; ONO *et al.*, 1997; KERNIE *et al.*, 2000) logo, isso poderia estar vinculado ao comportamento apresentado pelos animais LDLr^{-/-}. Entretanto, podemos supor que a consequente diminuição de pró-BDNF vai acarretar diminuição de BDNF maduro quando comparado ao grupo controle, correlacionando-se então com a hiperlocomoção dos LDLr^{-/-}, porém ainda é uma via a ser estudada.

Apesar disso, a ligação entre diferentes níveis de BDNF e comportamentos associados à ansiedade ainda é controversa. Pesquisas clínicas com pacientes com uma variante mutante no gene do BDNF demonstrou um aumento no risco de transtorno de ansiedade generalizada, sendo que o alelo Met foi associado a um aumento nos níveis séricos de BDNF, que também está associado ao fator de risco (MOREIRA *et al.*, 2015). Em modelos animais, camundongos BDNF Met/Met também mostram um aumento no comportamento relacionado à ansiedade, sendo que tratamento com antidepressivos não são capazes de reverter esse comportamento indicando que o BDNF pode ser um alvo dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina. Esses resultados podem indicar que o efeito antidepressivo dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina na ansiedade é mediado pela sinalização do BDNF-TrkB (MARTINOWICH *et al.*, 2007). Talvez a sinalização, e não os níveis da neurotrofinas, estejam ligadas ao perfil ansiolítico, para isso, mais estudos devem ser feitos nos animais LDLr^{-/-}, principalmente com a quantificação do imunocontéudo de BDNF maduro.

Foram analisados neste trabalho os imunocontéudos do receptor TrkB totalmente fosforilado (145kDa) e truncado (95kDa). Ambos têm funções e ações distintas, o TrkB totalmente fosforilado (TrkB FL) tem um domínio de tirosina quinase intracelular que faz com que transmite os efeitos da ligação de BDNF rapidamente. Com *splicing* alternativo, o TrkB produz isoformas truncadas (TrkB T1 e T2 em roedores), os quais não possuem domínio tirosina quinase intracelular, logo, não irá produzir sinais intracelulares tão rapidamente. TrkB T1 pode apresentar um comportamento negativo, competindo com neurotrofinas e formando

heterodímeros com o TrkB, mas também pode sequestrar e translocar o BDNF induzindo o crescimento de neuritos e estimulando a sinalização intracelular, além de modificar a estrutura do citoesqueleto. O TrkB tem um papel maior no aumento da ramificação dendrítica proximal, enquanto sua forma truncada está mais envolvida no alongamento de dendritos distais. A ação do BDNF produz sinais rápidos em neurônios se ligando ao TrkB FL e através de canais de sódio dependentes de voltagem, já nos astrócitos, o BDNF se liga predominantemente no TrkB T1 (GUPTA *et al.*, 2013).

Foi observado a diminuição da isoforma de 145k Da no córtex pré-frontal e um aumento no hipocampo, tanto de machos como fêmeas LDLr^{-/-} *naive*. Podemos hipotetizar que esse aumento da forma totalmente fosforilada do TrkB pode ter relação com a diminuição de BDNF apresentada pelos mesmos animais, como uma maneira de tentar compensar a falta de BDNF, tentando suprir a pouca quantidade com mais receptores a fim de tentar captar mais BDNF para dentro dos neurônios.

Há relatos do envolvimento dos níveis alterados de TrkB em distúrbios neuropsiquiátricos. Os níveis de TrkB no soro de pacientes clinicamente deprimidos são relatados como maiores em comparação com os de indivíduos normais (HUNG *et al.*, 2010). Várias mutações no gene TrkB foram associadas à progressão de transtornos de ansiedade (ERNST *et al.*, 2011). Evidências mostram que drogas antidepressivas e ansiolíticas como fluoxetina, citalopram, amitriptilina, agem regulando positivamente a expressão de BDNF no encéfalo, levando a um aumento da sinalização de TrkB (GUPTA *et al.*, 2013). Estes demonstram o envolvimento dessa via também nos transtornos de ansiedade. Foi relatado ainda que camundongos transgênicos superexpressando TrkB apresentam ansiedade reduzida no labirinto em cruz elevado e nos testes de exploração claro-escuro (KOPONEN *et al.*, 2004).

Olescowicz (2021) demonstrou que os animais LDLr^{-/-} de ambos os sexos apresentam diminuição da potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo. Sabe-se que a sinalização de BDNF-TrkB é importante para a LTP no hipocampo, ainda, modelos animais de nocautes heterozigotos de BDNF e nocautes heterozigotos de TrkB mostram LTP diminuída no hipocampo, com reduções correspondentes no condicionamento de medo contextual (NEUMEISTER *et al.*, 2013). Comportamento que os animais LDLr^{-/-} também apresentam (OLESCOWICZ, 2021). Portanto, esse trabalho enfatiza a importância da via de BDNF/TrkB na neuroplasticidade dependente de hipocampo, mas ainda demonstra o possível envolvimento do receptor TrkB na diminuição de ansiedade.

Há evidências em relação a alterações nos níveis de BDNF de animais submetidos à estresse de contenção. Como Casaril *et al.* (2019), que demonstraram níveis de BDNF

diminuído no córtex e hipocampo de camundongos machos *Swiss* submetidos ao estresse de contenção por 4h. Já Yamaura *et al.* (2013) relataram uma diminuição significativa nos níveis de BDNF após estresse de contenção apenas em camundongos fêmeas. Porém, no presente estudo não observamos diferenças nos níveis de BDNF dos animais LDLr^{-/-} e WT após estresse de contenção.

Por outro lado, observamos diferenças no estresse crônico. No protocolo crônico com dexta usamos a dose de 4 mg/kg conforme Skupio *et al.* (2014), o mesmo autor menciona que doses mais amenas como de 0,1 – 1,5 mg/kg, não são suficientes para observar mudanças neuroquímicas. Apesar de Sigwalt *et al.* (2011) demonstrarem que o tratamento crônico por 21 dias com dexta é capaz de aumentar o conteúdo de pró-BDNF, sendo a clivagem prejudicada e os efeitos benéficos em cima da neuroplasticidade perdidos. Observamos que o estresse crônico com dexametasona diminuiu os níveis de pró-BDNF no córtex pré-frontal das fêmeas WT dexta. Apesar de não ver alterações nos níveis de BDNF nos animais LDLr^{-/-} estressados, houve um aumento de TrkB 95kDa e 145kDa no hipocampo das fêmeas LDLr^{-/-} dexta.

Diferentes tipos de estresse podem causar alterações específicas. Alguns trabalhos com estresse agudo de contenção relataram a diminuição de BDNF (FRANKLIN *et al.*, 2006, ROTH *et al.*, 2011), ou a diminuição dos níveis de mRNA (UEYAMA *et al.*, 1997, LEE *et al.*, 2008, ROTH *et al.*, 2011), enquanto outros aumentaram (NAIR *et al.*, 2008, ALBONI *et al.*, 2011) em relação aos controles não estressados. Podendo haver uma regulação positiva e transitória do BDNF no hipocampo (RAGE *et al.*, 2002), ou nenhum efeito no córtex-pré-frontal (ROTH *et al.*, 2011). Também foi demonstrado que a corticosterona regula negativamente a expressão de BDNF no hipocampo e a redução dos níveis de corticosterona restaura a expressão de BDNF/TrkB (GUPTA *et al.*, 2013). Já estresse crônico também apresenta resultados variados, que estresse crônico de contenção pode levar a níveis menores de BDNF. Porém, alguns trabalhos, como o presente, não encontraram alterações nos níveis de BDNF após estresse crônico (BATH; SCHILIT; LEE, 2013).

Em conjunto, os resultados acerca dos níveis de BDNF e TrkB nos animais LDLr^{-/-}, principalmente, vão de encontro a achados em animais LDLr^{-/-} que mostram a diminuição da neuroplasticidade. Como a diminuição da proliferação celular e botões pré-sinápticos no hipocampo (MULDER *et al.*, 2007), prejuízo sináptico (WANG *et al.*, 2014), redução na neurogênese (ENGEL *et al.*, 2019), apoptose exacerbada e ativação de astrócitos no hipocampo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020, DE PAULA *et al.*, 2020), além do aumento da neuroinflamação que também pode estar ligado à via de BDNF/TrkB (GAO *et al.*, 2020).

Quando um indivíduo experimenta estresse ou ansiedade, o corpo libera hormônios do estresse, incluindo o cortisol. Esses hormônios se ligam aos GR em várias regiões do encéfalo, particularmente no sistema límbico e no hipotálamo, que estão associados à regulação emocional e às respostas ao estresse (BEAR; CONNORTS; PARADISO 2017). Estudos indicaram que a desregulação do sistema de receptores GR pode estar ligada a sintomas de ansiedade em modelos humanos e animais. Em um estudo de Klok *et al.* (2011), verificou-se que indivíduos com transtornos de ansiedade apresentavam alterações na função do receptor GR, o que pode levar a um mecanismo de feedback negativo prejudicado, resultando em níveis sustentados de cortisol mesmo após o estresse ter diminuído. Sarubin *et al.* (2012) mostraram que variações no gene que codifica o receptor GR foram associadas ao aumento da suscetibilidade a transtornos de ansiedade em humanos.

Estudos em animais forneceram informações valiosas sobre o papel do receptor GR em comportamentos relacionados à ansiedade. Apesar de camundongos com redução nos níveis de GR apresentarem diminuição do comportamento tipo-ansioso (TRONCHE; KELLENDONK; KRETZ, 1999, MONTKOWSKI *et al.*, 1995, ROCHFORD *et al.*, 1997) e os animais LDLr-/- apresentarem diminuição do comportamento tipo-ansioso e níveis basais normais de corticosterona (PINHO, 2021), foi demonstrado um aumento basal do receptor GR no hipocampo dos animais LDLr-/- machos e fêmeas, sem dimorfismo sexual.

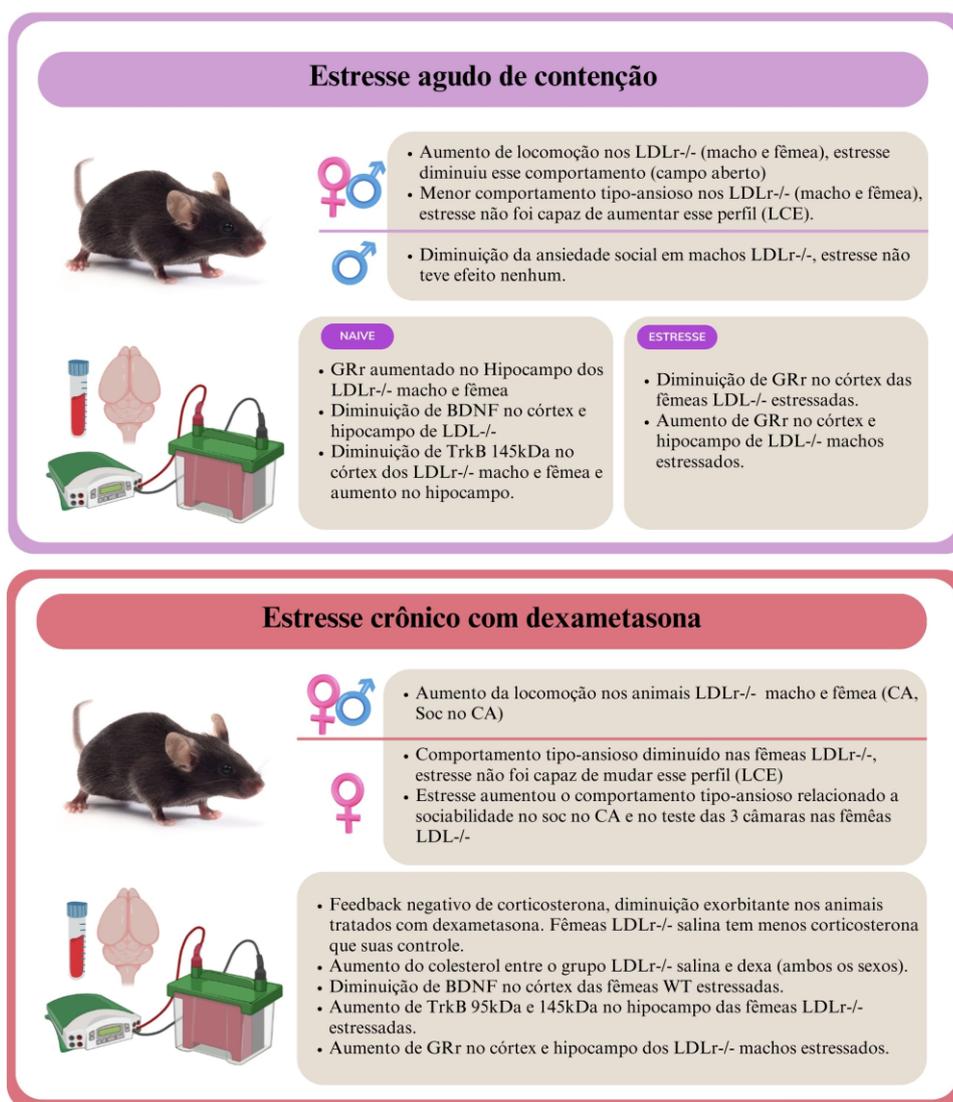
A submissão de roedores a protocolos de estresse pode levar ao aumento endógeno de glicocorticóide, e conseqüente aumento na ativação do receptor de glicocorticóides (GR) (MCEWEN *et al.*, 2012), gerando uma ativação prolongada do eixo HHA (MARTIN *et al.*, 2009). Uma recente pesquisa demonstrou que o estresse crônico, além de aumentar o comportamento do tipo-ansioso nos animais, também reduziu a expressão de GR em relação ao grupo não estressado (controle) (LIU *et al.*, 2020). O estresse agudo de contenção de 4h em camundongos *Swiss* causou uma diminuição do GR no córtex pré-frontal e hipocampo (CASARIL *et al.*, 2019, DOMINGUES *et al.*, 2019). Esse efeito foi observado no córtex pré-frontal das fêmeas LDLr-/- contidas, com a diminuição da expressão de GR. No entanto, observamos que o estresse agudo de contenção foi capaz de aumentar os níveis de GR tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal dos machos LDLr-/- contidos, contudo, não causando nenhum efeito nos animais controle.

Apesar de estudos observarem reduções na expressão de GR após administração aguda e crônica de dexametasona (UNEMURA *et al.*, 2012, RUKSEE *et al.*, 2014) e reduções na expressão de RNAm de GR (SKUPIO *et al.*, 2015). No presente estudo observamos um aumento do GR no córtex pré-frontal e hipocampo somente dos machos LDLr-/- dexametasona comparados a todos os outros

grupos. Esse resultado vem de encontro ao achado nos animais submetidos ao protocolo agudo de contenção.

O aumento de GR nos animais LDLr^{-/-} machos estressados, nos dois protocolos comportamentais é um dos principais achados deste trabalho, demonstrando que o aumento do colesterol ou a falta do receptor de LDL podem ter influência de alguma maneira nos níveis de GR e no seu aumento da expressão após protocolos de estresse, levando em conta que seus níveis basais já são elevados.

Figura 36: Sumário de resultados



Fonte: Da autora (2023)

Em resumo, anteriormente a este trabalho, já fora evidenciado pela autora ou em outros estudos o aumento da locomoção principalmente nas fêmeas LDLr^{-/-}, assim como a diminuição do comportamento tipo-ansioso basal delas. Este trabalho evidenciou que nem o estresse agudo

de contenção, nem o estresse crônico com dexametasona, foi capaz de aumentar o comportamento tipo-ansioso diminuído nas fêmeas LDLr^{-/-}. No entanto, foi visto o mesmo perfil com comportamento tipo-ansioso diminuído nos machos LDLr^{-/-} do protocolo de estresse de contenção, em que ele também não foi capaz de mudar o perfil. Enquanto no protocolo agudo somente os machos LDLr^{-/-} apresentaram uma diminuição do comportamento de ansiedade social, sendo que o estresse não foi capaz de mudar esse perfil, no estresse crônico o perfil foi visto nas fêmeas LDLr^{-/-}, porém o estresse foi capaz de aumentar o comportamento de ansiedade social.

Apesar do protocolo agudo não ter causado diferenças nos níveis de corticosterona, no protocolo crônico houve uma ruptura do eixo HHA em todos os animais tratados com dexametasona, demonstrando que o protocolo crônico funcionou. Além disso, a dexametasona foi capaz de aumentar os níveis de colesterol dos animais LDLr^{-/-}, mas não dos WT. Em relação aos parâmetros neuroquímicos avaliados, os animais *naive* LDLr^{-/-} de ambos os sexos apresentaram diminuição basal do imunoconteúdo de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo, diminuição de TrkB 145kDa no córtex pré-frontal e aumento no hipocampo, além do aumento de GR no hipocampo. O estresse agudo acarretou uma diminuição de GR no córtex das fêmeas LDLr^{-/-} contidas, porém houve um aumento de GR tanto no córtex quanto no hipocampo dos machos LDLr^{-/-} contidos, o mesmo perfil foi visto nos machos LDLr^{-/-} dexametasona no estresse crônico. Além disso, o estresse crônico aumentou o imunoconteúdo de ambas as isoformas de TrkB no hipocampo das fêmeas LDLr^{-/-} dexametasona. Os resultados significativos estão resumidos na figura 42.

O presente trabalho traz resultados pioneiros acerca da sensibilidade de animais LDLr^{-/-} frente a protocolos de estresse, assim como a resposta a comportamentos tipo-ansiosos diferente em ambos os sexos a diferentes protocolos. Além disso, foi o primeiro a demonstrar as alterações nos níveis de BDNF, TrkB e GR em animais LDLr^{-/-} *naive* e submetidos a protocolos de estresse.

Estudos posteriores ainda devem ser levados em conta em relação a ligação do colesterol com os comportamentos tipo-ansiosos. Nosso grupo de pesquisa irá continuar tentando desvendar se essas mudanças fenotípicas estão ligadas ao aumento do colesterol ou a diminuição da expressão do LDLr nos animais LDLr^{-/-} com a administração de estatistas. Além disso, o grupo pretende analisar o imunoconteúdo do BDNF maduro para acrescentar a publicação futura gerada por essa dissertação.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho traz resultados pioneiros acerca da sensibilidade de animais LDLr^{-/-} frente a diferentes protocolos de estresse. Apesar do dimorfismo sexual apresentado na sensibilidade aos diferentes paradigmas de estresse em relação aos comportamentos tipo-ansiosos, com os machos respondendo ao estresse crônico e as fêmeas não, não observamos diferenças basais nos níveis de pró-BDNF, TrkB e GR entre os sexos de LDLr^{-/-}, possivelmente, demonstrando que essas vias não estariam relacionadas à diferença sexual comportamental apresentada. Embora os animais LDLr^{-/-} terem sido resistentes ao estresse agudo e crônico, ao qual foram submetidos, os animais *naive* apresentam diminuição do pró-BDNF e TrkB e aumento de GR basal, refutando nossas principais hipóteses de que uma diminuição estaria relacionada a uma possível sensibilidade ao estresse. Refutando ainda mais a nossa hipótese de que os estresses iriam diminuir os níveis dessas proteínas, pois apesar de não haver alterações nos animais WT, houve aumento de GR no hipocampo e córtex pré-frontal de LDLr^{-/-} machos estressados (nos dois protocolos), além de aumento de TrkB nas fêmeas LDLr^{-/-} que passaram pelo estresse crônico, demonstrando, possivelmente, uma maior ativação e recrutamento dessas proteínas nos animais LDLr^{-/-}. Contudo, os baixos níveis de pró-BDNF basais podem estar relacionados com a hiperlocomção apresentada nos LDLr^{-/-} devido a literatura anterior apontar essa relação em animais WT, apesar que o estresse agudo foi capaz de normalizar a hiperlocomção dos animais LDLr^{-/-}, principalmente das fêmeas, as quais essa característica é apresentada em diversos trabalhos. Em conjunto, o presente trabalho demonstra informações valiosas acerca da resistência dos animais LDLr^{-/-} a protocolos de estresse quando observado o comportamento tipo-ansioso, e a ainda o possível papel da ativação de vias neuroplásticas após estresse crônico.

REFERÊNCIAS

- ADAMEC, R.; MUIR, C.; GRIMES, M. & PEARCEY, K. Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. **Behavioral Brain Research**, 2006; 175(1), p. 30-37.
- AGARGUN, M.Y. *et al.* Low cholesterol level in patients with panic disorder: the association with major depression. **J. Affect. Disord.**, 50, p. 29-32, 1998.
- AGUIRRE, A.L.; HARDMAN, M.; & KOEKKOEK, S. Fator neurotrófico derivado do cérebro e seu papel nas doenças neurodegenerativas. **Journal of Neurology Research**, 2022; 10(2), p. 75-82.
- AHN, T. *et al.* Acute stress-induced changes in hormone and lipid levels in mouse plasma. **Veterinárni Medicína**, 2016; [S.L.], v. 61, n. 2, p. 57-64. Czech Academy of Agricultural Sciences. [Doi.org/10.17221/8718-vetmed](https://doi.org/10.17221/8718-vetmed).
- AKIOYAMEN, L. E. *et al.* Anxiety, depression, and health-related quality of life in heterozygous familial hypercholesterolemia: a systematic review and meta-analysis: A systematic review and meta-analysis. **Journal Of Psychosomatic Research**, 109, p. 32-43, 2018.
- ALBONI, S. *et al.* Stress induces altered CRE/CREB pathway activity and BDNF expression in the hippocampus of glucocorticoid receptor-impaired mice. **Neuropharmacology**, 2011; [S.L.], v. 60, n. 7-8, p. 1337-1346. [Doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.050](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.050).
- ALVES, R. J.; SUEHIRO JUNIOR, A.T.; PELLEGRINO, L. B. Hipercolesterolemia familiar homozigótica e heterozigótica grave: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, [S.L.], 2021; v. 31, n. 1, p. 14-22. [Doi.org/10.29381/0103-8559/2021310114-22](https://doi.org/10.29381/0103-8559/2021310114-22).
- AMORE, M. *et al.* Predictors of violent behavior among acute psychiatric patients: clinical study. **Psychiatry Clin. Neurosci.**, 2008; 62, p. 247-255.
- ANISMAN, H. *et al.* Stressor-induced corticotropin-releasing hormone, bombesin, ACTH and corticosterone variations in strains of mice differentially responsive to stressors. **Stress**, 1998; 2, p. 209-220.
- APA – American Psychiatric Association. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais- DSM. 5 ed.** Porto Alegre: Artmed, 2014.
- APA – American Psychiatric Association. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais- DSM. 4 ed.** Porto Alegre: Artmed, 2002.
- ARAKAWA, H. *et al.* Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker losartan on amygdala activity and stress-induced behavior in mice with chronic corticosterone administration. **Journal of Pharmacological Sciences**, 2018; 136(4), p. 224-233.
- ARIAS, *et al.* Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction modulates expression of placental vascular growth factors and fetal and placental growth. **Molecular Human Reproduction**, 2021; [S.L.], v. 27, n. 3, p. 1-1. [Doi.org/10.1093/molehr/gaab006](https://doi.org/10.1093/molehr/gaab006).

- ARIZA, M. *et al.* Neuropsychological performance of young familial hypercholesterolemia patients. **European Journal of Internal Medicine**, 34, p. 29-31, 2016.
- BAILEY, K. R., CRAWLEY, J. N. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. Buccafusco JJ, editor. Boca Raton, 2 ed., chapter 5 Anxiety-Related Behaviors in Mice. 2009
- BAJWA, W.K. *et al.* High cholesterol levels in patients with panic disorder. **Am. J. Psychiatry**, 149 (3), p. 376-378, 1992.
- BARAK, B.; FENG, G. Neurobiology of social behavior abnormalities in autism and Williams syndrome. **Nature Neuroscience**, 19 (5), p. 647-655, 2016.
- BATH, K.G.; SCHILIT, A.; LEE, F. S. Stress effects on BDNF expression: effects of age, sex, and form of stress. **Neuroscience**, 2013; [S.L.], v. 239, p. 149-156.
[Doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.074](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.074).
- BEAR, M. F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M. A. **Neurociências - Desvendando o Sistema Nervoso**. 4ª Edição, Artmed, 2017.
- BERGER, S. *et al.* Effect of Chronic Corticosterone Treatment on Depression-Like Behavior and Sociability in Female and Male C57BL/6N Mice. **Cells**, v. 8, n. 9, 1 set. 2019.
- BERTON, O. *et al.* Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. **Science**, 2006; [S.L.], v. 311, n. 5762, p. 864-868. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. [Doi.org/10.1126/science.1120972](https://doi.org/10.1126/science.1120972).
- BJÖRKHEM, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? **Journal of Clinical Investigation**, 110 (6), p. 725-730, 2008.
- BORRONI, M. V.; VALLÉS, A. S.; BARRANTES, F. J. The lipid habitats of neurotransmitter receptors in brain. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 1858(11), p. 2662-2670, 2016.
- BORTOLATO, M. *et al.* Monoamine oxidase A and A/B knockout mice display autistic-like features. **International Journal Of Neuropsychopharmacology**, 16 (4), p. 869-888, 2013.
- BOYLE, M. P. *et al.* Forebrain glucocorticoid receptors modulate anxiety-associated locomotor activation and adrenal responsiveness. **Journal of Neuroscience**, 2005; 25(34), p. 8693-8700.
- BREMNER, J. D. *et al.* Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder. **Am. J. Psychiatry**, 1997; 154 (5), p. 624-629.
- BREMNER, J. D. *et al.* Hippocampal volume reduction in major depression. **Am. J. Psychiatry**, 2000; 157 (1), p. 115-118.
- BROEKKAMP, C. L. *et al.* Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **European Journal of Pharmacology**, 26(3), p. 223-229. 1986.
- BUDNI, J., *et al.* Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. **Exp Neurol**. 240, 112-121, 2012.

- BYRD, A. L.; MANUCK, S. B.; MAOA, Childhood Maltreatment, and Antisocial Behavior: Meta-analysis of a Gene-Environment Interaction. **Biological Psychiatry**, 75(1), p. 9–17, 2014.
- CAMPOS *et al.* Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev. Bras. Psiquiatr.** 35 (2), 2013.
- CAO, W. *et al.* Prolonged exposure to dexamethasone reduces the effect of antidepressants in the forced swim test. **Neuropharmacology**, 2017; 113(Pt A), 271-280.
- CASARIL, A. M. *et al.* The selenium-containing compound 3-((4-chlorophenyl) selenyl)-1-methyl-1H-indole reverses depressive-like behavior induced by acute restraint stress in mice: modulation of oxido-nitrosative stress and inflammatory pathway. **Psychopharmacology**, 2019; [S.L.], v. 236, n. 10, p. 2867-2880. Springer Science and Business Media LLC. [Doi.org/10.1007/s00213-018-5151-x](https://doi.org/10.1007/s00213-018-5151-x).
- CASTREN, E.; VOIKAR, V. & RANTAMAKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Current Opinion in Pharmacology**, 2007; 7(1), 18-21.
- CHAM, S.; KOSLIK, H. J.; GOLOMB, B. A. Mood, personality, and behavior changes during treatment with statins: a case series. **Drug Saf. Case Rep.**, 3 (2016), p. 1
- CHAN, M. F. *et al.* A Comprehensive Neuropsychological Study of Familial Hypercholesterolemia and Its Relationship with Psychosocial Functioning: a biopsychosocial approach. **Brain Sciences**, [S.L.], 2022; v. 12, n. 9, p. 1127. MDPI AG. [Doi.org/10.3390/brainsci12091127](https://doi.org/10.3390/brainsci12091127).
- CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. **Nat Rev Neurosci.** 2003; 4(4), p. 299-309. Doi: 10.1038/nrn1078.
- CHEN J. *et al.* Polimorfismo BDNF Val66Met e sintomas relacionados à ansiedade na doença de Alzheimer clinicamente diagnosticada. **Am J Alzheimers Dis Other Demen**, 2017; 32(8), p. 481-488. Doi: 10.1177/1533317517720423.
- CHEN, Chen-Mei *et al.* Probucol treatment after traumatic brain injury activates BDNF/TrkB pathway, promotes neuroregeneration and ameliorates functional deficits in mice. **British Journal Of Pharmacology**, 2023; [S.L.], p. 1-1, 26. [Doi.org/10.1111/bph.16157](https://doi.org/10.1111/bph.16157).
- CHEN, Y. *et al.* Neuroprotective effects of geniposide in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Pharmacol.** 2020; 882:173315. Doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173315.
- CHEN, Zhe-Yu *et al.* Genetic Variant BDNF (Val66Met) Polymorphism Alters Anxiety-Related Behavior. **Science**, 2006; [S.L.], v. 314, n. 5796, p. 140-143. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. [Doi.org/10.1126/science.1129663](https://doi.org/10.1126/science.1129663).
- CHEON, So Y. *et al.* Impaired Cholesterol Metabolism, Neurons, and Neuropsychiatric Disorders. **Experimental Neurobiology**, 2023; [S.L.], v. 32, n. 2, p. 57-67, The Korean Society for Brain and Neural Science. [Doi.org/10.5607/en23010](https://doi.org/10.5607/en23010).
- CHIBA, S. *et al.* Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2012; 39(1), p. 12-119.

CHOI, H.S *et al.* O papel do BDNF na regulação da plasticidade sináptica. **Ciências do Cérebro**, 2020; 10(8), p. 545.

CHRISTOPHERSON, K.S. *et al.* Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. **Cell**. 2005; 120421–433.

COLLA, A. R. S. *et al.* Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, 758, p. 171-176, 2015.

CRUZ-SANCHEZ, F. *et al.* Cognitive impairment in heterozygous familial hypercholesterolemia. **Alzheimer's & Dementia**, 2008.

DE OLIVEIRA, J. *et al.* Increased susceptibility to amyloid- β -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. 2014a. **Journal of Alzheimer's Disease** 41(1):43-60. Doi: 10.3233/JAD-132228.

DE OLIVEIRA, J. *et al.* Increased susceptibility to amyloid- β -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. 2014b. **Journal of Alzheimer's Disease** 41(1):43-60. Doi: 10.3233/JAD-132228.

DE OLIVEIRA, Jade de *et al.* High Cholesterol Diet Exacerbates Blood-Brain Barrier Disruption in LDLr $^{-/-}$ Mice: impact on cognitive function. **Journal Of Alzheimer'S Disease**, 2020; [S.L.], v. 78, n. 1, p. 97-115, 27. [Doi.org/10.3233/jad-200541](https://doi.org/10.3233/jad-200541). (A)

DE OLIVEIRA, J. de *et al.* LDL Receptor Deficiency Does not Alter Brain Amyloid- β Levels but Causes an Exacerbation of Apoptosis. **Journal Of Alzheimer'S Disease**, 2020; [S.L.], v. 73, n. 2, p. 585-596, 21. [Doi.org/10.3233/jad-190742](https://doi.org/10.3233/jad-190742). (B)

DE OLIVEIRA, R. P. *et al.* Clozapine prevented social interaction deficits and reduced c-Fos immunoreactivity expression in several brain areas of rats exposed to acute restraint stress. **Plos One**, 2022; [S.L.], v. 17, n. 3, p. 1-1. **Public Library of Science (PLoS)**. [Doi.org/10.1371/journal.pone.0262728](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262728).

DE PAULA, G. C. **O consumo moderado de vinho tinto melhora o déficit cognitivo induzido pela hipercolesterolemia em camundongos**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015. 86 p.

DECHANT, G.; BARDE, Y. A. The neurotrophin receptor p75^{NTR}: novel functions and implications for diseases of the nervous system. **Nat Neurosci**, 2002; 5, p. 1131–1136. [Doi.org/10.1038/nn1102-1131](https://doi.org/10.1038/nn1102-1131).

DELANOGARE, E. *et al.* Enriched environment ameliorates dexamethasone effects on emotional reactivity and metabolic parameters in mice. **Stress**, v. 23, n. 4, p. 466-473, 2020.

DESBONNET, O. *et al.*, Phenotypic effects of repeated psychosocial stress during adolescence in mice mutant for the schizophrenia risk gene neuregulin-1: a putative model of gene x environment interaction. **Brain Behav Immun**, 26, p. 660-671, 2012.

DIETSCHY, J.M.; TURLEY S.D. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal **J Lipid**. 2004; 451375–1397. 2004.

DOMINGUES, Micaela *et al.* Effects of a selanylimidazopyridine on the acute restraint stress-induced depressive- and anxiety-like behaviors and biological changes in

- mice. **Behavioural Brain Research**, 2019; [S.L.], v. 366, p. 96-107.
[Doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.021](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.021).
- DUMAN, R. S., LI, N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 367(1601), 2475-84, 2012.
- ELDER, G. A. *et al.* Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **Behavioural Brain Research**, v. 191, n. 2, p. 256–265, 22 ago. 2008.
- ENGEL, D. F. *et al.* Neurogênese hipocampal adulta prejudicada em um modelo de camundongo de hipercolesterolemia familiar: um papel para o receptor de LDL e o metabolismo do colesterol em células precursoras neurais adultas. **Mol Metab.** 2019; 30 :1–15. Doi: 10.1016/j.molmet.2019.09.002.
- ENGEL, D. F. *et al.* Impaired adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of familial hypercholesterolemia: a role for the ldl receptor and cholesterol metabolism in adult neural precursor cells. **Molecular Metabolism**, 2019; [S.L.], v. 30, p. 1-15.
[Doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.002](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.002).
- ENGEL, D. F. *et al.* Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr (-/-) mouse experimental model. **Behav Brain Res.** 2016; 311, p. 31–38. Doi: 10.1016/j.bbr.2016.05.029.
- ERNST, C. *et al.* A deletion in tropomyosin-related kinase B and the development of human anxiety. **Biol. Psychiatry**, 2011, 69, 604–607.
- EYAMA, T. *et al.* Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. **Neuroscience Research**, 1997; [S.L.], v. 28, n. 2, p. 103-110.
[Doi.org/10.1016/s0168-0102\(97\)00030-8](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(97)00030-8).
- FALUDI, A. A, *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – [published correction appears in Arq Bras Cardiol. 2017 Nov;109 (5):499]. **Arq Bras Cardiol**, 109(2 Supl 1), p. 1-76, 2017.
- FARAVELLI, C.; LO, S. C.; LELLI, L. *et al.* The role of life events and HPA axis in anxiety disorders: a review. **Curr Pharm Des**, 18(35), p. 5663-5674, 2012.
- FERGUSON, D. M. *et al.* MAOA, abuse exposure and antisocial behaviour: 30-year longitudinal study.: 30-year longitudinal study. **British Journal Of Psychiatry**, 198 (6), p. 457-463, 2011.
- FERGUSON, D. M. *et al.* Moderating role of the MAOA genotype in antisocial behaviour. **British Journal Of Psychiatry**, 200 (2), p. 116-123, 2012.
- FERRARO, M. *et al.* Mapping cholesterol interaction sites on serotonin transporter through coarse-grained molecular dynamics. **PLoS One**, 2016; 11. Article e0166196.
- FLINT, M. S. *et al.* C57BL/6 Mice Are Resistant to Acute Restraint Modulation of Cutaneous Hypersensitivity. **Toxicological Sciences**, 2001; [S.L.], v. 62, n. 2, p. 250-256.
[Doi.org/10.1093/toxsci/62.2.250](https://doi.org/10.1093/toxsci/62.2.250).
- FRANKLIN, T. *et al.* Sex and ovarian steroids modulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in rat hippocampus under stressful and non-stressful

conditions. **Psychoneuroendocrinology**, 2006; [S.L.], v. 31, n. 1, p. 38-48.
[Doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.05.008](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.05.008).

FRODL, T. *et al.* Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. **Am. J. Psychiatry**, 2002; 159 (7), p. 1112-1118.

GAJEWSKI, P.; ROSTALSKI, H.; DANYSZ, W.; WESOŁOWSKA, A. Efeitos Ansiolíticos do Inibidor de Interação AMPA Receptor-TARP (Composto Orgânico 14) ODV-003 em Camundongos. **Biomoléculas**. 2020; 10(5):687. Doi: 10.3390/biom10050687.

GAROLERA, M. *et al.* Episodic memory performance in young adults with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 252, 2016.

GOLDBERG, A. C. *et al.* Familial hypercholesterolemia: Screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients: Clinical guidance from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. **Journal of Clinical Lipidology**, 5(3), p. 133-140, 2011.

GOLDSTEIN, J. L. *et al.* Hipercolesterolemia Familiar. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease** (eds. Valle D. *et al.*), 8ª Edição. Nova York: McGraw-Hill. 2006.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 29(4), p. 431-438, 2009.

GONUL, A. S., *et al.* Metabólitos do triptofano e estresse oxidativo em pacientes com transtorno de ansiedade generalizada. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(10):2425-2430. PMID: 28537692.

GRAY J. A.; MCNAUGHTON, N., Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of affective disorders**, 61(3), p. 161-176, 2000.

GREGORIO, T. **Efeitos da suplementação gestacional com vitamina D no comportamento emocional e no sistema serotoninérgico de ratas submetidas à programação fetal induzida por dexametasona**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020, 79 p.

GUNNAR, Megan *et al.* The Neurobiology of Stress and Development. **Annual Review Of Psychology**, [S.L.], 2007; v. 58, n. 1, p. 145-173.
[Doi.org/10.1146/annurev.psych.58.110405.085605](https://doi.org/10.1146/annurev.psych.58.110405.085605).

GUPTA, V. *et al.* TrkB Receptor Signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. **International Journal Of Molecular Sciences**, 2013; [S.L.], v. 14, n. 5, p. 10122-10142. [Doi.org/10.3390/ijms140510122](https://doi.org/10.3390/ijms140510122).

HAINES, T. H. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? **Prog. Lipid Res.**, 2002; 40, p. 299-324.

HAMBURGER, V.; LEVI-MONTALCINI, R. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. **Journal of Experimental Zoology**, 1949; v. 111, n. 3, p. 457-501.

HARADA, P. H. *et al.* Familial hypercholesterolemia prevalence in an admixed racial society: Sex and race matter. The ELSA-Brasil. **Atherosclerosis**, 277, p. 273-277, 2018.

HAYWARD, C. *et al.* Plasma lipid levels in patients with panic disorder or agoraphobia **Am. J. Psychiatry**, 146, p. 917-919, 1989.

HERZ, J.A. Polipoprotein e receptors in the nervous system. **Curr Opin Lipidol.** 2009; 20190–196

HOKKANEN, K.; TIRRONEN, A.; YLÄ-HERTTUALA, S. Intestinal lymphatic vessels and their role in chylomicron absorption and lipid homeostasis. **Current Opinion In Lipidology**, 30 (5), p. 370-376, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17710250/>. Acesso em 13 jun. 2023.

HU, X. *et al.* Age-dependent effect of high cholesterol diets on anxiety-like behavior in elevated plus maze test in rats. **Behav Brain Funct.**, 2014; 10:30. Doi: 10.1186/1744-9081-10-30.

HUNG, Y. Y.; LIN, C. J.; HUANG, T. L. Higher serum tropomyosin-related kinase B protein level in major depression. **Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 2010; 34, p. 610–612.

HYTTINEN, L. *et al.* Long-term statin therapy is associated with better episodic memory in aged familial hypercholesterolemia patients in comparison with population controls. **Journal of Alzheimer's Disease**, 21(2), p. 611-617, 2010.

ISHIBASHI, S *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J Clin Invest**, 92(2), p. 883-893, 1993.

JE, H. S. *et al.* Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 109, n. 39, p. 15924-15929, 10 set. 2012. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1207767109>.

JOHNSON, B. *et al.* Dietary Polyunsaturated Fatty Acids and Cholesterol Uptake. **European Journal of Biochemistry**, 270(3), 478-492. 2023.

KAHN, R. S., WETZLER, S. m-Chlorophenylpiperazine as a probe of serotonin function. **Biol. Psychiatry**, 30 (11), p. 1139-1166, 1991.

KALKMAN, H. O.; DOMINIQUE, F. Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization. **Pharmacol Ther.** 2019; 197, p. 108-118. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.12.006

KERNIE, S. G. *et al.* BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. **The Embo Journal**, 2000; [S.L.], v. 19, n. 6, p. 1290-1300. [Doi.org/10.1093/emboj/19.6.1290](https://doi.org/10.1093/emboj/19.6.1290).

KLOET, C. S. de *et al.* Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review. **J. Psychiatr. Res.**, 2006; 40 (6), p. 550-567.

- KLOK, M. D. *et al.* Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA and its splice variants in postmortem brain regions of patients with major depressive disorder. **Journal of psychiatric research**, 2011; 45(7), p. 871-878.
- KLUMPERS, F. *et al.* Dorsal and ventral striatal networks in smoking cessation: A pilot study. **Hum Brain Mapp.** 2017; 38(5), p. 2096-2106. Doi: 10.1002/hbm.23516.
- KOPONEN, E. *et al.* Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor *trkB* exhibit increased activation of the *trkB*-PLC γ pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. **Molecular And Cellular Neuroscience**, 2004; [S.L.], v. 26, n. 1, p. 166-181. [Doi.org/10.1016/j.mcn.2004.01.006](https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.01.006).
- KOUDINOV, A.R.; KOUDINOVA, N. V. Cholesterol, synaptic function and Alzheimer's disease. **Pharmacopsychiatry**. 2003; 36 Suppl 2:S107-S112. Doi: 10.1055/s-2003-43055.
- KRIEGER, M.; HERZ, J. Estruturas e Funções dos Receptores de Lipoproteínas Multiligantes: Receptores Depuradores de Macrófagos e Proteína Relacionada ao Receptor de LDL (LRP). **Revisão Anual de Bioquímica**, 63, 1994; 601-637.
- KRISHNAN V. *et al.* Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, 131(2), p. 391-404, 2007.
- KRONENBERG G. *et al.* Reduced hippocampal neurogenesis in the GR (+/-) genetic mouse model of depression. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.** 259(8), 499-504, 2009.
- KUCZMIERCZYK, A.R. *et al.* Serum cholesterol levels in patients with generalized anxiety disorder (GAD) and with GAD and comorbid depression. **Can. J. Psychiatry**, 41, p. 465-468, 1996.
- KULKARNI, M. P. *et al.* Attenuation of acute and chronic restraint stress-induced perturbations in experimental animals by *Nelumbo nucifera* Gaertn. **Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, 2008; [S.L.], v. 70, n. 3, p. 327. [Doi.org/10.4103/0250-474x.42982](https://doi.org/10.4103/0250-474x.42982).
- KUMARI, B. *et al.* Protective effect of non-selective and selective COX-2-inhibitors in acute immobilization stress-induced behavioral and biochemical alterations. **Pharmacological reports**, 2007, vol. 59,6, p. 699-707.
- LEVONE, B. R. *et al.* Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. **Neurobiology Of Stress**, [S.L.], 2015; v. 1, p. 147-155. [Doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.003](https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.003).
- LIAO, W. *et al.* A sinalização local de BDNF-TrkB medeia a má adaptação do hipocampo em um modelo de depressão em ratos com estresse de contenção repetido. **Pharmacol Biochem Behav.** 2021; 208:173237. Doi: 10.1016/j.pbb.2021.173237.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987.
- LIU, W. *et al.* A via de sinalização BDNF-TrkB medeia a indução da atividade epileptiforme pela homocisteína. **Mol Med Rep.** 2019; 19(1), p. 29-36. Doi: 10.3892/mmr.2018.9635.

LOPES, J. B. **Donepezil reverte déficits cognitivos em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar**. TCC (Graduação) - Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015. 82 p.

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

MABUCHI, H. *et al.* Serum lipids and coronary heart disease in heterozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku district of Japan. **Atherosclerosis**, 28(4), p. 417-423, 1977.

MACHADO, A. E. **A hipercolesterolemia, induzida por dieta ou genótipo, impacta negativamente na formação de memórias aversivas contextuais em camundongos**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016, 79 p. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/188200/PGNC0281-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 mar. 2021.

MACLEOD, C.; RUTHERFORD, E. M. Anxiety and the selective processing of emotional information: mediating roles of awareness, trait and state variables, and personal relevance of stimulus materials. **Behav Res Ther**, 30, p. 479-91, 1992.

MANCHANDA, R. K.; JAGGI, A. S.; SINGH, N. Ameliorative potential of sodium cromoglycate and diethyldithiocarbamic acid in restraint stress-induced behavioral alterations in rats. **Pharmacol Rep.**, 2011; 63, p. 54–63

MARIANNO, P. *et al.* Environmental Enrichment Blunts Ethanol Consumption after Restraint Stress in C57BL/6 Mice. **Plos One**, 2017; [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-1, 20. [Doi.org/10.1371/journal.pone.0170317](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170317).

MARTIN, Elizabeth I. *et al.* The Neurobiology of Anxiety Disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology.: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. **Psychiatric Clinics Of North America**, 32 (3), p. 549-575, 2009.

MARTINOWICH, K.; MANJI, H. & LU, B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. **Nat Neurosci**, 2007; 10, p. 1089–1093. [Doi.org/10.1038/nn1971](https://doi.org/10.1038/nn1971).

MAUCH, D. H. *et al.* CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. **Science**. 2001; 2941354–1357.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Curr. Opin Neurobiol**, 1995; 5 (2), p. 205-216.

MCLACHLAN, C. S.; YI XING SOH, C. Differences in anxiety-related behavior between apolipoprotein E-deficient C57BL/6 and wild type C57BL/6 mice. **Physiol Res**. 2005; 54(6), p. 701-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15717856/> Acesso em: 13 jun. 2023.

- MCLAUGHLIN, N. C. *et al.* Anxiety-like behavior is influenced by the dopamine D2 receptor in subregions of the anterior cingulate cortex and the amygdala. **Neurobiol Learn Mem.**, 2019; 157:61-69. Doi: 10.1016/j.nlm.2018.12.011.
- MERINO-SERRAIS P. *et al.* 27-Hydroxycholesterol induces aberrant morphology and synaptic dysfunction in hippocampal neurons. **Cereb Cortex**. 2019; 29, p. 429–446. Doi: 10.1093/cercor/bhy274.
- MILAD, M.R.; RAUCH, S.L. Obsessive-compulsive disorder: Beyond segregated cortico-striatal pathways. **Trends Cogn Sci**. 2012; 16(1), p. 43-51. Doi: 10.1016/j.tics.2011.11.003.
- MILLAN M. J.; FONE K. C. F.; STECKLER T.; HORAN W. P. Negative symptoms of schizophrenia: Clinical characteristics, pathophysiological substrates, experimental models and prospects for improved treatment. **Eur Neuropsychopharmacol**. 2020; 31, p.13.
- MONTKOWSKI, A. *et al.* Long-Term Antidepressant Treatment Reduces Behavioural Deficits in Transgenic Mice with Impaired Glucocorticoid Receptor Function. **Journal Of Neuroendocrinology**, 1995; [S.L.], v. 7, n. 11, p. 841-845. [Doi.org/10.1111/j.1365-2826.1995.tb00724.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1995.tb00724.x).
- MOORE, K. J.; TABAS, I. Macrófagos na Patogênese da Aterosclerose. **Cell**, 2011; 145(3), 341-355.
- MOREIRA, E. L. *et al.* Age-related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLR^{-/-}): evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **J Alzheimers Dis.**, 2012; 32, p. 495–511. Doi: 10.3233/JAD-2012-120541.
- MOREIRA, E. L. G. *et al.* Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? **J Neural Transm**, 121, p. 415-426, 2014.
- MOREIRA, E. L. G. **A hipercolesterolemia como um fator de risco para o desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve: evidências obtidas em modelos experimentais.** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013, 160 p.
- MOREIRA, F. P. *et al.* The Met allele of BDNF Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF levels in generalized anxiety disorder. **Psychiatric Genetics**, 2015; [S.L.], v. 25, n. 5, p. 201-207. [Doi.org/10.1097/ypg.0000000000000097](https://doi.org/10.1097/ypg.0000000000000097).
- MORISSETTE, M. *et al.* Membrane cholesterol removal and replenishment affect rat and monkey brain monoamine transporters. **Neuropharmacology**, 2018; [S.L.], v. 133, p. 289-306. Elsevier BV. [Doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.039](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.039).
- MOWLA, S. J. *et al.* Differential Sorting of Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Hippocampal Neurons. **The Journal Of Neuroscience**, 1999; [S.L.], v. 19, n. 6, p. 2069-2080. [Doi.org/10.1523/jneurosci.19-06-02069.1999](https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-06-02069.1999).
- MOZAFFARIAN, D. *et al.* American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: **A Report From the American Heart Association**, 133(4), p. 38-360, 2016.

MULDER, M. *et al.* LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. 2007. **Neuroscience Research** 59(3):251-6. doi: 10.1016/j.neures.2007.07.004

MYTILINAIIOU, M. *et al.* Familial hypercholesterolemia: New horizons for diagnosis and effective management. **Frontiers in Pharmacology**, 9, 707, 2018.

NAIR, A. *et al.* Stressor-Specific Regulation of Distinct Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcripts and Cyclic AMP Response Element-Binding Protein Expression in the Postnatal and Adult Rat Hippocampus. **Neuropsychopharmacol**, 32; p. 1504–1519.
[Doi.org/10.1038/sj.npp.1301276](https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301276).

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.

NEUMEISTER, A. *et al.* The Role of BDNF-TrkB Signaling in the Pathogenesis of PTSD. **Journal Of Depression And Anxiety**, 2013; [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-1.
[Doi.org/10.4172/2167-1044.s4-006](https://doi.org/10.4172/2167-1044.s4-006).

NILSSON, K. W. *et al.* Genotypes do not confer risk for delinquency ut rather alter susceptibility to positive and negative environmental factors: gene-environment interactions of BDNF Val66Met, 5-HTTLPR, and MAOA-uVNTR. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, 18(5), 2015.

O'MAHONY, C. M. *et al.* Restraint stress-induced brain activation patterns in two strains of mice differing in their anxiety behaviour. **Behavioural Brain Research**, 2010; [S.L.], v. 213, n. 2, p. 148-154. [Doi.org/10.1016/j.bbr.2010.04.038](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.04.038).

O'TUATHEIGH, B. *et al.*, Phenotypic characterization of spatial recognition and social behaviour in mice with knockout of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. **Neuroscience**, 147, p. 18-27, 2007.

OHVO-REKIKKA, H.; RAMTEDT, B.; LEPPIMAKI, P.; SLOTTE, P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Prog. Lipid Res.**, 2002; 41, p. 66-97.

OLESCOWICZ, G. **O impacto da hipercolesterolemia sobre os processos de memória e plasticidade sináptica em camundongos machos e fêmeas: do receptor LDL aos oxisteróis**. 2021. 119 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

OLIVEIRA, *et al.* High Cholesterol Diet Exacerbates Blood-Brain Barrier Disruption in LDLr^{-/-} Mice: impact on cognitive function. **Journal Of Alzheimer'S Disease**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 97-115, 27 out. 2020 A. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jad-200541>.

OLIVEIRA, J. de *et al.* LDL Receptor Deficiency Does not Alter Brain Amyloid-β Levels but Causes an Exacerbation of Apoptosis. **Journal Of Alzheimer'S Disease**, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 585-596, 21 jan. 2020 B. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jad-190742>.

PALMSTIERNA, T. *et al.*, Evaluation of the Brief Psychopathological Rating Scale in relation to aggressive behavior by acute involuntarily admitted patients. **Acta Psychiatr. Scand.**, 1989; 79, p. 313-316.

PAPAKOSTAS, G. I. *et al.* Cholesterol in mood and anxiety disorders: review of the literature and new hypotheses. **European Neuropsychopharmacology**, 2004; [S.L.], v. 14, n. 2, p. 135-142. [Doi.org/10.1016/s0924-977x\(03\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0924-977x(03)00099-3).

PAPAKOSTAS, G.I. *et al.* Cholesterol in mood and anxiety disorders: review of the literature and new hypotheses: review of the literature and new hypotheses. **European Neuropsychopharmacology**, 14 (2), p. 135-142, 2004.

PARK, H.; POO, Mm. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nat Rev Neurosci**, 2013; 14, 7–23 (2013). [Doi.org/10.1038/nrn3379](https://doi.org/10.1038/nrn3379).

PAUL, R. *et al.* Hypercholesterolemia causes psychomotor abnormalities in mice and alterations in cortico-striatal biogenic amine neurotransmitters: relevance to Parkinson's disease. **Neurochem Int.**, 2017; 108:15–26. Doi: 10.1016/j.neuint.2017.01.021.

PAYAMSHAD, S. *et al.* Effect of citicoline and transcranial direct current stimulation on depressive-like behaviors in mice & quot. **Behavioural Brain Research**, 2023[S.L.], v. 450, p. 11449. [Doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114495](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114495).

PENMATSA, A.; WANG, K. H.; GOUAUX, E. X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism. **Nature**, 2013; 503, p. 85-9.

PETER, H. *et al.* Serum cholesterol level comparison: control subjects, anxiety disorder patients, and obsessive-compulsive disorder patients. **Can. J. Psychiatry**, 47 (6), p. 557-561, 2002.

PETER, H.; TABRIZIAN, S.; HAND, I. Serum cholesterol in patents with obsessive compulsive disorder during treatment with behavior therapy and SSRI or placebo. **International Journal of Psychiatry in Medicine**, v. 30, n. 1, p. 27–39, 2000.

PFRIEGER, F. W; UNGERER N., Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes, **Progress in Lipid Research**, 50 (4), p. 357-371, 2011.

PINHO, C. M. **Investigação do comportamento social e tipo-ansioso em camundongos nocaute para o receptor de LDL: Um modelo animal de Hipercolesterolemia Familiar.** Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, UFSC, 2021.

POTTIER, C. *et al.* High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. **Mol Psychiatry**. 2012; 17875–879.

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

RABER J. Role of apolipoprotein e in anxiety. **Neural Plast**. 2007; p. 91236. Doi: 10.1155/2007/91236. PMID: 17710250. Disponível em:

RAGE, F. *et al.* Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. **Neuroscience**, 2002 [S.L.], v. 112, n. 2, p. 309-318. [Doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00072-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00072-6).

RAHMANI, A. *et al.* Uma revisão sistemática da associação entre fator neurotrófico derivado do cérebro sérico e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. **Rev Neurosci**. 2021; 32(1), p. 63-76. Doi: 10.1515/revneuro-2019-0087.

- RANG, DALE. **Farmacologia**. 7ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2012. p. 808.
- RAULO, A.; DANTZER, B. Associations between glucocorticoids and sociality across a continuum of vertebrate social behavior. **Ecology and Evolution**. v. 8, Issue 15, p. 7697-7716, 2018.
- RIDDER S. *et al.* Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. **J Neurosci**, 25(26), 6243-50, 2005.
- ROCHFORD, J. *et al.* Behavioral reactivity to aversive stimuli in a transgenic mouse model of impaired glucocorticoid (type II) receptor function: effects of diazepam and FG-7142. **Psychopharmacology**, 1997; 132, p. 145–152. Doi.org/10.1007/s002130050330.
- ROSEN, J. B. & SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychological Review**, 1998; 105(2), 325-350.
- ROSENKRANZ, J. A. Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. **Biol Psychiatry**. 2018; 83(10), p. 918-928. Doi: 10.1016/j.biopsych.2017.12.014.
- ROTH, T. L. *et al.* Epigenetic marking of the BDNF gene by early-life adverse experiences. **Hormones And Behavior**, 2011; [S.L.], v. 59, n. 3, p. 315-320. Doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.05.005.
- RUKSEE, N. *et al.* Melatonin pretreatment prevented the effect of dexamethasone negative alterations on behavior and hippocampal neurogenesis in the mouse brain. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, 2014; [S.L.], v. 143, p. 72-80. Doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.011.
- SAGUD, M. *et al.* Platelet serotonin and serum lipids in psychotic mania. **Journal Of Affective Disorders**, 97 (1-3), p. 247-251, 2007.
- SAMOCHOWIEC, J. *et al.* Association of a regulatory polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase A gene with antisocial alcoholism. **Psychiatry Res**, 86, p. 67-72, 1999.
- SARUBIN, N. *et al.* Association of polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene with major depressive disorder and antidepressant treatment response. **Neuropsychopharmacology**, 2012; 37(12), p. 2793-2799.
- SCHREUDER, M. M. *et al.* LDL cholesterol targets rarely achieved in familial hypercholesterolemia patients: A sex and gender-specific analysis. **Atherosclerosis**, 2023.
- SCHULTE-HERBRÜGGEN O, *et al.* Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function. **Psychoneuroendocrinology**. 31(10), 1266-77, 2006.
- SCOTT A. L. *et al.* Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation. **Neuroreport**, 19(7), p. 739-743, 2008.
- SEFTEL, H. C. *et al.* Prevalence of familial hypercholesterolemia in Johannesburg Jewes. **American Journal of Medical Genetics**, 34(4), p. 545-547, 1989.

- SHANKS, N. *et al.* Mouse strain differences in plasma corticosterone following uncontrollable footshock. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 1990; 36, 515-519.
- SHEPHERD, J. K. *et al.* Behavioural and pharmacological characterization of the elevated 'zero-maze' as an animal model of anxiety. **Psychopharmacol**, 1994; 116, p. 56-64.
- SHRIVASTAVA, S. *et al.* Chronic cholesterol depletion using statin impairs the function and dynamics of human serotonin(1A) receptors. **Biochemistry**, 2010; 49, p. 5426-5435.
- SIGWALT, A.R. *et al.* Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. **Neuroscience**, 2011; [S.L.], v. 192, p. 661-674. [Doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.075](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.075).
- SILVA, J.R. *et al.* BDNF como um jogador chave na modulação da neuroinflamação. **Journal of Neuroimmunology**, 2023; 400, 117982.
- SILVERMAN J. L. *et al.*, Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. **Nature Reviews Neuroscience**. 11, p. 490-502, 2010.
- SKUPIO, U. *et al.* Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: Relevance to depression. **Neuroscience**, v. 286, p. 141–150, 2015.
- SOBUS, A. *et al.* Trophic Factors in the Therapeutic Challenge Against ALS: current research directions. Update On Amyotrophic Lateral Sclerosis, [S.L.], p. 0-0, 14 set. 2016. **InTech**. <http://dx.doi.org/10.5772/63428>.
- SOMM, E. *et al.* Early Metabolic Defects in Dexamethasone-Exposed and Undernourished Intrauterine Growth Restricted Rats. **Plos One**, 2012; [S.L.], v. 7, n. 11, p. 1-1. Public Library of Science (PLoS).
- SPARKS, C. E.; SPARKS, J. D. Hepatic postprandial transition and very low-density lipoprotein biogenesis. 2013. **Current Opinion in Lipidology** 24(5):450-2. Doi: 10.1097/MOL.0b013e3283654ed0.
- SUÁREZ, B. M. Psychological issues and cognitive impairment in adults with familial hypercholesterolemia. **Family Practice**, 34(5), p. 520-524, 2017.
- SULAKHIYA, K. *et al.* Effect of *Beta vulgaris* Linn. leaves extract on anxiety- and depressive-like behavior and oxidative stress in mice after acute restraint stress. **Pharmacognosy Research**, 2016; [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1. [Doi.org/10.4103/0974-8490.171100](https://doi.org/10.4103/0974-8490.171100).
- SUNESON, K. *et al.* Low total cholesterol and low-density lipoprotein associated with aggression and hostility in recent suicide attempters. **Psychiatry Research**, 2019; [S.L.], v. 273, p. 430-434. [Doi.org/10.1016/j.psychres.2019.01.056](https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.01.056).
- SZCZEPANIK, J. C. **Investigação dos efeitos da cafeína sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas apresentadas por camundongos nocautes para o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015, 87 p. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/134787/334305.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 01 abr. 2021.

TALIAZ, D. *et al.* A resiliência ao estresse crônico é mediada pelo fator neurotrófico derivado do cérebro do hipocampo. **J Neurosci.** 2011; 31(12), p. 4475-4483. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.0967-11.2011.

TANG, C.; ORAM, J. F. O exportador celular de colesterol ABCA1 como protetor da vasculatura. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 2012; 23(3), 105-112.

TASKER JG, *et al.* Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. **Endocrinology.** 2006 Dec;147(12):5549-56. doi: 10.1210/en.2006-0981. Epub 2006 Aug 31. PMID: 16946006; PMCID: PMC3280589.

TENG, H. K. *et al.* ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75NTR and Sortilin. **The Journal Of Neuroscience**, 2005; [S.L.], v. 25, n. 22, p. 5455-5463. Society for Neuroscience.

TERAO, J. N. *et al.* Relationship between serum cholesterol levels and meta-chlorophenylpiperazine-induced cortisol responses in healthy men and women. **Psychiatry Res.**, 96, p. 167-173, 2000.

THIRUMANGALAKUDI, L. *et al.* High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. 2008. **Journal of Neurochemistry** 106(1):475-85. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05415.x.

TODATE, Y. *et al.* High Prevalence of Cerebral Small Vessel Disease on 7T Magnetic Resonance Imaging in Familial Hypercholesterolemia. **J. Atheroscler. Thromb.** 2019; 26:1045–1053. Doi: 10.5551/jat.48553.

TOTH, I., NEUMANN, I.D. Animal models of social avoidance and social fear. **Cell Tissue Res.** 354, 107–118, 2013.

TRINDADE, P. *et al.* As propriedades antioxidantes do BDNF no sistema nervoso central. **Free Radical Biology and Medicine**, 2021; 168, p. 284-296.

TRONCHE, F. *et al.* Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. **Nat Genet**, 1999; 23, p. 99–103. Doi.org/10.1038/12703.

TULI, J. S. *et al.* Effects of acute and chronic restraint on the adrenal gland weight and serum corticosterone concentration of mice and their faecal output of oocysts after infection with *Eimeria apionodes*. **Research In Veterinary Science**, 1995; [S.L.], v. 59, n. 1, p. 82-86. Doi.org/10.1016/0034-5288(95)90036-5.

UCHIDA, S. A. Papel do fator neurotrófico derivado do cérebro em distúrbios psiquiátricos e neurológicos. **Pharmacol Res Perspect.** 2018; 6(3), p. e00453. Doi: 10.1002/prp2.453.

UNEMURA, K. *et al.* Glucocorticoids Decrease Astrocyte Numbers by Reducing Glucocorticoid Receptor Expression In Vitro and In Vivo. **Journal Of Pharmacological Sciences**, 2012; [S.L.], v. 119, n. 1, p. 30-39. Doi.org/10.1254/jphs.12047fp.

USIFO, E. *et al.* Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Familial Hypercholesterolemia Variant Database: Update and Pathological Assessment. **Annals of Human Genetics**, 76(5), p. 387-401, 2012.

- VAEZI, Z.; AMINI, A. Familial Hypercholesterolemia. [Updated 2022 Sep 26]. *In*: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**; 2023 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556009/>. Acesso em: 13 jun. 2023.
- VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Increases in anxiety-like behavior induced by acute stress are reversed by ethanol in adolescent but not adult rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 2012; 100, p. 440–450.
- VIDEBECH, P.; RAVNKILDE, B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. **Am. J. Psychiatry**, 2004; 161 (11), p. 1957-1966.
- VIRKKUNEN, M. Serum cholesterol levels in homicidal offenders. A low cholesterol level is connected with a habitually violent tendency under the influence of alcohol. **Neuropsychobiology**, 1983; 10, p. 65-69.
- VIRKKUNEN, M. Serum cholesterol in antisocial personality. **Neuropsychobiology**, 1979; 5, p. 27-30.
- WAHLEY, R. W. Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 2016; 36:1305–1315. [Doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307023](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307023).
- WANG, H. H. *et al.*, Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances in Reverse Cholesterol Transport. **Annals of Hepatology**, Volume 16, Supplement 1, 2017, Pages S27-S42, ISSN 1665-2681. [Doi.org/10.5604/01.3001.0010.5495](https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5495).
- WANG, S. H. *et al.* LDL receptor knock-out mice show impaired spatial cognition with hippocampal vulnerability to apoptosis and deficits in synapses. **Lipids Health Dis**. 2014; 13, p.175. Doi: 10.1186/1476-511X-13-175.
- WHO – World Health Organization. Mental Health and COVID-19: Early evidence of the pandemic's impact, 2 mar. 2022.
- YAMADA, K. *et al.* Serum cholesterol levels in patients with panic disorders: a comparison with major depression and schizophrenia **Psychiatry Res.**, 102 (2), p. 153-162, 2001.
- YAMAURA, K. *et al.* Sex Differences in Stress Reactivity of Hippocampal BDNF in Mice are Associated with the Female Preponderance of Decreased Locomotor Activity in Response to Restraint Stress. **Zoological Science**, 2013; [S.L.], v. 30, n. 12, p. 1019-1024. Zoological Society of Japan. [Doi.org/10.2108/zsj.30.1019](https://doi.org/10.2108/zsj.30.1019).
- YANEVA-SIRAKOVA, T. *et al.* Neurotrophins in carotid atherosclerosis and stenting. **Annals Of Medicine**, 2023; [S.L.], v. 55, n. 1, p. 335-341. [Doi.org/10.1080/07853890.2022.2163052](https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2163052).
- YEHUDA, R. *et al.*, 1995. Low urinary cortisol excretion in Holocaust survivors with posttraumatic stress disorder. **Am. J. Psychiatry**, 1995; 152 (7), p. 982-986.
- ZADELAAR, S. *et al.* Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 27(8), p. 1706-1721, 2007.
- ZAMBÓN, D. *et al.* Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **American Journal of Medicine**, 123(3), p. 267-274, 2010.
- ZHANG, J. *et al.* Dietary Hypercholesterolemia Induces Neuroinflammation and Dysfunction of the Cholinergic and Glutamatergic Systems in the Hippocampus. **Brain Res**. 2017; 1654(Pt A), p.1-10. Doi: 10.1016/j.brainres.2016.10.021.

ZHANG, J.; LIU, Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. **Protein & Cell**, Volume 6, Issue 4, April 2015, Pages 254–264. [Doi.org/10.1007/s13238-014-0131-3](https://doi.org/10.1007/s13238-014-0131-3).

ZHENG, F. *et al.* A ativação do receptor 5-HT_{2A} da serotonina suprime a sensibilização comportamental e as deficiências motoras induzidas por 6-hidroxidopamina através da via GSK3 β -Nrf2-HO-1 em roedores. **Front Pharmacol.** 2017; 8, p. 735. Doi: 10.3389/fphar.2017.00735.

ZHOU, X.F. *et al.* Distribution and localization of pro-brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the peripheral and central nervous system of the adult rat. **J. Neurochem.**, 2004; 91, p. 704-715.

ZIMMERMANN, E.; CRITCHLOW, V. Effects of Diurnal Variation in Plasma Corticosterone Levels on Adrenocortical Response to Stress. *Anais da Sociedade de Biologia Experimental e Medicina.* 1967;125(2), p. 658-663. Doi:[10.3181/00379727-125-32172](https://doi.org/10.3181/00379727-125-32172).

ZUCCATO, C.; CATTANEO, E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurol.** 2009; 5(6), p. 311-22. Doi:10.1038/nrneurol.2009.54.