

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DIETA ACRESCIDA DE COLESTEROL EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

ALUNA: SUÉLYN KOERICH

**BELO HORIZONTE
2022**

SUÉLYN KOERICH

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DIETA ACRESCIDA DE COLESTEROL EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

**Tese apresentada ao curso de Pós-graduação
em Ciências Biológicas – Fisiologia e
Farmacologia, da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do Grau de Doutor em Ciências
Biológicas, Área de Concentração:
Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

**BELO HORIZONTE
2022**

043

Koerich, Suélyn.

Avaliação dos efeitos de dieta acrescida de colesterol em modelos experimentais da Doença de Alzheimer [manuscrito] / Suélyn Koerich. – 2022. 95 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Doença de Alzheimer. 3. Colesterol. 4. Disfunção Cognitiva. 5. Metabolismo. 6. Peptídeos beta-Amiloides. I. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 361 DE SUÉLYN KOERICH

"Avaliação dos Efeitos de Dieta Acrescida de Colesterol
em Modelos Experimentais da Doença de Alzheimer"

SUÉLYN KOERICH

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **28 de setembro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra, FCA/UNICAMP
Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, ICB/UFMG
Prof. Dr. Rafael Pinto Vieira, ICB/UFMG
Profa. Dra. Soraya Wilke Saliba, Universidade de Freiburg - Alemanha
Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 28 de setembro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 30/09/2022, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Isaura Alvarez Leite, Professora do Magistério Superior**, em 30/09/2022, às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dennys Esper Correa Cintra, Usuário Externo**, em 30/09/2022, às 18:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraya Wilke Saliba, Usuária Externa**, em 01/10/2022, às 09:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Pinto Vieira, Professor do Magistério Superior**, em 02/10/2022, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1785382** e o código CRC **169B9872**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA TESE N° 361 DE SUÉLYN KOERICH

Às 14:00 horas do dia 28 do mês de setembro de 2022, transmitida pela plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Suélyn Koerich**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra**, FCA/Universidade Estadual de Campinas, **Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Rafael Pinto Vieira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Soraya Wilke Saliba**, Universidade de Freiburg - Alemanha, e **Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Avaliação dos Efeitos de Dieta Acrescida de Colesterol em Modelos Experimentais da Doença de Alzheimer**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 28 de setembro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 30/09/2022, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Isaura Alvarez Leite, Professora do Magistério Superior**, em 30/09/2022, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dennys Esper Correa Cintra, Usuário Externo**, em 30/09/2022, às 18:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraya Wilke Saliba, Usuária Externa**, em 01/10/2022, às 09:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Pinto Vieira, Professor do Magistério Superior**, em 02/10/2022, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1785365** e o código CRC **B5136D45**.

AGRADECIMENTOS

Inúmeras pessoas fizeram parte dessa caminhada, as quais sou muito grata, e gostaria de registrar aqui meu agradecimento especial:

Ao professor Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, pela amizade e por sempre estar com a porta da sala aberta, disposto a me ouvir e trocar ideias, contribuindo de forma única para minha formação.

Aos professores Dr. Helton José Reis e Dra. Luciene Bruno Vieira, pelo acolhimento no laboratório de Neurofarmacologia.

À Dra. Natália Pessoa Rocha, pela oportunidade oferecida, pela orientação e por todo aprendizado em tão pouco tempo.

Às professoras Dra. Jacqueline Alvarez Leite, Dra. Fabíola Mara Ribeiro, Dra. Dra. Cláudia Ferreira, Dra. Aline Miranda, e aos colegas Dr. Wesley Fernandes Braga, Dr. Leonardo de Oliveira Guarnieri, Dr. Emerson Fonseca, Dra. Heliana de Barros Fernandes e Dra. Toniana pelas colaborações que tornaram possível a realização de vários experimentos de minha tese.

Aos colegas de laboratório, Anna Luiza, Roberta, Gabriela Lopes, Gabriela Oliveira, Carla e Paula, pela colaboração no meu trabalho e por terem tornado meus dias melhores. Em especial, ao colega e amigo Giovanni, que me ajudou e ensinou incontáveis vezes.

Aos alunos de iniciação científica, Maria Luiza, Gabriela Reis, Barbara, Beatriz, Mariana e Pedro, por toda ajuda e amizade.

Aos colegas do laboratório Soto, na Universidade do Texas, Olivia e Nicolas, pelos compartilhamentos, paciência e amizade.

Ao Rodrigo, meu amor e amigo, que sempre esteve ao meu lado, mesmo à distância, me dando força e compartilhando comigo meus sonhos.

À minha mãe, exemplo de força, fé e amor, sempre me colocando nas suas orações e me dando força, procurando ajudar a solucionar meus problemas.

Ao meu pai, exemplo de dedicação e honestidade, pelo carinho, amor e exemplo.

Ao meu irmão Henrique e minha cunhada Édina, pelo apoio e carinho.

Aos meus sobrinhos, Joaquim e Bento, amores da minha vida, que mesmo sem entenderem, me deram força e foram meu momento de alegria em muitos dias difíceis.

A Deus, por me dar força e coragem, mesmo na minha pouca fé.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo 310347/2018-À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Processo APQ-02559-17) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Código de Financiamento 001) pelo suporte financeiro para realização desse projeto.

“De todas as belezas, coragem.”

Allê Barbosa

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é a principal doença neurodegenerativa relacionada à idade, e, apesar de sua relevância, os mecanismos patofisiológicos não são completamente conhecidos. Recentemente, foi sugerido que a homeostase do colesterol está envolvida na fisiopatologia da DA. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de uma dieta acrescida de colesterol em modelos experimentais da DA. Para isso, camundongos machos C57BL/6, com idade de 8 semanas, foram tratados com dieta acrescida de 1,25% de colesterol ou dieta controle por quatro meses, e, em seguida, receberam microinjeção intrahipocampal de $A\beta_{1-42}$ (400 pmol) ou solução salina estéril. Adicionalmente, avaliamos os efeitos da dieta no modelo transgênico para DA. Animais APP/PS1 machos e fêmeas, com 10 meses de idade, foram tratados durante quatro meses com dieta acrescida de colesterol 1,25% ou dieta controle. Para avaliação cognitiva, utilizamos o teste de reconhecimento de objeto novo (TRO) em todos os modelos animais. Além disso, avaliamos a viabilidade neuronal, a microgliose e a marcação de placas amiloides no hipocampo de animais APP/PS1 machos. Ademais, avaliamos os efeitos da dieta sobre parâmetros periféricos. Demonstramos que uma dieta acrescida de colesterol foi capaz de impedir o comprometimento cognitivo induzido pela microinjeção intrahipocampal de $A\beta_{1-42}$ e de melhorar o comprometimento cognitivo em animais APP/PS1. Esse efeito nos animais APP/PS1 foi acompanhado por uma redução na marcação de placas amiloides e na microgliose hipocampal. Além disso, não houve alteração de peso, índice de adiposidade, e níveis séricos de colesterol total e triglicérides. Por fim, o colesterol na dieta aumentou a razão peso do fígado/peso corporal e a concentração de lipídeos totais hepáticos, além de diminuir a atividade da SOD no modelo de microinjeção intrahipocampal. Em conjunto, esses resultados demonstram que animais alimentados apenas com colesterol, sem acréscimo de gordura à dieta, apresentam uma melhora cognitiva, especialmente aquela que depende do funcionamento hipocampal. Essa melhora poderia estar associada tanto à redução da deposição de placas quanto da microgliose. Apesar do mecanismo não ter sido estabelecido, pode-se sugerir que o metabolismo do colesterol é um fator importante para o desenvolvimento da DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, colesterol, $A\beta$, comprometimento cognitivo, metabolismo

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common age-related neurodegenerative disease and, despite its relevance, the pathophysiological mechanisms are not completely understood. Recently, it has been suggested that cholesterol homeostasis is involved in the pathophysiology of AD. Thus, the aim of the present study was to investigate the effects of a diet on increased cholesterol in experimental models of AD. For this, male C57BL/6 mice, aged 8 weeks, were treated with a diet plus 1.25% cholesterol or a control diet for four months, and then received intrahippocampal microinjection of A β 1-42 (400 pmol) or sterile saline solution. Additionally, we evaluated the effects of diet in the transgenic model for AD. Male and female APP/PS1 animals, 10 months of age, were treated for four months with a diet plus 1.25% cholesterol or a control diet. For cognitive assessment, we used the novel object recognition test (ORT) in all animal models. In addition, we evaluated neuronal viability, microgliosis, and labeling of amyloid plaques in the hippocampus of male APP/PS1 animals. Furthermore, we evaluated the effects of diet on peripheral parameters. We demonstrated that a diet supplemented with cholesterol was able to prevent cognitive impairment induced by intrahippocampal microinjection of A β 1-42 and to improve cognitive impairment in APP/PS1 animals. This effect in APP/PS1 animals was accompanied by a reduction in amyloid plaque labeling and hippocampal microgliosis. In addition, there was no change in weight, adiposity index, and serum levels of total cholesterol and triglycerides. Finally, dietary cholesterol increased the liver weight/body weight ratio and the concentration of total hepatic lipids, in addition to decreasing SOD activity in the intrahippocampal microinjection model. Taken together, these results demonstrate that animals fed only with cholesterol, without adding fat to the diet, show cognitive improvement, especially that which depends on hippocampal functioning. This improvement could be associated with both the reduction of plaque deposition and microgliosis. Although the mechanism has not been established, it can be suggested that cholesterol metabolism is an important factor in the development of AD.

KEYWORDS: Alzheimer's disease, cholesterol, A β , cognitive impairment, metabolism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Clivagem da APP e formação do A β e placas amiloides.....	18
Figura 2: Microdomínio da membrana plasmática - “ <i>Lipid rafts</i> ”	25
Figura 3: Local de implantação da cânula guia.....	32
Figura 4: Linha do tempo experimental do protocolo 24 h em animais C57BL/6.....	33
Figura 5: Linha do tempo experimental do protocolo 7 d em animais C57BL/6.....	33
Figura 6: Linha do tempo experimental do tratamento com dieta acrescida de colesterol em animais APP/PS1, machos.....	34
Figura 7: Linha do tempo experimental do tratamento com dieta acrescida de colesterol em animais APP/PS1, fêmeas.....	35
Figura 8: Tarefa de reconhecimento de objeto em animais C57BL/6 que receberam dieta controle ou colesterol, seguido de microinjeção de PBS ou A β ₁₋₄₂	43
Figura 9: Tarefa de reconhecimento de objeto em animais APP/PS1 e WT, machos (A) e fêmeas (B) que receberam dieta controle ou colesterol.....	45
Figura 10: Efeitos do tratamento com colesterol sobre a imunomarcção por NeuN no hipocampo de animais APP/PS1 ou WT, machos.....	46
Figura 11: Efeito do tratamento com colesterol sobre a expressão de mRNA de PSD-95 e Sintaxina 1A em hipocampo de animais APP/PS1 machos.....	47
Figura 12: Efeito do colesterol na dieta sobre a imunomarcção de placas amiloides.....	48
Figura 13: Efeito do colesterol sobre as concentrações de fatores neurotróficos no hipocampo de animais APP/PS1 ou WT machos.....	49
Figura 14: Efeito do colesterol sobre as concentrações de fatores neurotróficos no hipocampo de animais APP/PS1 ou WT fêmeas.....	50
Figura 15: Efeito do colesterol sobre as concentrações de fatores neurotróficos no hipocampo animais C57BL/6 machos, submetidos ao protocolo de injeção de 7 d.....	51
Figura 16: Efeito do colesterol sobre a microgliose no hipocampo de animais APP/PS1 e WT.....	52
Figura 17: Efeito do colesterol sobre as concentrações de citocinas no hipocampo de animais APP/PS1 ou WT machos.....	53
Figura 18: Efeito do colesterol sobre as concentrações de citocinas no hipocampo de animais APP/PS1 ou WT fêmeas.....	54
Figura 19: Efeito do colesterol sobre as concentrações de citocinas no hipocampo de animais C57BL/6 machos, submetidos ao protocolo de injeção de 7 d.....	55
Figura 20: Efeito do colesterol sobre o peso corporal e índice de adiposidade de animais APP/PS1 ou WT, machos e fêmeas.....	56
Figura 21: Efeito do colesterol sobre o peso corporal e índice de adiposidade de animais C57BL/6, submetidos ao protocolo de injeção Protocolo 24 h e 7 d.....	57
Figura 22: Níveis séricos de colesterol em animais que receberam dieta controle ou acrescida de colesterol, APP/PS1 ou WT, machos e C57BL/6 dos protocolos 24 h e 7 d.....	58
Figura 23: Níveis séricos de triglicérides em animais que receberam dieta controle ou acrescida de colesterol, APP/PS1 ou WT, machos e C57BL/6 dos protocolos 24 h e 7 d	59
Figura 24: Efeito do colesterol sobre a razão peso do fígado/peso corporal de animais APP/PS1 ou WT, machos e fêmeas e C57BL/6 dos protocolos 24 h e 7 d.....	60
Figura 25: Níveis de lipídeos totais hepáticos de animais APP/PS1 ou WT, machos e fêmeas e C57BL/6 dos protocolos 24 h e 7 d.....	60
Figura 26: Concentração de colesterol hepático de animais APP/PS1 ou WT, machos e fêmeas e C57BL/6 dos protocolos 24 h e 7 d	61
Figura 27: Concentração de triglicérides hepáticos de animais APP/PS1 ou WT, machos e fêmeas e C57BL/6 dos protocolos 24 h e 7 d.....	62
Figura 28: Atividade dos marcadores do estresse oxidativo no fígado de animais APP/WT machos...63	
Figura 29: Atividade dos marcadores do estresse oxidativo no fígado de animais APP/WT fêmeas....64	

Figura 30: Atividade dos marcadores do estresse oxidativo no fígado de animais C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de injeção 24 h.....	65
Figura 31: Atividade dos marcadores do estresse oxidativo no fígado de animais C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de injeção 7 d.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas experimentais (g/kg de dieta)	30
Tabela 2: Resumo de experimentos realizados com cada grupo de animais experimentais.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

24-OH: 24-hidroxicolesterol

27-OH: 27-hidroxicolesterol

Acetil-Coa: acetilcoenzima A

AChE: Acetilcolinesterase

APOE: apolipoproteína E

APP: amyloid precursor protein (proteína precursora de amiloide)

A β – amiloide-beta

BACE-1: beta-secretase 1

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE – barreira hematoencefálica

CA: Campo aberto

CA3: Corno de Ammon - região 3

CAT: catalase

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DA – doença de Alzheimer

DAB: diaminobenzidino

DO – densidade óptica

ERO: espécie reativa do oxigênio

GD – giro denteado do hipocampo

GDNF: fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais

IFN- - interferon gama

IL-10 – interleucina 10

IL-1 β – interleucina-1 beta

IL-2 – interleucina 2

IL-4 – interleucina 4

LDL: lipoproteína de baixa densidade

IL-6 – interleucina 6

LRP1: proteína 1 relacionada ao receptor de LDL

PBS – tampão fosfato salina

PFA 4 % - paraformaldeído 4 %

PS1 – presenilina 1

PS2 – presenilina 2

PSD-95 – proteína de densidade pós-sináptica 95

PSEN: presenilina

RT-qPCR: PCR quantitativo em tempo real

SNC – sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBST – tampão tris salina tween

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TPEF: fluorescência excitada por dois fótons

TRO – tarefa de reconhecimento de objeto novo

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

WT: wild type (selvagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Doença de Alzheimer: aspectos gerais	16
1.2 Colesterol e a Doença de Alzheimer	21
1.3 Síntese e metabolismo do colesterol	23
1.4 Colesterol e o Sistema Nervoso Central	24
1.5 Modelos experimentais para o estudo da hipercolesterolemia.....	26
1.6 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	28
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Animais	30
3.2 Dieta.....	30
3.3 Cirurgia estereotáxica.....	31
3.4 Modelos de neurotoxicidade induzida por microinjeção intrahipocampal de A β ₁₋₄₂	32
3.4.1 Modelo agudo de injeção de A β ₁₋₄₂ (Protocolo 24 horas)	32
3.4.2 Modelo crônico de injeção de A β ₁₋₄₂ (Protocolo 7 dias)	33
3.5 Animais APP/PS1	34
3.6 Tarefa de reconhecimento de objeto novo (TRO).....	35
3.7 Campo aberto (CA)	35
3.8 Imunohistoquímica	36
3.9 Aquisição, análise e processamento das imagens	36
3.10 Marcação da placa amiloide e identificação por microscopia de excitação por dois fótons	37
3.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	37
3.12 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	37
3.13 Peso corporal, coleta de sangue, perfusão intracardíaca, preparo dos cérebros para técnicas histológicas e bioquímicas, índice de adiposidade e peso do fígado	38
3.14 Dosagem sérica de colesterol e triglicerídeos.....	39
3.15 Dosagens Hepáticas	39
3.15.1 Determinação de lipídeos totais	39
3.15.2 Determinação dos níveis de colesterol.....	39
3.15.3 Determinação dos níveis de triglicerídeos.....	40
3.15.4 Medida indireta da peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	40

3.15.5 Atividade da catalase <i>in vitro</i>	40
3.15.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	41
3.16 Análise estatística	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Efeitos da dieta acrescida de colesterol sobre a memória	43
4.1.1 Colesterol previne o déficit cognitivo induzido por A β ₁₋₄₂	43
4.1.2 Colesterol melhora o déficit cognitivo em animais APP/PS1	44
4.2 Efeito do colesterol sobre a imunomarcação por NeuN	45
4.2.1 Tratamento com colesterol não alterou a expressão de NeuN no hipocampo de animais APP/PS1 machos	45
4.3 Efeito do colesterol sobre a plasticidade sináptica.....	46
4.3.1 Colesterol na dieta não alterou a expressão de sintaxina 1A e PSD-95 no hipocampo	Error! Bookmark not defined.
4.4 Efeito do colesterol sobre a imunomarcação por ThioS.....	46
4.4.1 Colesterol reduz a marcação de placas no hipocampo de animais APP/PS1 machos.....	Error! Bookmark not defined.
4.5 Efeito do colesterol sobre a concentração de fatores neurotróficos	47
4.5.1 Colesterol alterou a concentração de fatores neurotróficos no hipocampo.....	47
4.6 Efeito do colesterol sobre a imunomarcação por Iba-1	50
4.6.1 Colesterol reduziu a microgliose no hipocampo de animais APP/PS1 machos	50
4.7 Efeito do colesterol sobre a concentração de citocinas	51
4.7.1 Colesterol alterou a concentração citocinas no hipocampo	51
4.8 Efeitos do colesterol sobre o peso e adiposidade corporal	55
4.8.1 Colesterol não altera o peso corporal e índice de adiposidade dos animais.....	55
4.9 Efeito do colesterol sobre os lipídeos no soro.....	56
4.9.1 Colesterol acrescido à dieta não aumentou níveis de colesterol total.....	56
4.9.2 Colesterol acrescido à dieta alterou níveis de triglicerídeos no soro	57
4.10 Efeitos da dieta sobre o fígado	58
4.10.1 Colesterol acrescido à dieta aumenta a razão peso do fígado/peso corporal.....	58
4.10.2 Dieta acrescida de colesterol aumenta a quantidade de lipídeos totais no fígado	59
4.10.3 Dieta acrescida de colesterol aumenta a concentração de colesterol hepático ..	60
4.10.4 Dieta acrescida de colesterol aumenta a concentração de triglicerídeos no fígado	61
4.10.5 Efeito do colesterol sobre os marcadores do estresse oxidativo no fígado.....	62
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÃO	75

7. REFERENCIAS	76
8. ANEXOS.....	90

INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer: aspectos gerais

A doença de Alzheimer (DA) é a principal doença neurodegenerativa relacionada a idade, de etiologia complexa, multifatorial e irreversível (JOREMIC et al., 2021), que afeta aproximadamente 46 milhões de pessoas em todo o mundo, de acordo com o Relatório Mundial de Alzheimer de 2015 (SENGUPTA et al., 2016). É também a forma mais prevalente de demência, sendo responsável por 60 a 80 % dos casos dessa condição (COLOVIC et al., 2013; KNOWLES et al., 2013). A demência é caracterizada por declínio cognitivo, funcional e comportamental progressivos, que impactam na independência e no convívio social (MOHAMMAD et al., 2017; REEVE et al., 2017). Dentre os sintomas de demência estão a perda de memória, o prejuízo de raciocínio e julgamento, e a dificuldade de comunicação (REEVE et al., 2017).

A DA é caracterizada por vários marcadores neuropatológicos, incluindo placas extracelulares de β -amiloide ($A\beta$), emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFTs), inflamação, comprometimento sináptico e perda neuronal, que leva ao comprometimento cognitivo e mudanças de personalidade (QUERFURTH; LAFERLA, 2010; O' NEILL, 2013; GOEDERT; SPILLANTINI, 2006).

Mais de 95 % dos casos de DA é esporádico, de início tardio (acima de 65 anos), enquanto uma pequena parcela dos casos é conhecida como DA familiar de origem precoce (REITZ et al., 2020). A doença ainda é uma condição de etiologia desconhecida, que possivelmente resulta da combinação de fatores genéticos e ambientais (BALIN; HUDSON, 2014; DORSZEWSKA et al., 2016). Dentre os fatores de risco esporádicos estão a baixa escolaridade (LEE et al., 2008; NITRINI et al., 2009), o consumo de álcool e o tabagismo (ZHOU et al., 2014; CATALDO; PROCHASKA; GLANTZ, 2010), as doenças cardiovasculares, o diabetes, a obesidade, e o sedentarismo (RABINOVICI, 2019; EDWARDS III, 2019, YAN et al., 2020). Apesar disso, o envelhecimento é o principal fator de risco (CARONE; ASGHARIAN; JEWELL, 2014; SONG; MITNITSKI; ROCKWOOD, 2014). De fato, a incidência aumenta exponencialmente entre 65 e 85 anos, dobrando a cada 5 anos. Muitos estudos indicam que aos 85 anos, a prevalência está entre 30 % e 40 % (DE BRUIJN; IKRAM, 2014; IMTIAZ et al., 2014; JOREMIC et al., 2021). Apesar da maioria dos casos tardios de DA serem esporádicos, componentes genéticos podem estar associados a uma parte dos casos dessa forma da doença. Por exemplo, a expressão da apolipoproteína E (ApoE) 4 é o fator de risco genético mais prevalente para incidência tardia da DA (CARMONA; HARDY; GUERREIRO, 2018; BAGYINSZKY et al., 2014). O alelo ApoE* ϵ 4 confere um risco aumentado e o alelo ApoE* ϵ 2 confere um risco diminuído, em relação ao alelo comum ApoE* ϵ 3 (YAMAZAKI et al.,

2019; RAICHLLEN et al., 2014), embora diferentes populações tenham diferenças significativas no risco e nas interações com o sexo (FINCH; SAPOLSKY, 1999).

A doença também pode se manifestar antes dos 65 anos de idade, caracterizando a DA de início precoce (KUNKLE et al., 2017; LANOISELEE et al., 2017). Apesar de ocorrerem casos esporádicos antecedendo essa idade, a maioria dos casos de DA de início precoce está associado com mutações genéticas (MENDEZ, 2017). A maior parte das mutações com essa forma da doença ocorre em genes que codificam a proteína precursora de amiloide (APP, *amyloid precursor protein*), e a presenilina (PSEN) -1 ou a PSEN-2 (SIMS et al., 2020).

Os estudos nessa área investigam principalmente a neurotoxicidade induzida pelos peptídeos A β e pelos emaranhados neurofibrilares contendo tau hiperfosforilada (MURPHY, LEVINE et al., 2010; RAMPEL et al., 2021). O A β é um peptídeo derivado da APP, cujas funções normais estão envolvidas com transdução de sinais, alongamento axonal, adesão e migração celular, transporte de proteínas e sinaptogênese (GRIMM et al., 2013; JIANG et al., 2014; ROBINSON et al., 2014). A proteína tau é uma fosfoproteína que, em condições normais, está localizada nos axônios, atuando na estabilização dos microtúbulos (MOKHTAR et al., 2013).

As espécies de amiloide são produzidas a partir da quebra de APP através de duas vias: a) a via não-amiloidogênica, que é realizada pela enzima α -secretase γ -secretase, gerando o fragmento solúvel da APP, não prejudicial ao cérebro; ou b) a via amiloidogênica, na qual a clivagem da APP é realizada pelas enzimas β -secretase e γ -secretase que gera espécies β -amiloide (Figura 1) (GRIMM et al., 2013; JIANG et al., 2014; MOKHTAR et al., 2013; ROBINSON et al., 2014). Além do mais, peptídeos A β podem ter, mais frequentemente, 40 ou 42 resíduos, sendo que o peptídeo 1-40 (A β ₁₋₄₀) é o mais prevalente e o 1-42 (A β ₁₋₄₂) é o mais neurotóxico. A γ -secretase possui como componentes catalíticos as PS1 e PS2 e é esse componente que determina o comprimento do A β (PENKE et al., 2017). Por fim, as espécies de A β tem alta capacidade de agregação, favorecendo a formação de oligômeros neurotóxicos e a deposição do peptídeo na forma de placas senis (JIANG et al., 2014), o que pode desencadear comprometimento sináptico e cognitivo presentes na DA (O' NEILL, 2013).

Conjuntos distintos de A β foram encontrados no cérebro humano, incluindo fibrilas amiloides e alguns oligômeros específicos. É amplamente aceito que os oligômeros A β são neurotoxinas mais potentes do que as fibrilas amiloides (KAGEYAMA et al., 2018). No entanto, não há um consenso geral sobre quais oligômeros são os mais significativos na fisiopatologia da DA nem, de fato, sobre o número total de tipos de A β produzidos no cérebro (BENILOVA et al., 2012; WANG et al., 2016).

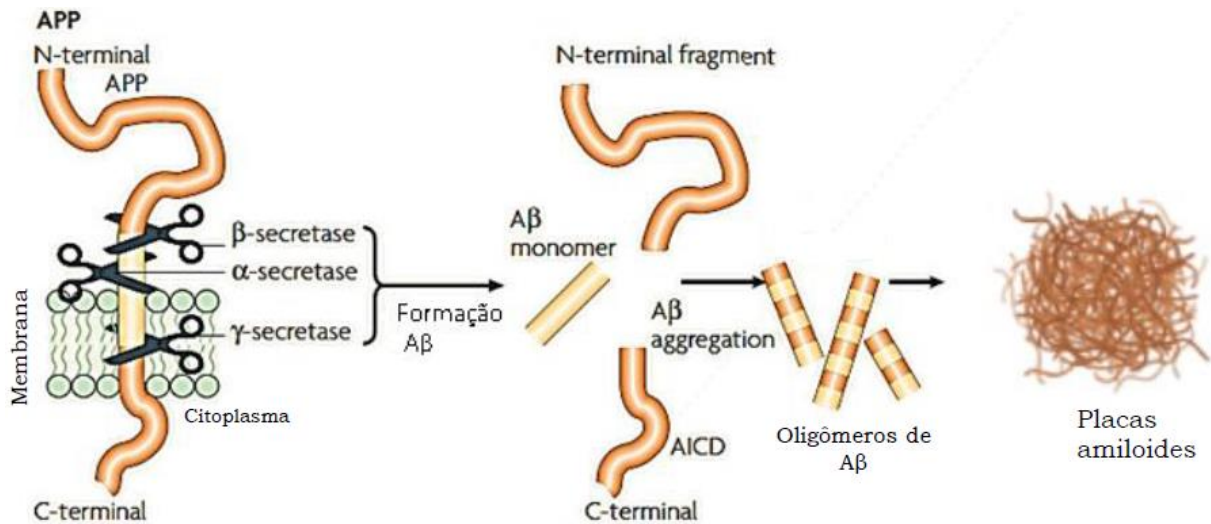


Figura 1: Clivagem da APP e formação do A β e placas amiloides. Fonte: Modificado de GOTZ; ITNER, 2008.

Até o momento, a hipótese da cascata amiloide é a mais utilizada e aceita para explicar as alterações neuropatológicas observadas na DA (GRIMM et al., 2013; HAMILTON et al., 2014; JIANG et al., 2014; KUMAR et al., 2015; ROBINSON et al., 2014). De fato, durante muitos anos, as placas amiloides foram consideradas o achado patofisiológico decisivo para a caracterização e desenvolvimento da DA. Contudo, diversas evidências sugerem que estas placas se correlacionam fracamente com o declínio cognitivo observado na doença (McLEAN et al., 1999; NASLUND et al., 2000). Neste sentido, a hipótese da cascata amiloide foi aprimorada ao longo dos anos, propondo um mecanismo alternativo de perda de memória baseado no impacto de oligômeros pequenos e solúveis do peptídeo nas sinapses neuronais (HAASS; SELKOE, 2007; FERREIRA; KLEIN, 2011; OW; DUNSTAN, 2014; RENNEN et al., 2010), na interação do peptídeo com receptores microgliais, gerando neuroinflamação, bem como acredita-se que o A β causa peroxidação lipídica e a produção de várias espécies reativas de oxigênio (EROs) (OW; DUNSTAN, 2014).

Outro marcador clássico da doença, a proteína tau hiperfosforilada (LEE et al., 2001; SPILLANTINI; GOEDERT, 2013), leva a formação de inclusões nos corpos celulares e processos dendríticos, aos quais a proteína se agrega formando os emaranhados neurofibrilares (MOKHTAR et al., 2013). Acredita-se que as alterações iniciais presentes na DA possivelmente são decorrentes das interações entre a proteína tau e o A β (MOKHTAR et al., 2013; BLOOM, 2014), resultando em perda sináptica, morte neuronal e atrofia cerebral (KOCAHAN; DOGAN, 2017; LAZZARI et al., 2015). A diminuição da densidade sináptica observada na DA se correlaciona com o aparecimento dos déficits cognitivos (BROUILLETTE, 2014), bem como o grau de declínio cognitivo se correlaciona com a extensão da perda

sináptica, especialmente nas regiões que são responsáveis pela formação e armazenamento de novas informações (SELKOE, 2002).

A desregulação da sinalização do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) também contribui para as alterações neuropatológicas observadas na DA (GIUFFRIDA et al., 2018). Essa neurotrofina é amplamente expressa no sistema nervoso central (SNC) que, através da ativação de seu receptor de tirosina-quinase B (TrkB), desempenha um papel crucial na sobrevivência e diferenciação celular, alongamento axonal, crescimento dendrítico e plasticidade sináptica, necessários para aquisição e consolidação da memória. Na DA há alterações nos níveis e na expressão de BDNF por ação do A β (SONG; YU; TAN, 2015; TANQUEIRO et al., 2018). Além disso, o fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF), também possui expressão aumentada no cérebro de pacientes com DA (CHIAVELLINI et al., 2022) e pode estar relacionado à deterioração cognitiva observada nesses pacientes (BUDNI et al., 2015).

O desenvolvimento de novos fármacos têm altas taxas de insucesso (JOREMIC et al., 2021). Embora seja foco de pesquisa há décadas, ainda falta um tratamento eficaz para combater a degeneração progressiva dos neurônios e a amnésia anterógrada em pacientes com DA (KHOURY; GROSSBERG, 2020). As principais terapias em desenvolvimento, até o momento, são imunoterapias anti-amiloide, inibidores de β e γ -secretase, e terapias que possuem como alvo a tau (KHOURY et al., 2017). A maioria dos ensaios clínicos falharam, provavelmente porque a abordagem terapêutica tenha sido direcionada para o alvo errado (MEHTA et al., 2017), ou pelo fato de a intervenção ter como alvo apenas um dos fatores dessa doença multifatorial (CASTELLO; SORAINO, 2013; EDWARDS III et al., 2019).

O tratamento farmacológico utilizado atualmente na doença é representado, fundamentalmente, pela memantina (bloqueador de baixa afinidade do canal aberto de Ca²⁺ dos receptores N-metil-D-aspartato [NMDA]) e por inibidores reversíveis da enzima acetilcolinesterase (AChE), que engloba 3 fármacos aprovados para uso: donepezila, rivastigmina e galantamina (KHOURY; RAJAMANICKAM; GROSSBERG, 2018; TELL; HILGEROTH, 2013; GRUTZENDLER; MORRIS, 2001). Apesar desses fármacos proporcionarem uma melhora dos sintomas clínicos, possuem eficácia moderada (GONG et al., 2022) e não existem evidências de que apresentem propriedades de modificar o curso da doença (ELETI, 2016).

Outro fator que parece contribuir para a progressão da DA é a inflamação (WANG, WEN YING et al., 2015; WYSS-CORAY; MUCKE, 2002). Em pacientes com DA, já foi demonstrado que há um aumento na produção basal de citocinas por células mononucleares periféricas, em comparação com indivíduos idosos sem diagnóstico de DA (ROCHA et al., 2012). Tanto as citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1 β , IL-18, e IL-33, quanto as anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-13 (MORIMOTO et al., 2011; CHIAVELLINI et al., 2022),

possuem expressão aumentada no cérebro de pacientes com DA. Além disso, algumas citocinas e moléculas relacionadas a elas, como o antagonista de receptor IL-1 (IL-1Ra, *IL-1 receptor antagonist*), a enzima conversora de IL-1 (ICE, *IL-1 converting enzyme*), IL-2, IL-6, IL-8, o fator de necrose tumoral α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*), o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF, *macrophage-colony stimulating factor*) e o fator de transformação do crescimento β 1 (TGF- β 1, *transforming growth factor β 1*), estão aumentadas em estágios que precedem os primeiros sintomas da doença (WILBERDING et al., 2008).

O ligante 1 da quimiocina CX3C (CX3CL1, também denominado fractalquina) desempenha um papel importante na redução da neuroinflamação e é altamente expresso nas principais áreas de alterações patológicas na DA, como hipocampo e córtex cerebral (STROBEL et al., 2015). No cérebro adulto, o CX3CL1, desempenha um papel neuroprotetor, por reduzir a neurotoxicidade e a ativação microglial (CHEN et al., 2016; MECCA et al., 2018). A ativação das células microgliais ocorre quando os níveis de CX3CL1 diminuem, por exemplo, no hipocampo de ratos idosos (LYONS et al., 2009). Essas observações evidenciam que o processo inflamatório, assim como sua modulação, são processos fundamentais para a compreensão da doença.

Também sabemos que há uma importante sinalização em via de mão dupla entre o encéfalo e a periferia, de modo que mediadores inflamatórios (ex. TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) produzidos na periferia podem cruzar a barreira hematoencefálica (BHE) (AMOR; NICOLA, 2014). Além disso, células periféricas podem adentrar o SNC e patrulhar o parênquima cerebral em condições patológicas ou não patológicas (BROCHARD et al., 2009; ENGELHARDT; RANSOHOFF, 2005; HICKEY; HSU; KIMURA, 1991; RANSOHOFF; ENGELHARDT, 2012).

No sistema nervoso central, a resposta imunológica e a inflamação são, inicialmente, mediadas por diferentes células da glia, em especial pela micróglia (MORIMOTO; NAKAJIMA, 2019; RANSOHOFF; BROWN, 2012), considerada o componente mais importante da resposta imune inata (HENEKA, 2014). As células microgliais possuem inúmeras funções no SNC, como a manutenção da homeostase tecidual, da integridade e plasticidade neuronal e da plasticidade sináptica (AKIYOSHI et al., 2018; LEE, EUNBEOL; CHUNG, 2019). O A β pode interagir com diferentes receptores microgliais, induzindo essas células a um estado inflamatório (BAMBERGER et al., 2003; OW; DUNSTAN, 2014) e o estágio da DA pode ser determinante para o papel protetor ou prejudicial da ativação da micróglia na progressão da doença (KRABBE et al., 2013). Além disso, a micróglia pode remover e degradar o A β , reduzindo assim a sua deposição extracelular. No entanto, outros trabalhos sugerem que a micróglia pode perder a capacidade de degradar e processar o excesso de A β no decorrer da doença (DE CALIGNON et al., 2012; BLOCK; ZECCA; HONG, 2007), mesmo sem perder a capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , que, por sua

vez, além de serem neurotóxicas, também estimulam a formação do A β (HICKMAN; ALLISON; EL KHOURY, 2008).

1.2 Colesterol e a Doença de Alzheimer

Evidências acumuladas ao longo dos últimos anos apontam a hipercolesterolemia como um possível fator desencadeador do acúmulo de A β na DA de origem esporádica (SHARMA et al., 2008; GHRIBI et al., 2008; NIZARI et al., 2016; SPARKS et al., 1990, 1994; KUO et al., 1998; SOLOMON et al., 2009; PENG et al., 2020).

O primeiro relato de que o colesterol poderia estar envolvido no desenvolvimento da DA foi descrito pelo patologista Larry Sparks e colaboradores em 1990, ao observarem que cerca de 70 % dos indivíduos que faleceram em decorrência de doença arterial coronariana também apresentavam placas amiloides em seus cérebros, uma das características patológica que definem a DA (MURPHY; LEVINE, 2010). No entanto, indivíduos de mesma idade e que haviam falecido de outras causas eram bem menos susceptíveis a desenvolverem placas amiloides cerebrais, o que levou os pesquisadores a suspeitarem de uma ligação entre os altos níveis de colesterol plasmático e a DA (SPARKS et al., 1990; SPARKS et al., 1994; KUO et al., 1998; SOLOMON et al., 2009).

Posteriormente, os autores mostraram o primeiro estudo experimental da associação entre hipercolesterolemia e DA. Nesse estudo, coelhos alimentados com uma dieta enriquecida com colesterol (2 %), por pelo menos quatro semanas, desenvolveram placas amiloides cerebrais e outros sinais patológicos relacionados à DA, e a mudança da dieta hipercolesterolêmica para uma dieta padrão reduzia o número de placas. Além disso, nesse mesmo estudo, eles demonstraram que a administração de probucol, uma droga hipolipemiante, era capaz de reduzir significativamente as placas nos animais submetidos à dieta com colesterol (SPARKS et al., 1994). Portanto, esses dados levaram os autores a sugerirem uma relação entre os altos níveis de colesterol plasmático, fator de risco vascular, e a predisposição ao desenvolvimento de DA.

Na sequência, outros estudos também demonstraram que a exposição a uma dieta hipercolesterolêmica resultou em um aumento significativo no acúmulo de A β em modelos transgênicos para DA, e que esse aumento se correlacionou fortemente com os níveis de colesterol plasmático (MORI et al., 2001; REFOLO et al., 2000; REFOLO et al., 2001). No entanto, como o colesterol não é capaz de atravessar a BHE (DIETSCHY; TURLEY, 2001; BJORKHEM, MEANEY, 2004; ZHANG; LIU, 2015; PIFFERI et al., 2021), o exato mecanismo pelo qual a hipercolesterolemia levaria a um aumento das placas amiloides cerebrais ainda não era completamente compreendido (DIETSCHY; TURLEY, 2001). Na época, o grupo de Sparks tentou obter uma resposta, num estudo publicado em 1997, o qual demonstrou uma

alta ativação microglial no cérebro de pacientes com doença cardíaca, em comparação a pacientes sem doença cardíaca, e também em coelhos mantidos em dieta hipercolesterolêmica (SPARKS et al., 1997).

Ainda em relação aos estudos clínicos e epidemiológicos, em 1993, o pesquisador Jack C. de la Torre propôs uma hipótese vascular para a DA esporádica, e posteriormente em 1999, o mesmo autor propôs a associação entre envelhecimento e fatores de risco cardiovasculares, como, por exemplo, aterosclerose, como um gatilho primário levando à hipoperfusão cerebral, à mudanças neurodegenerativas e ao eventual início da DA (DE LA TORRE; MUSSIVAND, 1993; DE LA TORRE, 1999). Essa proposta vascular para a doença, somada às observações em modelos animais, contribuíram para o surgimento de diversos estudos epidemiológicos, na intenção de demonstrar a associação entre hipercolesterolemia e a DA esporádica (KIVIPELTO et al., 2001, 2002, 2005).

Um estudo que investigou a relação entre o índice de massa corporal na meia-idade, fatores de risco vascular e o desenvolvimento de demência e DA subseqüentes, mostrou que o agrupamento de fatores de risco vasculares aumenta o risco de desenvolver DA. Além disso, a associação entre a obesidade, hipercolesterolemia e hipertensão na meia-idade foram os fatores que mais favoreceram o desenvolvimento da DA no envelhecimento (acima de 70 anos de idade) (KIVIPELTO et al., 2005). Ademais, um pequeno estudo sugeriu que a atorvastatina, um hipolipemiante, induz melhora cognitiva em pacientes com DA (SPARKS et al., 2005).

No entanto, é importante ressaltar que outros estudos mostraram uma correlação positiva entre hipercolesterolemia e o desenvolvimento de comprometimentos cognitivos leves e DA em pacientes mais jovens, mas não em mais velhos (KIVIPELTO et al., 2001; SOLOMON et al., 2007; ZAMBON et al., 2010; BAGNASCO, 2017). Esses resultados demonstram que o mecanismo subjacente para a influência da idade na relação entre colesterol e a função cognitiva ainda não está claro (STEFANI et al., 2009; VAN VLIET et al., 2009).

Além dos estudos mencionados acima, estudos *in vitro* indicam que o colesterol pode modular diretamente o processamento da APP e a produção do A β em células neuronais (SIMONS et al., 1998; EHEHALT et al., 2003), principalmente em microdomínios de membrana denominadas balsas lipídicas, regiões com alta concentração de colesterol, as quais parecem ser o principal local para o processamento amiloidogênico da APP (VETRIVEL; THINAKARAN, 2010). Em estudo com neurônios hipocâmpais de coelhos hipercolesterolêmicos, Ghribi e colaboradores (2006) observaram a colocalização da BACE-1 e de colesterol, sendo que esse lipídio pode estar relacionado à atividade desta enzima e a produção de A β . Além disso, a enzima α -secretase, a qual participa da via não-amiloidogênica, necessita de membranas com menos colesterol, como os domínios fosfolipídicos ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, os quais são mais

fluidos (KOJRO et al., 2001). Isso foi confirmado em outro estudo com neurônios hipocâmpais que demonstrou que a redução do colesterol da membrana (por meio de compostos extratores de colesterol, como a metil-beta-ciclodextrina) diminui a atividade da β secretase, levando a uma diminuição na produção de A β . Especificamente, a redução dos níveis de colesterol na membrana diminuiu a atividade da enzima BACE-1 (SIMONS et al., 1998).

1.3 Síntese e metabolismo do colesterol

O colesterol é o membro mais abundante de uma família de compostos conhecida como esteróis (GOEDEKE; FERNANDEZ-HERNANDO, 2012). Nas células animais, o colesterol é componente essencial da membrana plasmática (LANGE, 1992), determinando sua fluidez (DIETSCHY, 2009). Sua via de biosíntese também é precursora de importantes compostos endógenos, como hormônios esteróides, vitamina D e sais biliares (GOLDSTEIN; BROWN, 2001; REPA et al., 2000; CARTOCCI et al., 2017) Dessa forma, o suprimento contínuo de colesterol para as células é de extrema importância (GOEDEKE; FERNANDEZ-HERNANDO, 2012), de maneira que a sua regulação metabólica é bastante fina e controlada (WULP et al., 2013).

A regulação do metabolismo do colesterol apresenta uma série de mecanismos de transporte, biossintéticos e regulatórios, em que o fígado é o órgão regulador principal (HARVEY; FERRIER, 2012). A maior parte do colesterol utilizado pelo organismo é endógeno e produzido pela via do mevalonato, também chamada via dos isoprenóides. Essa via é precursora de diversas moléculas importantes para o metabolismo (TRICARICO et al., 2015). Resumidamente, a síntese do colesterol pode ser dividida em cinco estágios: I) síntese do mevalonato a partir da Acetil-CoA; II) síntese de unidades isoprenóides a partir do mevalonato por meio da perda de CO₂; III) condensação de seis unidades isoprenóides para formar o esqualeno; IV) ciclização do esqualeno, formando lanosterol; V) formação do colesterol por rearranjo da molécula de lanosterol. O passo limitante da velocidade na síntese do colesterol é a conversão da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) em mevalonato, catalisada pela enzima HMG-CoA redutase (RODWELL et al., 1976; NES, 2011). A atividade desta enzima é regulada por mecanismos de retroalimentação negativos, tanto em nível protéico quanto transcricional (GOEDEKE; FERNANDEZ-HERNANDO, 2012).

O *pool* de colesterol total é semelhante em roedores e humanos quando expresso com base no peso corporal (DIETSCHY; TURLEY, 2002). Em condições normais, em torno de 60 % do colesterol corporal é sintetizado (em torno de 700 mg/dia) e o restante é provido pela dieta. O fígado é responsável por, aproximadamente, 10 % da síntese total em humanos, assim como o intestino delgado (LEONI et al., 2013).

A absorção de colesterol pode ocorrer de três maneiras principais: 1) a primeira ocorre no lúmen intestinal e envolve a emulsificação e hidrólise da gordura dietética e dos ésteres de colesterol pelos ácidos biliares e enzimas pancreáticas; 2) a segunda é a captação de colesterol livre pelos enterócitos; 3) a terceira ocorre com a montagem de colesterol e ésteres de colesterol com lipoproteínas nos enterócitos (IQBAL, 2005). Os hepatócitos podem absorver as lipoproteínas, e o colesterol ser utilizado na composição do ácido biliar, ser esterificado para armazenamento, ou ser convertido em lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês *very low density lipoprotein* – VLDL) para distribuição aos tecidos extra-hepáticos. (WULP et al., 2013).

O influxo de colesterol inibe a enzima HMG-CoA redutase e a síntese de colesterol, bem como estimula a esterificação do colesterol por meio do aumento da atividade da enzima acil-CoA: colesterol aciltransferase (ACAT), enzima intracelular que serve como um regulador da homeostase do colesterol intracelular, além de fornecer ésteres de colesterol para a montagem de lipoproteínas no fígado e no intestino delgado (CHANG et al., 2006).

O fígado saudável está perfeitamente equipado para lidar com grandes quantidades de colesterol. Quando quantidades relativamente grandes de colesterol atingem o fígado, a síntese *de novo* e a captação pela lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low-density lipoprotein* - LDL são reguladas negativamente (KRUIT et al., 2006). A síntese de colesterol no fígado é altamente sensível à quantidade de colesterol (da dieta) que chega ao órgão a partir do intestino, através da via do remanescente de quilomícrons (DIETSCHY; TURLEY, 1993). A eficiência de absorção intestinal de colesterol em humanos é altamente variável, variando de 15 % a 85 % em indivíduos saudáveis (GRUNDY; METZGER, 1983).

1.4 Colesterol e o Sistema Nervoso Central

Apesar da massa encefálica corresponder a apenas 2 % do peso corporal de um indivíduo adulto (BJORKHEM et al., 1998), o cérebro contém cinco a dez vezes mais colesterol do que qualquer outro órgão. Este esterol representa 20-30 % de todos os lipídeos no cérebro (BENARROCH, 2008). Há sólidas evidências de que possivelmente a maior parte desse colesterol seja produzido no próprio tecido (GRIMM et al., 2017; EDMOND et al., 1991; DIETSCHY, 2009), uma vez que a BHE impede qualquer transferência direta de esteróis do sangue para o cérebro, especialmente quando estão contidos em partículas de lipoproteínas (DIETSCHY; TURLEY, 2001; BJORKHEM, MEANEY, 2004; ZHANG; LIU, 2015; PIFFERI et al., 2021). Grande parte do colesterol cerebral é sintetizado durante o processo de mielinização, que ocorre nas primeiras etapas do desenvolvimento (SPADY; DIETSCHY, 1983; ZHANG; LIU, 2015) e com a maturação do sistema nervoso, esta função passa a ser

resguardada principalmente aos astrócitos (BJORKHEM et al., 2004; BENARROCH et al., 2008).

O colesterol é fundamental para a formação, estabilização e plasticidade sináptica no SNC (DUFOUR; LIU; GUSEV; ALKON et al., 2006; SCHREURS, 2010). A maior parte do colesterol cerebral é não esterificado e está localizado nas bainhas de mielina (SPADY; DIETSCHY, 1983; BENARROCH, 2008), além de ser componente estrutural das membranas das células da glia e neurônios (PARATCHA; IBANEZ, 2002). Nas membranas neuronais, o colesterol está concentrado em microdomínios de membrana resistentes à solubilização com detergentes, denominados balsas lipídicas, do inglês “*lipid rafts*” (Figura 2) (BENARROCH, 2008; MASON et al., 2003). A concentração de colesterol nas *lipid rafts* regula criticamente a permeabilidade do canal iônico, a transdução de sinal, a sinaptogênese, a dinâmica da vesícula sináptica (BENARROCH, 2008), os fatores neurotróficos e os receptores de neurotransmissores (PARATCHA; IBANEZ, 2002). Portanto, as *lipid rafts* servem como uma plataforma para iniciação, propagação e manutenção de eventos de sinalização celular (TSUI-PIERCHALA et al., 2002; ZONTA; MINICHELLO, 2013; PARATCHA; IBANEZ, 2002). Assim, um controle sobre a homeostase do colesterol cerebral significa manter estas balsas lipídicas estáveis, e conseqüentemente, manter a permeabilidade fisiológica da BHE (TAKECHI, RYUSUKE et al., 2013; MORGAN et al., 2014).

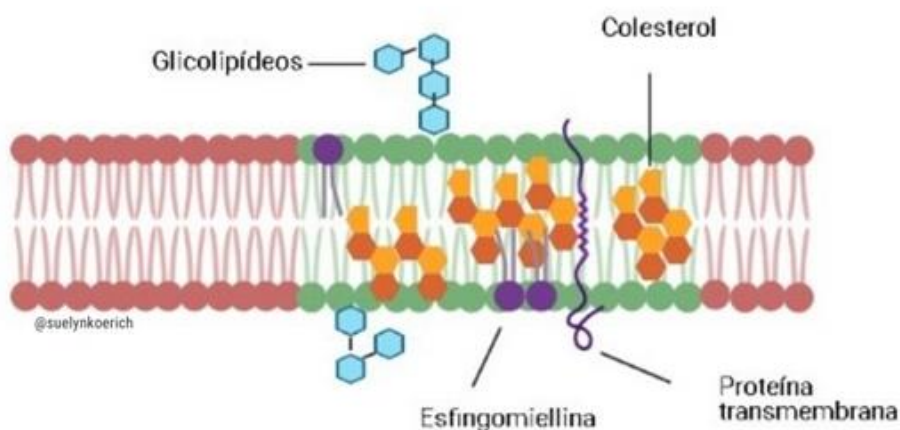


Figura 2: Microdomínio da membrana plasmática - “*Lipid rafts*”. Fonte: Adaptado de WAHEED; FREED, 2010.

Estudos mostram que a membrana vesicular sináptica contém altas concentrações de colesterol comparado às outras organelas (THIELE et al., 2000; DASON et al., 2010; BINOTTI et al., 2021), e que proteínas de vesículas sinápticas como a sinaptofisina e sinaptobrevina são apontadas como possíveis alvos de complexação com colesterol (MITTER et al., 2003; KREUTZBERGER et al., 2015; JIA et al., 2006). Estes dados sugerem que para

a síntese, transporte e liberação do conteúdo de vesículas pré-sinápticas são necessárias grandes quantidades de colesterol.

Como a produção de colesterol cerebral é realizada principalmente por astrócitos no cérebro maduro (PFRIEGER; UNGERER, 2011; BENARROCH, 2008; BJÖRKHEM et al., 2004), o transporte do colesterol dos astrócitos para os neurônios requer a sua ligação a uma das variantes da apolipoproteína E (apoE) (PFRIEGER; UNGERER, 2011). Os neurônios captam este complexo apoE-colesterol via endocitose por meio de receptores específicos pertencentes à família de receptores de LDL (como o próprio receptor de LDL ou a proteína relacionada ao receptor de LDL, LRP1). Após a absorção, as LDL são endocitadas e o conteúdo de colesterol liberado no ambiente intracelular por meio da ação dos lisossomos neuronais (THELEN et al., 2006; PFRIEGER; UNGERER, 2011).

O colesterol é liberado das lipoproteínas dentro de lisossomos neuronais e posteriormente transportado por proteínas Niemann-Pick C tipo 1 (NPC1) e tipo 2 (NPC2) para o citoplasma, onde desempenha inúmeras funções celulares ou é convertido em 24-hidroxicolesterol (24-OH) por uma enzima membro da família do citocromo P450, a CYP46. Esse metabólito do colesterol pode cruzar a BHE, ou ser liberado no plasma via fluido cérebro espinhal, que é a principal rota de eliminação do colesterol do cérebro (BJÖRKHEM, 2008).

Após a sua excreção do cérebro, o 24-OH, através da circulação sanguínea, alcança o fígado, onde é captado e metabolizado. Além de ser um metabólito para a eliminação do colesterol, o 24-OH pode ser captado pelos astrócitos, onde age como uma molécula sinalizadora que regula a homeostase do colesterol por meio da ativação de receptores *liver* X (LXR) (PFRIEGER; UNGERER, 2011; GAMBA et al., 2021). Assim como o 24-OH, o 27-hidroxicolesterol (27-OH) também é capaz de atravessar a BHE. Contudo, a maior parte do 27-OH flui da circulação para o cérebro e, devido à direta correlação entre os níveis de colesterol e de 27-OH na circulação sanguínea (BABIKER et al., 2005; HAVERIN et al., 2005; MULDER, 2009), se supõe que o aumento nos níveis de colesterol plasmático resulta em um aumento na captação cerebral do metabólito (SHAFATI et al., 2011; BROOKS et al., 2017).

1.5 Modelos experimentais para o estudo da hipercolesterolemia

Devido à proximidade filogenética, o baixo custo e a relativa facilidade de manutenção, roedores vêm sendo amplamente utilizados como modelo animal para o estudo dos efeitos da hipercolesterolemia (GETZ; REARDON, 2016). Para isso, têm-se utilizado dietas contendo colesterol, as quais variam de rações comerciais suplementadas com níveis substancialmente diferentes do lipídeo, assim como modificações nas porções de outros nutrientes (DORNAS et al., 2010).

Apesar do grande número de estudos utilizando roedores, é importante entender que o metabolismo lipídico de cada espécie é único e produto de sua evolução, logo, há significativas diferenças entre o metabolismo lipídico humano e destes animais (LEE et al., 2017). Em uma análise comparativa entre diversos modelos animais utilizados para indução de quadros de hipercolesterolemia, Yin e colaboradores demonstraram que roedores possuem diferenças bastante acentuadas na distribuição de lipoproteínas (YIN et al., 2012). Essas diferenças nos perfis lipídicos plasmáticos de diferentes espécies, reforçam a necessidade de cautela quanto à translação envolvida nos resultados de experimentos com hipercolesterolemia induzida por dieta em roedores (YIN et al., 2012).

Muitos dos trabalhos prévios envolvendo hipercolesterolemia e aterosclerose vieram de estudos que utilizaram coelhos (KOLODGIE et al., 1996; SHARMA; CHRISTOPHER, 2018). O modelo de coelho alimentado com colesterol é notável pelo rápido desenvolvimento de lesões aórticas e baixo custo para manutenção, sendo um regime típico para indução de aterosclerose envolvendo suplementação de 0,5 % a 4 % de colesterol (DORNAS et al., 2010).

Por outro lado, camundongos alimentados com uma dieta com baixo teor de gordura, não desenvolvem aterosclerose naturalmente (YUAN et al., 2019; ZHAO et al., 2020). Isso pode ser explicado pelo fato de que estas espécies apresentam altos níveis de colesterol HDL e baixos níveis de colesterol LDL (ZADELAAR et al., 2007; TSUTSUMI et al., 2001), tornando-as resistentes ao desenvolvimento de hipercolesterolemia (PAIGEN et al., 1987; YIN et al., 2012). Assim, camundongos não geneticamente modificados tendem a responder brandamente à dietas hipercolesterolêmicas, desenvolvendo apenas hipercolesterolemia leve (NISHINA; PAIGEN et al., 1990; HARTVIGSEN et al., 2007; LEE et al., 2017). Ainda assim, a principal estratégia de indução de hipercolesterolemia em camundongos é fornecer aos mesmos uma dieta enriquecida com colesterol.

Um dos primeiros trabalhos utilizando dieta enriquecida em colesterol em camundongos foi um estudo que utilizou 30 % de gordura, 5 % de colesterol e 2 % de ácido cólico e demonstrou que esses animais apresentavam hipercolesterolemia e estrias gordurosas em diversas regiões vasculares (VESSELINOVITCH; WISSLER, 1968). Posteriormente, em outro estudo, foi demonstrado que mesmo dietas com 15 % de gordura total e apenas com 1,25 % de colesterol ocasionam hipercolesterolemia branda em camundongos C57BL/6 alimentados por 3 meses (SCHREYER et al., 1998).

1.6 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Como discutido anteriormente, a etiologia da DA é complexa e sua patogênese ainda não é bem compreendida. Diferentes estudos sugerem que as dislipidemias podem estar associadas ao desenvolvimento de demência e DA. Assim, considerando que o colesterol é um lipídeo com variadas funções em condições fisiológicas e patológicas, e pode estar relacionado com a fisiopatologia da DA, é possível que possa ser a conexão entre as doenças metabólicas e a DA.

Estudos experimentais utilizaram uma abordagem para indução de dislipidemia que envolve não somente o acréscimo de colesterol, mas também de gorduras saturadas à dieta. No entanto, trabalhos que avaliaram o efeito de uma dieta acrescida apenas de colesterol, utilizando diferentes modelos experimentais de DA, e que avaliaram paradigmas diversos relacionados às propriedades cognitivas, celulares e moleculares, são escassos.

Dessa forma, é necessária uma investigação mais ampla sobre o efeito de uma dieta acrescida de colesterol em modelos transgênicos e induzidos de DA. Portanto, a hipótese do presente trabalho é que a dieta acrescida de colesterol irá acelerar o desenvolvimento dessa condição patológica através do aumento da deposição de A β , da neurodegeneração e da neuroinflamação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Testar a hipótese de que a dieta acrescida de colesterol agrava as alterações neuropatológicas em modelos experimentais para a DA.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da dieta acrescida de colesterol sobre o comprometimento cognitivo em camundongos transgênicos modelo para DA ou induzido pela injeção intrahipocampal de $A\beta_{1-42}$.
- Avaliar o efeito do colesterol acrescido à dieta sobre a gliose, a viabilidade neuronal e a deposição de placas amiloides, em camundongos transgênicos modelo para DA.
- Avaliar o efeito do colesterol acrescido à dieta sobre a expressão de citocinas anti- e pró-inflamatórias e fatores neurotróficos em modelo de injeção intrahipocampal de $A\beta_{1-42}$ e em camundongos transgênicos modelo para DA.
- Avaliar o efeito da dieta acrescida de colesterol sobre parâmetros metabólicos periféricos, em modelo de injeção intrahipocampal de $A\beta_{1-42}$ e em camundongos transgênicos modelo para DA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os experimentos descritos no item 3.4, utilizamos camundongos C57BL/6, machos, não transgênicos, com 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central (UFMG). Para a realização de experimentos envolvendo animais transgênicos, modelo para a DA, descritos no item 3.5, utilizamos camundongos duplo-transgênicos APP/PS1 (B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/Mmjax), machos e fêmeas, com idade de 6 meses, obtidos do *The Jackson Laboratory* e reproduzidos no biotério da UFMG. Todos os animais tinham água e ração *ad libitum* e foram submetidos ao ciclo claro-escuro de 12 h. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais, empregados pela Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG), e aprovados sob o número de protocolo 374/2018.

3.2 Dieta

Para o tratamento dos animais submetidos à dieta especial, utilizamos dois tipos de ração, descritas na tabela 1: 1) ração acrescida de 1,25% colesterol e 2) ração controle. A dieta foi baseada em estudo publicado anteriormente (CHEN et al., 2016; ULLRICH, 2010).

Tabela 1: Composição das dietas experimentais (g/kg de dieta).

Nutrientes	Dieta padrão AIN-93M (g/kg)	Dieta com acréscimo de colesterol (g/kg)
Amido de milho	465.692	465.692
Maltodextrina (amido dextriniado)	155	155
Caseína	140	140
Sacarose	100	100
Celulose	50	50
Óleo de soja	40	40
BHT	0.008	0.008
Bitartrato de colina	2.5	2.5
Cistina (metionina)	1.8	1.8
Mix de vitaminas	10	10
Mix de minerais	35	35
Colesterol concentração 1,25%	-	12.55

De acordo com a injeção intrahipocampal (PBS ou A β ₁₋₄₂) e a dieta (controle ou colesterol), os animais foram divididos em 4 grupos: dieta controle + PBS; dieta controle + A β ₁₋₄₂; dieta acrescida de colesterol 1,25% + PBS; dieta acrescida de colesterol 1,25% + A β ₁₋

42.

Para os animais APP/PS1, fêmeas e machos, foram utilizados 4 grupos: WT controles submetidos à dieta controle; WT submetidos à dieta acrescida de colesterol 1,25%;

APP/PS1 submetidos à dieta controle e APP/PS1 submetidos à dieta acrescida de colesterol 1,25%.

3.3 Cirurgia estereotáxica

Neste trabalho utilizamos como estímulo neurotóxico o peptídeo $A\beta_{1-42}$ (Human, Invitrogen, Carlsbad, EUA), utilizando o protocolo de ativação indicado pelo fabricante. Para viabilizar a microinjeção intrahipocampal de $A\beta_{1-42}$ (400 pmol) 24 horas antes da tarefa de reconhecimento de objetos (TRO) (protocolo 24 h - item 3.4.1), camundongos C57BL/6, machos, de 8 semanas de idade, foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula. Para isso, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), sendo, em seguida, submetidos à tricotomia do escalpo e seu crânio fixado a um aparelho estereotáxico (Insight®). Posteriormente, foi realizada a assepsia do escalpo com álcool iodado e uma incisão sagital para exposição e limpeza da calota craniana. Para microinjeção, uma cânula de 7 mm de comprimento foi inserida na camada molecular do giro denteado do hipocampo direito, utilizando-se as seguintes coordenadas: AP: - 1,9 mm; LL: -1.5 mm; DV: +1,8 mm. As coordenadas foram obtidas a partir do atlas do cérebro de camundongos (FRANKLIN; PAXINOS, 2008).

Para viabilizar a microinjeção intrahipocampal de $A\beta_{1-42}$ para realização do protocolo 02 (protocolo 7 d) de neurotoxicidade, 7 dias antes da TRO (item 3.4.2), animais C57BL/6, machos, de 8 semanas de idade, foram anestesiados com isoflurano em oxigênio em concentrações de 2–4% para indução e 0,5–2,0% para manutenção. Após a ausência de reflexos e sinais de dor, a superfície da cabeça foi raspada e, em seguida, o animal foi posicionado em um quadro estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL, Estados Unidos). Após assepsia com álcool (70%, tópico) e solução de iodopovidine (7,5%, tópico), foi aplicada anestesia local com lidocaína clorohidratada-epinefrina [1% (p/vol), 7 mg/kg] e o couro cabeludo foi removido para expor a calota craniana. Pequenos orifícios na parte superior do crânio foram feitos com uma broca de 0,5 mm de acordo com as coordenadas estereotáxicas descritas no parágrafo anterior. Uma representação do local de injeção pode ser encontrada na figura 3.

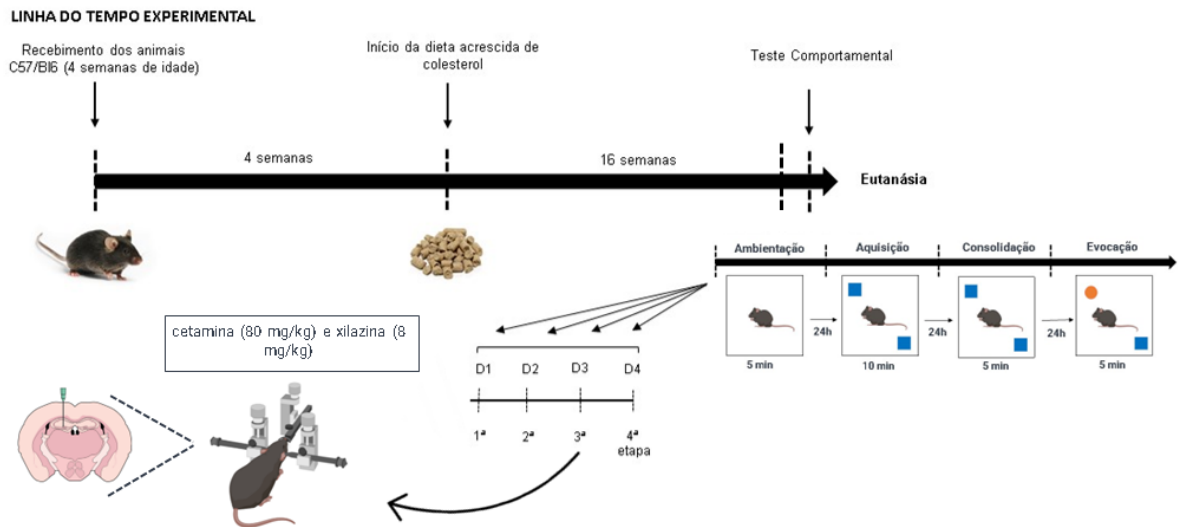


Figura 4: Linha do tempo experimental do protocolo 24 h em animais C57BL/6. Animais receberam dieta controle ou acrescida de 1,25 % de colesterol por 16 semanas e injeção intrahipocampal de PBS ou $A\beta_{1-42}$.

3.4.2 Modelo prolongado de injeção de $A\beta_{1-42}$ (Protocolo 7 dias)

Neste protocolo, os camundongos C57BL/6 foram submetidos à microinjeção intrahipocampal (PBS ou $A\beta_{1-42}$) no dia 1 e foram submetidos à última etapa da TRO, 7 dias após a injeção (dia 8) (Figura 5). Para a microinjeção, introduziu-se uma agulha de 8 mm de comprimento, acoplada a uma agulha Hamilton® de 10 μ l por meio de um fio de polietileno. O volume e a velocidade de injeção foram os mesmos descritos no item 3.4.1.

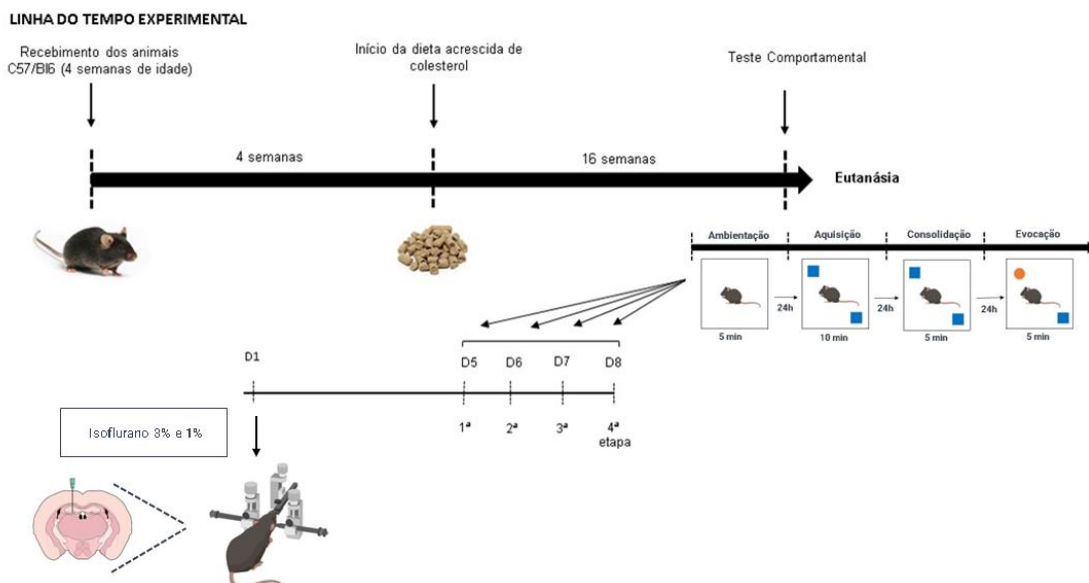


Figura 5: Linha do tempo experimental do protocolo 7 d em animais C57BL/6. Animais receberam dieta controle ou acrescida de 1,25 % de colesterol por 16 semanas e injeção intrahipocampal de PBS ou A β ₁₋₄₂.

3.5 Animais APP/PS1

Camundongos APP/PS1 ou WT *littermates*, machos e fêmeas, com 6 meses de idade receberam dieta acrescida de colesterol 1,25% ou controle durante 16 semanas, de modo que, ao final do experimento, os animais possuíam 10 meses de idade. Os machos foram submetidos à avaliação comportamental por meio da TRO e à tarefa exploratória de campo aberto (CA) (figura 6). As fêmeas foram submetidas ao mesmo protocolo e, ao final do tratamento, foram submetidas à avaliação comportamental por meio da TRO (figura 7). Todos os animais foram eutanasiados imediatamente após o último dia de avaliação comportamental.

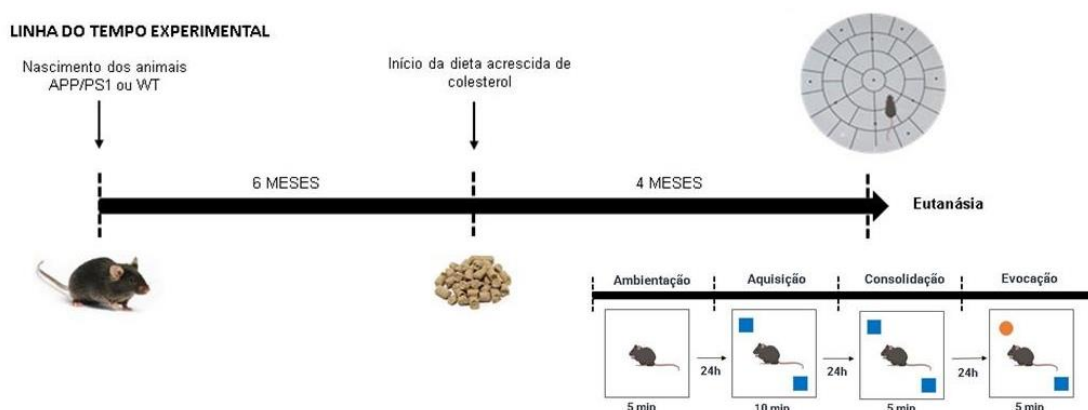


Figura 6: Linha do tempo experimental do tratamento com dieta acrescida de colesterol em animais APP/PS1, machos. Animais receberam dieta controle ou acrescida de 1,25% de colesterol por 16 semanas.

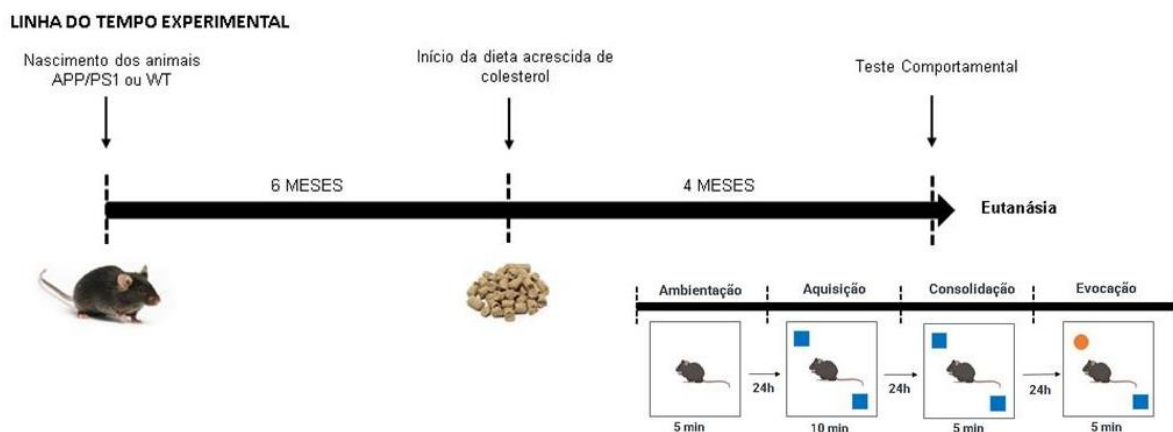


Figura 7: Linha do tempo experimental do tratamento com dieta acrescida de colesterol em animais APP/PS1, fêmeas. Animais receberam dieta controle ou acrescida de 1,25% de colesterol por 16 semanas.

3.6 Tarefa de reconhecimento de objeto novo (TRO)

A TRO foi realizada em um aparato de fundo branco quadrado (30 x 30 x 20 cm), constituída por quatro etapas, separadas entre si por um intervalo de 24 h. Na primeira etapa, os animais são expostos ao aparato vazio e podem explorar livremente o mesmo por 5 minutos. Na segunda etapa, os animais são expostos ao aparato contendo dois objetos idênticos por 10 min. Os objetos foram dispostos na transversal e afastados da parede em 5 cm e os indivíduos puderam explorar livremente. Na terceira etapa, repetiu-se a exposição aos objetos idênticos, mas por um período de 5 minutos. Por fim, na quarta etapa, um dos objetos é substituído por um objeto novo e os indivíduos puderam explorar livremente os objetos e o aparato por 5 minutos. O teste foi filmado por uma câmera de vídeo acoplada a um computador e os vídeos foram analisados posteriormente. Para avaliação, utilizou-se o tempo de exploração do objeto antigo e o tempo de exploração do objeto novo, obtidos na quarta etapa. Os resultados foram mostrados na forma de índice de reconhecimento de objeto novo, obtido a partir da fórmula: $100 \cdot [\text{tempo explorando ON} / (\text{tempo explorando OA} + \text{tempo explorando ON})]$.

3.7 Campo aberto (CA)

O CA é composto por uma caixa de acrílico cilíndrica transparente (30 cm de diâmetro) de fundo branco. Os animais foram colocados no centro do aparato e deixados no campo aberto por 10 min. Acima do aparato, foi colocada uma câmera de vídeo conectada a um computador e todos os testes foram gravados em vídeo e posteriormente analisados com

auxílio do programa *Any-Maze* (Stöelting®). O parâmetro analisado foi a distância percorrida. Após cada teste, o aparato foi limpo com álcool 70 % para remover pistas olfatórias.

3.8 Imunohistoquímica

Imediatamente após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados e perfundidos por via transcardíaca conforme descrito no item 3.13, seus cérebros removidos e fatiados em uma espessura de 35 μm e armazenados em solução PFA 2%.

Para a imunomarcção de NeuN (corpos de neurônios) e Iba-1 (micróglia) foram utilizados os cortes de hipocampo dos animais APP/PS1 ou WT, machos. Inicialmente os cortes foram incubados em tampão citrato por 1h (pH 6.0, 70 °C) para recuperação antigênica. Na sequência, foram incubados por 15 minutos em solução de H_2O_2 1%, para inativação da peroxidase endógena, solução de bloqueio (BSA 4 %, Triton 0,5%, em TBS) por 1h e em anticorpo anti-NeuN (1:800) ou anti-Iba-1 (Wako, 1:500) por 48 h. Em seguida, as fatias foram incubadas em anticorpo secundário anti-rabbit (1:500) *overnight*, seguido de solução avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Vector) e, por fim, a imunohistoquímica foi revelada utilizando solução de diaminobenzidino (DAB).

3.9 Aquisição, análise e processamento das imagens

Para obtenção de fotomicrografias de fatias imunomarcadas por NeuN ou Iba-1, utilizamos câmera digital (Microfire, Optronics, CA, USA) acoplada a um microscópio Zeiss Imager A.2. As fotomicrografias foram feitas utilizando-se a objetiva de 10X. Todas as imagens foram analisadas com auxílio do programa *ImageJ* (NIH).

Para a avaliação da imunomarcção por NeuN, utilizamos a densidade óptica (DO), que é gerada por meio do logaritmo da razão entre a intensidade máxima em pixels (255) e a intensidade média em pixels obtida a partir de cada fatia imunomarcada [$\log(255/\text{intensidade})$]. Para a avaliação da imunomarcção por Iba-1, utilizamos a intensidade média. Essa variável foi usada com objetivo refletir na análise as regiões de maior intensidade encontradas em aglomerados de células. As avaliações foram realizadas utilizando fotomicrografias do hipocampo.

3.10 Marcação da placa amiloide e identificação por microscopia de excitação por dois fótons

As fatias de hipocampo dos animais APP/PS1 machos foram coradas utilizando solução de ThioS a 1% em etanol 50% (Sigma-Aldrich). As amostras foram imersas por 10 minutos em solução ThioS, mergulhadas por três vezes em etanol 50% e lavadas com PBS. Em seguida, a fluorescência das imagens foi obtida. A imagem de fluorescência foi realizada por microscopia de fluorescência excitada por dois fótons (TPEF) (FONSECA et al., 2019). Um microscópio invertido de varredura a laser Nikon (Lavision Biotec) com um laser de 80 MHz, 7 picossegundos (APE PicoEmerald) centrado em 830 nm, e objetiva de 5x, foi usado para TPEF. Um fotomultiplicador GaAsP comum filtro passa-banda de 525/40 nm foi usado como detector.

3.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Amostras de hipocampo obtidas a partir de animais APP/PS1 ou WT, machos e fêmeas, ou animais C57BL/6 machos, submetidos à microinjeção intrahipocampal (PBS ou A β_{1-42}) 7 dias antes do teste (Protocolo 7 d), alimentados com dieta acrescida de colesterol ou dieta controle, foram homogeneizadas em tampão de extração de citocinas [Tris-HCl 0,5 M pH 8,0; NaCl 5 M; 1% NP40; glicerol 10%; florido fenilmetilsulfonil (PMSF) 200 mM; pepstatina A 1 μ M; EDTA 0,5 M; E-64 1 mM e vanadato de sódio 1 mM diluídos em água destilada] e centrifugadas a 16.000 rpm a 4 °C por 20 min. Posteriormente, foi realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) para detectar a concentração de citocinas (IL-6, IL-10 e IL-1 β) fatores neurotróficos (BDNF, NGF, GDNF) e quimiocina (CX3CL1) utilizando kits da R&D Systems (DuoSet, Minneapolis, MN), de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda 490 nm. Os dados foram expressos em pg/mL em 100 mg de tecido.

3.12 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O RNA de amostras do hipocampo de animais APP/PS1 ou WT, machos, alimentados com dieta acrescida de colesterol ou dieta controle, foi isolado usando o reagente TRIzol™ de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Scientific). O RNA foi ressuspenso em 20 μ L de água livre de nuclease, e sua concentração foi analisada por espectrofotômetro (NanoDrop™, Thermo Scientific). Os cDNAs foram preparados a partir de 2 μ g de RNA total extraído em uma reação final de transcrição reversa de 20 μ L. O RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) foi realizado usando o Power SYBR® Green PCR Master Mix na

plataforma do sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 7 Flex (Applied Biosystems). Todos os ensaios de RT-qPCR foram realizados para quantificar os níveis de mRNA dos seguintes genes: proteína de densidade pós-sináptica (PSD-95-Dgl4) e syntaxina (Mm-Stx1a). Os primers foram projetados usando o programa Primer3Plus: PSD-95 (5'-TCTGTGCGAGAGGTAGCAGA-3';5'- AAGCACTCCGTGAACTCCTG-3'), syntaxina (5'-GAACAAAGTTCGCTCCAAGC-3';5'-TGGCGTTGTAICTCGGACAT-3') e rpl32 (5'-GCTGCCATCTGTTTTACGG-3';5'TGACTGGTGCCTGATGAACT-3'). A verificação prévia de formações secundárias indesejadas ou dímeros entre os primers foi realizada usando a ferramenta “OligoAnalyser 3.1” (Integrated DNA Technologies®), disponível em <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>. Todos os primers utilizados neste trabalho foram validados por ensaio de diluição em série e a eficiência da reação foi calculada, compreendendo 90-110% (dados não mostrados). Todos os RT-qPCRs mostraram boa qualidade de amplificação e as alterações na expressão gênica foram determinadas com o método $2^{-\Delta Ct}$ usando Rpl32 para normalização.

3.13 Peso corporal, coleta de sangue, perfusão intracardíaca, preparo dos cérebros para técnicas histológicas e bioquímicas, índice de adiposidade e peso do fígado

Após o término dos experimentos comportamentais, todos os animais foram pesados e anestesiados por via i.p. com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) e, em seguida, submetidos à toracotomia para exposição do coração. Para a coleta do sangue, uma agulha hipodérmica foi inserida no ventrículo direito e foi feita a coleta de sangue total. O soro foi separado por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. Para a perfusão, uma agulha hipodérmica foi inserida no ventrículo esquerdo, por onde foram administradas as soluções de tampão fosfato em salina (PBS, *phosphate buffered saline*), com o auxílio de uma bomba peristáltica (Insight®), a uma taxa de perfusão de 4 mL/min. Paralelamente, foi feita uma incisão no arco aórtico para permitir a saída do sangue. Após a completa perfusão de PBS, os animais foram decapitados, os encéfalos retirados e estocados em solução de paraformaldeído (PFA) 4% por 16 horas, ou foram coletados a fresco e armazenados em freezer -80 °C. Para os animais machos C57BL/6, apenas o hemisfério direito foi coletado e estocado em solução de PFA 4% ou armazenado em freezer -80 °C. O fígado e o tecido adiposo foram removidos, pesados e armazenados em freezer -80 °C para posterior análise. As massas absolutas das gorduras epididimal, retroperitoneal e mesentérica foram utilizadas

para o cálculo do índice de adiposidade visceral (BOUSTANY et al., 2004), conforme a equação:

$$\text{IAd} = \frac{[(\text{massa da gordura epididimal} + \text{massa da gordura retroperitoneal} + \text{massa da gordura mesentérica}) / (\text{massa corporal final} - \sum \text{massa da gordura epididimal} + \text{retroperitoneal} + \text{mesentérica})] \times 100}$$

3.14 Dosagem sérica de colesterol e triglicerídeos

Os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos dos animais foram determinados utilizando o conjunto diagnóstico Bioclin® triglicérides estáveis e colesterol monoreagente, cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico.

3.15 Dosagens Hepáticas

3.15.1 Determinação de lipídeos totais

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos com o uso de solventes orgânicos de acordo com o método de Folch (FOLCH et al., 1957). Resumidamente, o seguinte procedimento foi realizado: 100 mg de tecido hepático foram homogeneizados, em tubo de vidro, com 1900 µL de solução clorofórmio: metanol (2:1). Foram adicionados 400 µL de metanol, jato forte, e os tubos centrifugados a 3000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo previamente pesado, onde se adicionou 800 µL de clorofórmio e 640 µL de NaCl 0,73%, jato forte. Após homogeneização lenta, os homogenatos foram centrifugados durante 5 minutos, a 3000 rpm. A fase superior foi desprezada e a parede do tubo foi lavada 3 vezes com 600 µL solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl) e colocados para secar em estufa, a 60 °C. A quantidade de lipídeos extraída foi calculada por diferença de peso entre o tubo após secagem (com lipídeos) e o tubo vazio.

Os extratos lipídicos foram suspensos novamente em 500 µL de isopropanol para a determinação dos níveis de colesterol total e triglicerídeos, prosseguindo-se com os métodos enzimáticos descritos nos itens 3.15.2 e 3.15.3.

3.15.2 Determinação dos níveis de colesterol

Os níveis de colesterol total foram determinados por método enzimático (colesterol oxidase) colorimétrico (ALLAIN et al., 1974), utilizando-se kit comercial (Labtest®, Brasil). O

método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo ácidos graxos e colesterol livre. Este último, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio, que, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo avermelhado (antipirilquinonimina), que apresenta absorção máxima de 500 nm. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra. Dessa forma, o ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços.

3.15.3 Determinação dos níveis de triglicerídeos

Os níveis de triglicerídeos no fígado foram determinados por método enzimático colorimétrico, utilizando-se kit comercial (Doles, Brasil). O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos do soro pela enzima lipase lipoprotéica, produzindo glicerol livre, que é fosforilado pela enzima glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, a qual em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob ação da peroxidase, em presença de um reagente fenólico (4-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo avermelhado, com máximo de absorção a 510 nm. As dosagens e a curva padrão foram feitas em microplacas de 96 poços.

3.15.4 Medida indireta da peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os níveis de TBARS foram medidos como um índice de estresse oxidativo resultante da peroxidação lipídica, seguindo o protocolo descrito por Buege e Aust (1978). Combinou-se 1 mL de amostra biológica com 2 mL de solução TBARS (ácido tricloroacético, TCA, 15% p/v – ácido tiobarbitúrico, TBA, 0,375% p/v – ácido clorídrico, HCl, 0,25 N – água deionizada) misturando bem. A solução foi aquecida por 15 minutos em banho-maria. Após o resfriamento, adicionou-se 0,75 mL de butanol nos tubos eppendorf. O precipitado floculante foi removido por centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos. A absorbância da amostra foi determinada a 535 nm, a concentração de malonaldeído (MDA) foi lida a partir de uma curva de calibração padrão plotada usando 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) e os resultados foram expressos como nmol de MDA por mg de proteína.

3.15.5 Atividade da catalase *in vitro*

A atividade da CAT foi medida segundo método espectrofotométrico adaptado de Aebi (1984), acompanhando a diminuição da absorbância a 240 nm pelo consumo de peróxido de

hidrogênio (H₂O₂). Uma solução de substrato de peróxido de hidrogênio 0,030% (p/p) foi preparada em 50 mM de tampão fosfato a pH 7,2 e 25 °C, usando peróxido de hidrogênio (30% (p/p) da Sigma-Aldrich, Alemanha. Resumidamente, 0,010 mL de cada amostra foi adicionado a 0,990 mL de solução de substrato em uma cubeta de quartzo e a absorbância (240 nm) foi medida a cada 15 s por 1 min (a 25 °C, pH 7,2 e comprimento do caminho de 10 mm), usando um espectrofotômetro (Shimadzu UV-160, Japão). A mudança na absorbância por minuto (ΔA_{240}) foi estimada e a taxa de reação determinada usando um coeficiente de extinção de H₂O₂ de 43,6 M⁻¹ cm⁻¹. A atividade específica é relatada como unidades por miligrama de proteína (uma unidade é definida como 1 pmol de H₂O₂ consumido por minuto). O cálculo da atividade enzimática foi feito através da fórmula:

$$CAT = \frac{(abs\ 0\ seg - abs\ 60\ seg)}{V\ de\ amostra\ (mL)} \times Fator\ de\ diluição$$

3.15.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A avaliação da atividade da SOD nos tecidos foi determinada pelo método de Madesh e Balasubramanian (1997), com base na autooxidação de pirogalol. O ensaio foi realizado usando uma microplaca de 96 poços, adicionando a cada poço 30 µL de amostras, 99 µL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,2), 6 µL de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-Brometo de 2,5-difeniltetrazólio (MTT) e 15 µL de 1,25 mM de pirogalol. O branco incluiu todos os componentes, exceto o pirogalol e a amostra. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 37 °C por 5 minutos e a reação foi interrompida com 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi lida em um leitor de microplacas a 570 nm (Synergy 2; Bio-Tek, EUA). A atividade total de SOD foi expressa em unidades por mg de proteína, onde uma unidade de atividade de SOD é definida como a quantidade da enzima necessária para produzir 50% de dismutação do radical superóxido por minuto.

Tabela 2: Resumo de experimentos realizados com cada grupo de animais experimentais.

Animais	Protocolo	Grupos	TRO	CA	Dosagens séricas	Dosagens hepáticas	Análises Histológicas	Dosagem de citocinas	RT-qPCR	ThioS	
C57BL/6	24 h - Injeção de PBS ou A β ₁₋₄₂ 24h antes do teste	PBS + controle	X		X	X					
		A β ₁₋₄₂ + controle	X		X	X					
		PBS + colesterol	X		X	X					
		A β ₁₋₄₂ + colesterol	X		X	X					
C57BL/6	7 d - Injeção de PBS ou A β ₁₋₄₂ 7 dias antes do teste	PBS + controle	X		X	X		X			
		A β ₁₋₄₂ + controle	X		X	X		X			
		PBS + colesterol	X		X	X		X			
		A β ₁₋₄₂ + colesterol	X		X	X		X			
APP/PS1	Machos	WT + controle	X	X	X	X	X	X	X	X	
		APP/PS1 + controle	X	X	X	X	X	X	X	X	
		WT + colesterol	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		APP/PS1 + colesterol	X	X	X	X	X	X	X	X	X
APP/PS1	Fêmeas	WT + controle	X			X		X			
		APP/PS1 + controle	X			X		X			
		WT + colesterol	X			X		X			
		APP/PS1 + colesterol	X			X		X			

3.16 Análise estatística

Para análise estatística da TRO, utilizou-se o teste t para uma amostra, considerando a média teórica de 0,5 (50% de exploração em cada objeto). Para as demais avaliações utilizamos ANOVA de duas vias, aplicando-se o pós-teste de Tukey quando adequado. Considerou-se diferença estatisticamente significativa sempre que $p < 0,05$ (nível de significância 5% e intervalo de confiança de 95%).

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da dieta acrescida de colesterol sobre a memória

4.1.1 Colesterol previne o déficit cognitivo induzido por $A\beta_{1-42}$

Utilizamos a TRO para investigar o efeito da dieta acrescida de colesterol nos déficits cognitivos induzidos por $A\beta_{1-42}$. No primeiro experimento, em que a microinjeção foi realizada 24 horas antes do teste (Protocolo 24 h), ao comparar o índice de reconhecimento com 50% de exploração do objeto novo, verificou-se que os animais que receberam $A\beta_{1-42}$ tratados com dieta controle (IRO=0,461±0,03) (Teste t uma amostra, $t(7)=0,90$; $p=0,4023$), apresentaram déficit no reconhecimento do objeto novo, como esperado para o modelo, o que não foi observado nos animais que receberam injeção de PBS e foram tratados com dieta controle (IRO=0,774±0,02) (Teste t uma amostra, $t(4)=12,83$; $p=0,0010$), e no grupo PBS tratados com dieta colesterol (IRO=0,720±0,02) (Teste t uma amostra, $t(6)=10,22$; $p=0,0002$). Por outro lado, o tratamento com colesterol preveniu o déficit induzido por $A\beta_{1-42}$ (IRO=0,626±0,03) (Teste t uma amostra, $t(5)=3,52$; $p=0,0243$) (Figura 8A). No segundo experimento, avaliamos qual o efeito da dieta acrescida de colesterol num prazo mais estendido após a injeção de $A\beta_{1-42}$, já que a injeção foi realizada 7 dias antes do teste (Protocolo 7 d). Ao comparar o índice de reconhecimento com 50% de exploração do objeto novo, verificou-se que os animais que receberam $A\beta_{1-42}$ e foram tratados com dieta controle, apresentaram déficit no reconhecimento do objeto novo (IRO=0,543±0,02) (Teste t uma amostra, $t(8)=1,993$; $p=0,086$), o que não foi observado nos animais que receberam injeção de PBS e foram tratados com dieta controle (IRO=0,732±0,03) (Teste t uma amostra, $t(9)=5,84$; $p=0,0004$) e no grupo que recebeu injeção de PBS e foram tratados com dieta colesterol (IRO=0,665±0,03) (Teste t uma amostra, $t(8)=4,19$; $p=0,004$). Além disso, o colesterol acrescentado à dieta foi capaz de prevenir o déficit cognitivo induzido pela microinjeção de $A\beta_{1-42}$ (IRO=0,730±0,04) (Teste t uma amostra, $t(5)=5,50$; $p=0,0053$) (Figura 8B).

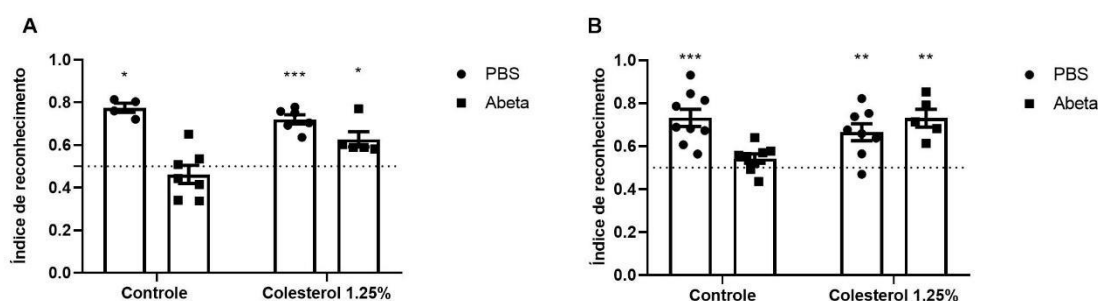


Figura 8: Tarefa de reconhecimento de objeto em animais C57BL/6 que receberam dieta controle ou colesterol, seguido de microinjeção de PBS ou $A\beta_{1-42}$. A - Protocolo 24 h; B - Protocolo 7 d. Teste t para uma amostra, considerando a média teórica de 0.5. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$.

4.1.2 Colesterol melhora o déficit cognitivo em animais APP/PS1

Tendo em mente os resultados obtidos a partir da TRO nos modelos de microinjeção intrahipocampal de $A\beta_{1-42}$, decidimos investigar o efeito do colesterol acrescentado à dieta em animais transgênicos, já que esses modelos representam as características comportamentais observadas em pacientes com DA e, por isso, são mais utilizados. Nos animais machos, foi observado déficit cognitivo nos animais APP/PS1 tratados com dieta controle (IRO=0,581±0,06) (Teste t uma amostra, $t(8)=1.241$; $p=0,2544$), mas não nos WT tratados com dieta controle (IRO=0,698±0,06) (Teste t uma amostra, $t(6)=2,951$; $p=0,0319$) ou dieta colesterol (IRO=0,755±0,02) (Teste t uma amostra, $t(9)=8,881$; $p<0,0001$). De forma interessante, a dieta com colesterol previniu o déficit cognitivo nos animais APP/PS1 (IRO=0,688±0,04) (Teste t uma amostra, $t(6)=4,341$; $p=0,0074$) (Figura 9A). Para evitar possíveis implicações da perda de peso ou comprometimento da capacidade locomotora na avaliação comportamental, também avaliamos a distância total percorrida no teste de campo aberto e não notamos diferença para essa variável entre os grupos que receberam dieta colesterol, APP/PS1 ou WT e seus respectivos controles (ANOVA dois critérios; $F(1,25)$ interação=2,961, $p=0,097$; $F(1,25)$ genótipo=0,121, $p=0,730$; $F(1, 25)$ dieta=0,220, $p=0,643$) (Anexo A).

Nas fêmeas, foi observado déficit cognitivo nos animais APP/PS1 tratados com dieta controle (IRO=0,616±0,05) (Teste t uma amostra, $t(5)=1,992$; $p=0,1172$), quando comparado com 50% de reconhecimento, enquanto as fêmeas WT tratadas com dieta controle (IRO=0,771±0,01) (Teste t uma amostra, $t(5)=16,82$; $p<0,0001$) e WT tratadas com dieta colesterol (IRO=0,680±0,03) (Teste t uma amostra, $t(8)=4,699$; $p=0,0022$), foram capazes de distinguir o objeto novo. No entanto, para as fêmeas APP/PS1, a dieta com colesterol foi capaz de prevenir o déficit cognitivo (IRO=0,664±0,02) (Teste t uma amostra, $t(8) =6,205$; $p= 0,0004$) (Figura 9B).

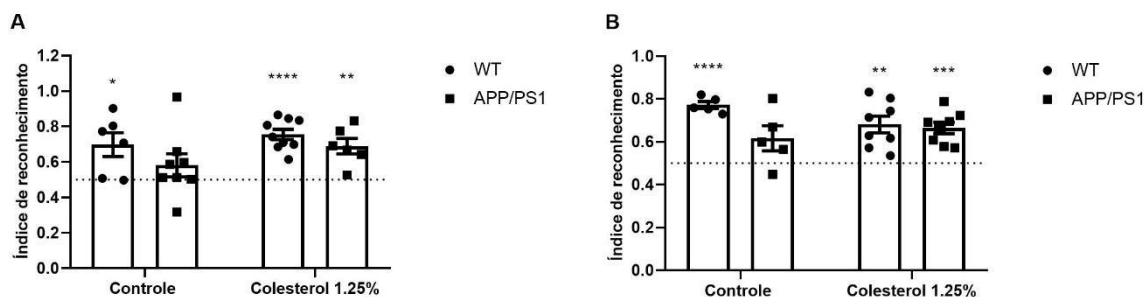


Figura 9: Tarefa de reconhecimento de objeto em animais APP/PS1 e WT, machos (A) e fêmeas (B) que receberam dieta controle ou colesterol. Teste t para uma amostra, considerando a média teórica de 0.5. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.2 Efeito do colesterol sobre a imunomarcação por NeuN no hipocampo de animais APP/PS1 machos

Tendo em vista que a dieta com colesterol reduziu o déficit cognitivo, decidimos avaliar o mecanismo responsável por esse efeito. Para isso, avaliamos a viabilidade neuronal através da quantificação da densidade óptica da imunomarcação por NeuN no hipocampo. Não observamos alteração na densidade óptica no giro denteado entre animais APP/PS1 e WT e o tratamento dos animais com dieta colesterol também não foi capaz de alterar essa marcação (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=0,1897, $P=0,6679$; $F(1,20)$ genótipo=0,1573, $P=0,6958$; $F(1,20)$ dieta=0,07730, $P=0,7838$) (Figura 10A). Também não foi possível observar qualquer tipo de perda neuronal através desta técnica para qualquer um dos grupos experimentais avaliados em CA1 do hipocampo (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=0,5374, $P=0,4720$; $F(1,20)$ genótipo=1.284, $P=0,2706$; $F(1, 20)$ dieta=3,116, $P=0,0928$) (Figura 10B).

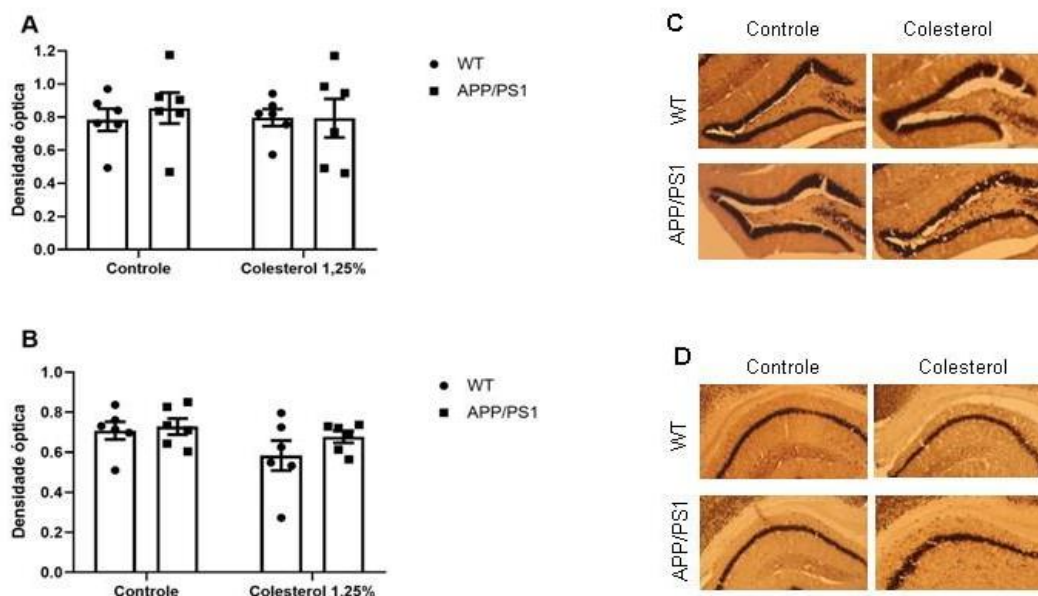


Figura 10: Efeitos do tratamento com colesterol sobre a imunomarcação por NeuN no hipocampo de animais APP/PS1 ou WT, machos. A – Densidade óptica da camada granular do GD do hipocampo. B – Densidade óptica da camada piramidal de CA1 do hipocampo. C e D - Fotomicrografias representativas da imunomarcação por NeuN no GD e em CA1 do hipocampo, respectivamente. Objetiva de 10x. Escala = 250 μ . ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey.

4.3 Efeito do colesterol sobre a plasticidade sináptica

Para avaliar a perda de sítios pré e/ou pós-sinápticos, hipocampus de animais APP/PS1 machos foram utilizados para avaliação da expressão da proteína de densidade pós-sináptica, PSD95, e do marcador pré-sináptico, sintaxina 1A. Os animais APP/PS1 não apresentaram diferença na expressão de PSD95 (Figura 11A) (ANOVA dois critérios; $F(1,24)$ interação=0,440, $p=0,513$; $F(1,24)$ dieta=0,208; $p=0,651$; $F(1,24)$ genótipo=1,643, $P=0,212$) ou na expressão de sintaxina 1A (Figura 11B) (ANOVA dois critérios; $F(1,24)$ interação=0,052, $p=0,821$; $F(1,24)$ dieta=0,010; $p=0,920$; $F(1,24)$ genótipo=0,118, $P=0,733$).

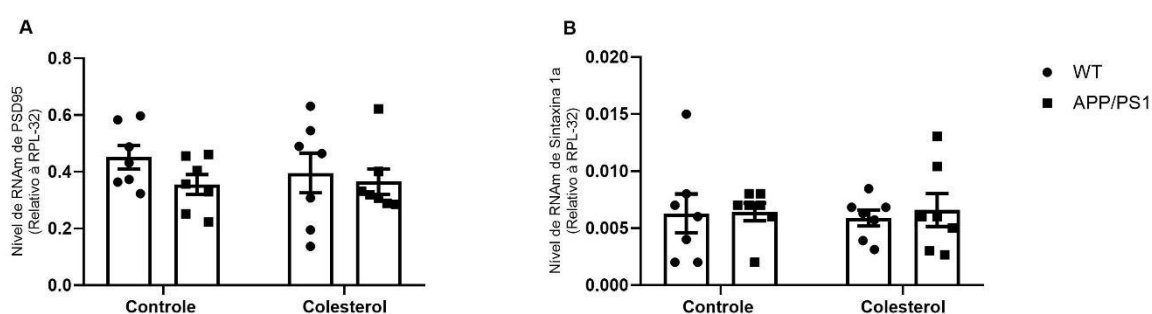


Figura 11: Efeito do tratamento com colesterol sobre a expressão de mRNA de PSD-95 (A) e Sintaxina 1A (B) em hipocampo de animais APP/PS1 machos, determinados por RT-PCR quantitativo. ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey.

4.4 Efeito do colesterol sobre a imunomarcção por ThioS

Tendo em vista que as placas amiloides são uma característica histopatológica importante no diagnóstico da DA, realizamos a identificação das placas no hipocampo de animais APP/PS1 machos, através da imunomarcção por ThioS. Observamos acúmulo de placas amiloides em animais APP/PS1 (Figura 12A-D). Também observamos que o colesterol acrescido à dieta foi capaz de reduzir o acúmulo de placas observadas no hipocampo de animais APP/PS1 (ANOVA dois critérios; $F(1,22)$ interação=7,330, $p=0,012$; $F(1,22)$ dieta=5,112; $p=0,034$; $F(1,22)$ genótipo=57,28, $P < 0,0001$) (Figura 12A-E).

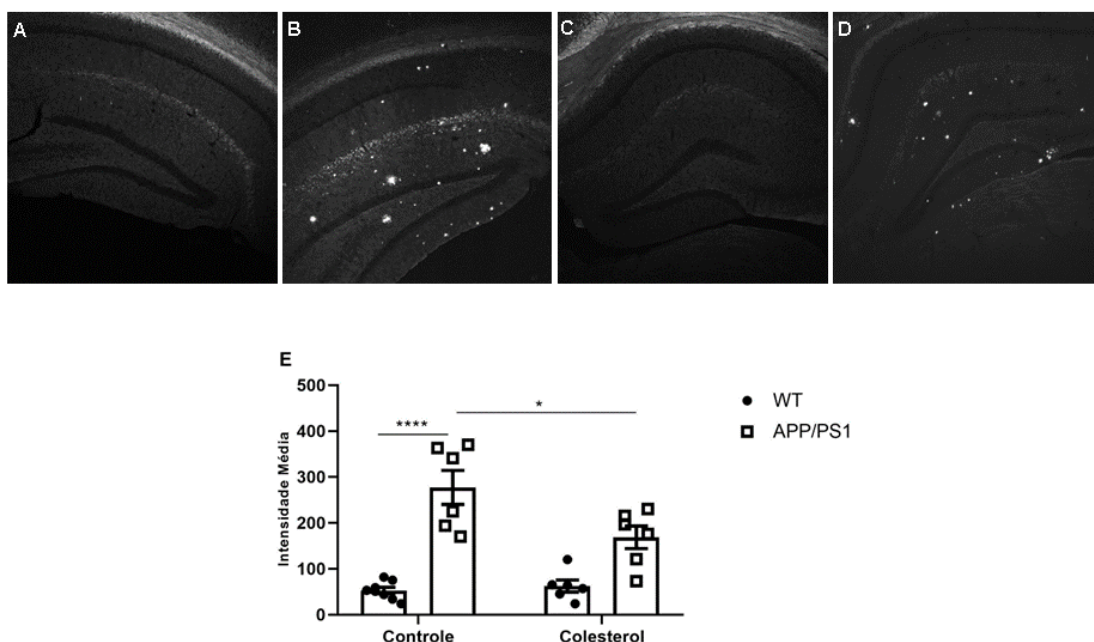


Figura 12: Efeito do colesterol na dieta sobre a imunomarcagem de placas amiloides. A - D: fotomicrografias representativas da imunomarcagem em animais WT dieta controle, APP/PS1 dieta controle, WT dieta colesterol e APP/PS1 dieta colesterol, respectivamente. Objetiva de 5x. E- Intensidade média da imunomarcagem no hipocampo. ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

4.5 Efeito do colesterol sobre a concentração de fatores neurotróficos

Sabendo do papel importante dos fatores neurotróficos na sobrevivência neuronal, avaliamos a concentração de BDNF, NGF e GDNF no hipocampo de animais APP/PS1, machos e fêmeas e animais C57BL/6 machos, submetidos à microinjeção intrahipocampal (PBS ou $A\beta_{1-42}$) 7 dias antes do teste (Protocolo 7 d).

4.5.1 Colesterol alterou a concentração de fatores neurotróficos no hipocampo

Observamos um aumento na concentração de BDNF nos animais APP/PS1 machos que receberam dieta controle, comparados aos WT, e uma diminuição na concentração de BDNF nos animais APP/PS1 machos que receberam dieta colesterol, em comparação aos animais APP/PS1 que receberam dieta controle (ANOVA dois critérios; $F(1,23)$ interação=3,052, $p=0,0940$; $F(1,23)$ genótipo=0,0671; $p=0,7978$; $F(1,23)$ dieta=5,373, $p=0,0297$) (Figura 13A). O colesterol não foi capaz de induzir alterações na concentração de GDNF nesses mesmos animais (Figura 13B). No entanto, observamos um aumento na

concentração de GDNF no hipocampo dos animais WT que receberam colesterol, em comparação com os animais que receberam dieta controle (ANOVA dois critérios; $F(1,23)$ interação=3,052, $p=0,0940$; $F(1,23)$ genótipo=0,0671; $p=0,7978$; $F(1,23)$ dieta=5,373, $p=0,0297$) (Figura 13C).

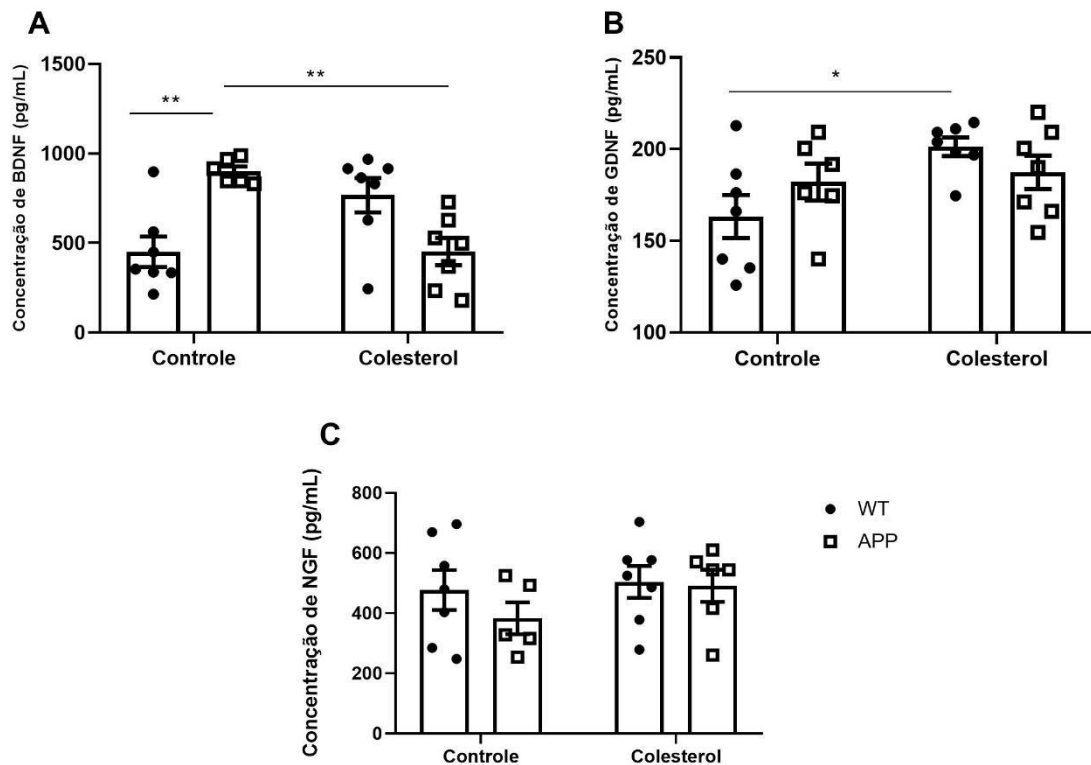


Figura 13: Efeito do colesterol sobre as concentrações de fatores neurotróficos no hipocampo de animais APP/PS1 ou WT machos. A - Concentração de BDNF. B - Concentração de GDNF. C - Concentração de NGF. ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Quanto às fêmeas, observamos um aumento de BDNF no hipocampo dos animais APP/PS1, quando comparados aos animais WT que receberam dieta controle (ANOVA dois critérios; $F(1,21)$ interação=0,4044, $p=0,5317$; $F(1,21)$ genótipo=11,71; $p=0,1238$; $F(1,21)$ dieta=2,571, $p=0,1238$) (Figura 14A). No entanto, não observamos diferenças nas concentrações de GDNF e NGF (Figura 14B-C).

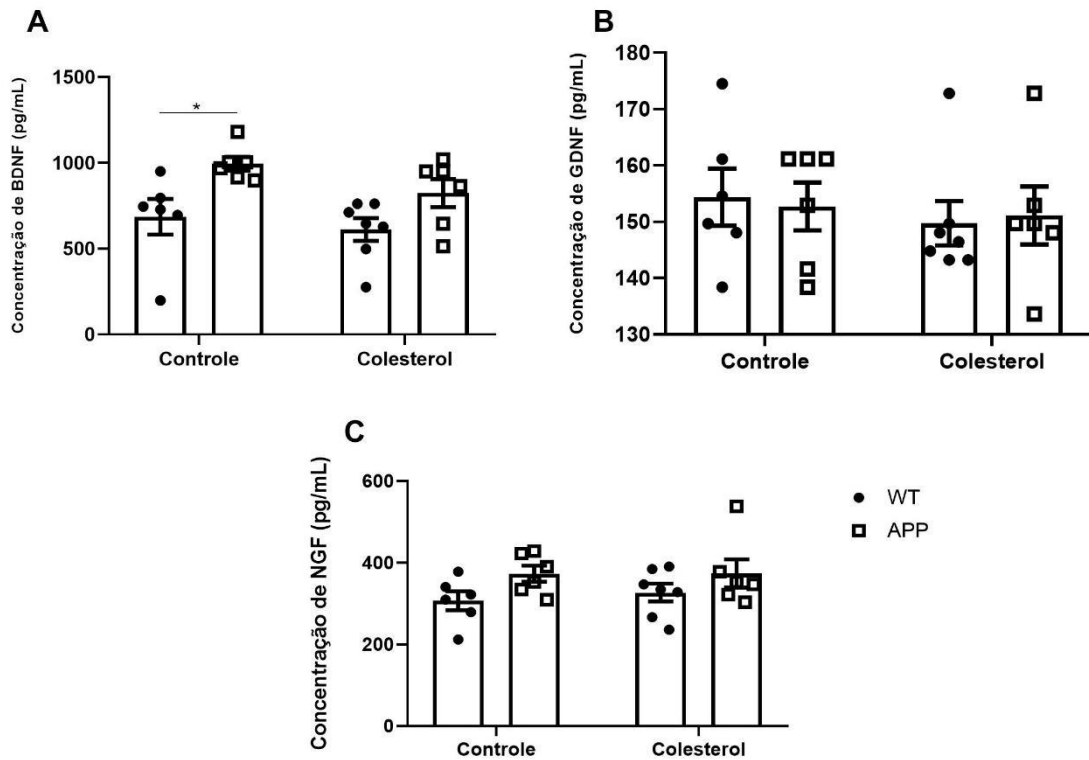


Figura 14: Efeito do colesterol sobre as concentrações de fatores neurotróficos no hipocampo de animais APP/PS1 ou WT fêmeas. A - Concentração de BDNF. B - Concentração de GDNF. C - Concentração de NGF. ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$.

Nos animais C57BL/6 machos, submetidos ao protocolo de injeção de 7 d, não observamos diferenças nas concentrações de BDNF (Figura 15^a) e NGF (Figura 15C). No entanto, observamos que o colesterol na dieta aumentou os níveis de GDNF no hipocampo dos animais injetados com PBS, quando comparados aos animais que receberam dieta controle (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=8,242, $p=0,0094$; $F(1,20)$ injeção=3,519; $p=0,0753$; $F(1,20)$ dieta=35,85 $p < 0,0001$) (Figura 15C).

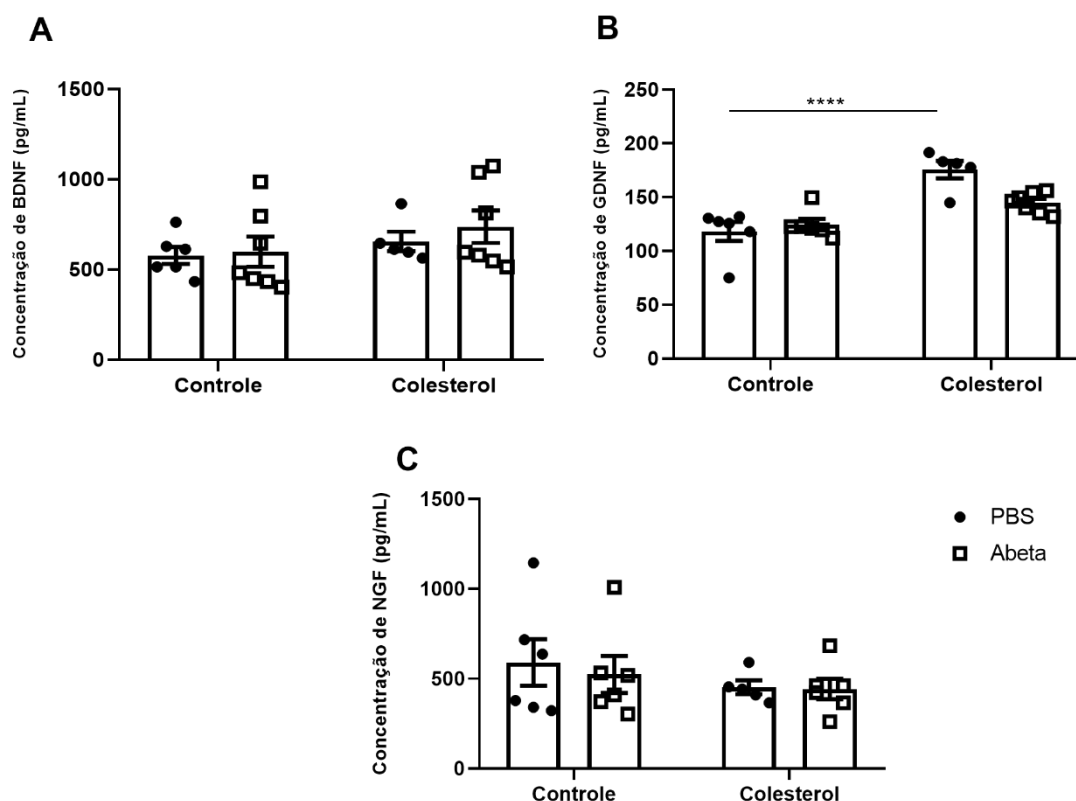


Figura 15: Efeito do colesterol sobre as concentrações de fatores neurotróficos no hipocampo animais C57BL/6 machos, submetidos ao protocolo de injeção de 7 d. A - Concentração de BDNF. B - Concentração de GDNF. C - Concentração de NGF. ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

4.6 Efeito do colesterol sobre a imunomarcagem por Iba-1

4.6.1 Colesterol reduziu a microgliose no hipocampo de animais APP/PS1 machos

No intuito de avaliar o efeito da dieta acrescida de colesterol sobre o perfil microglial no hipocampo, avaliamos a microgliose por imunomarcagem de Iba-1. Conforme representado na figura 16E, os animais APP/PS1 apresentaram uma marcação maior para Iba-1, quando comparados aos animais WT, que receberam dieta controle. Também observamos que o colesterol acrescido à dieta diminuiu a marcação de Iba-1 no hipocampo dos animais APP/PS1 quando comparados aos que receberam dieta controle e aumentou a microgliose, em animais WT quando comparados aos que receberam dieta controle (ANOVA dois critérios; $F(1,18)$ interação=35,38, $P < 0,0001$; $F(1,18)$ dieta=1,717; $P = 0,2066$; $F(1,18)$ genótipo=57,61, $P < 0,0001$).

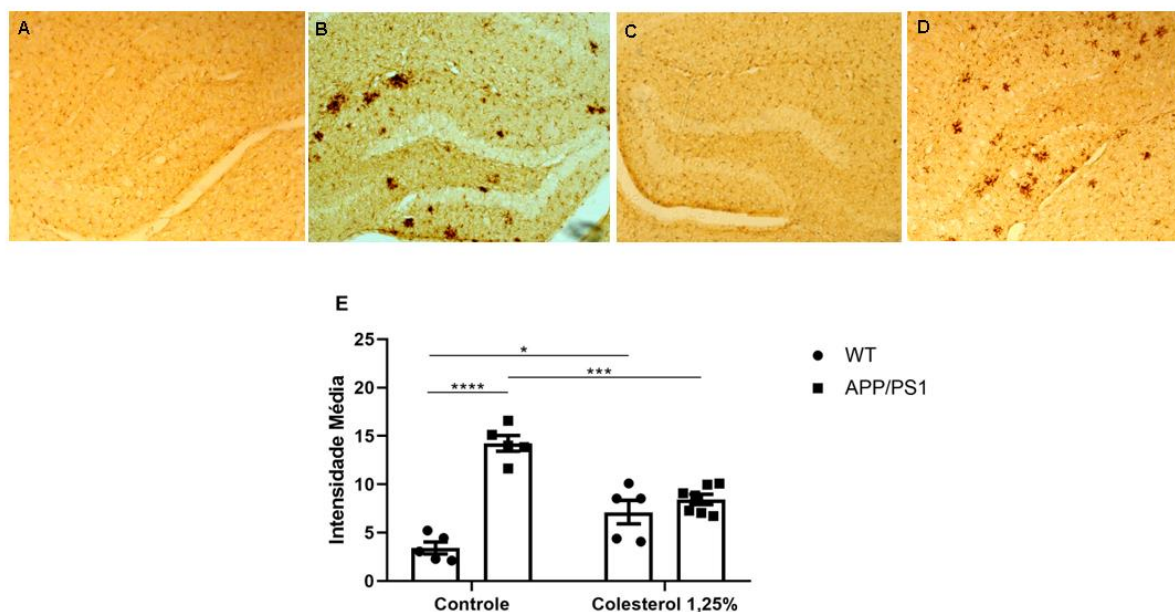


Figura 16: Efeito do colesterol sobre a microgliose no hipocampo de animais APP/PS1 e WT. A - D: fotomicrografias representativas da imunomarcação em animais WT dieta controle, APP/PS1 dieta controle, WT dieta colesterol e APP/PS1 dieta colesterol, respectivamente. Objetiva de 10x. Escala = 250 μ . E- Intensidade média da imunomarcação no hipocampo. ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.7 Efeito do colesterol sobre a concentração de citocinas

Para avaliar a possível contribuição das citocinas no processo neuroinflamatório presente na DA e o efeito da dieta acrescida de colesterol sobre esse perfil, dosamos as concentrações das citocinas IL-6, IL-10, TNF, IL-1 β e da quimiocina (CX3CL1) no hipocampo de animais APP/PS1 machos e fêmeas e animais C57BL/6 machos, submetidos à microinjeção intrahipocampal (PBS ou A β_{1-42}) 7 dias antes do teste (Protocolo 7 d).

4.7.1 Colesterol alterou a concentração citocinas no hipocampo

Observamos que os animais APP/PS1 machos apresentaram um aumento na concentração de IL-1 β , quando comparados aos WT que receberam dieta controle. Além disso, observamos que o colesterol na dieta promoveu uma diminuição na concentração de IL-1 β nos animais APP/PS1 (ANOVA dois critérios; $F(1,22)$ intera o=13,24, $p=0,0014$; $F(1,22)$ gen tipo=4,149; $p=0,0539$; $F(1,23)$ dieta=0,5385, $p=0,4708$) (Figura 17B). A dieta acrescida de colesterol também reduziu a concentração de CX3CL1 nos animais WT (Figura 17D), no entanto não observamos alterações na concentração de TNF (Figura 17E) (ANOVA

dois critérios; $F(1,23)$ interação=7,409, $p=0,0122$; $F(1,23)$ genótipo=0,0496; $p=0,8257$; $F(1,23)$ dieta=2,226, $p=0,1493$).

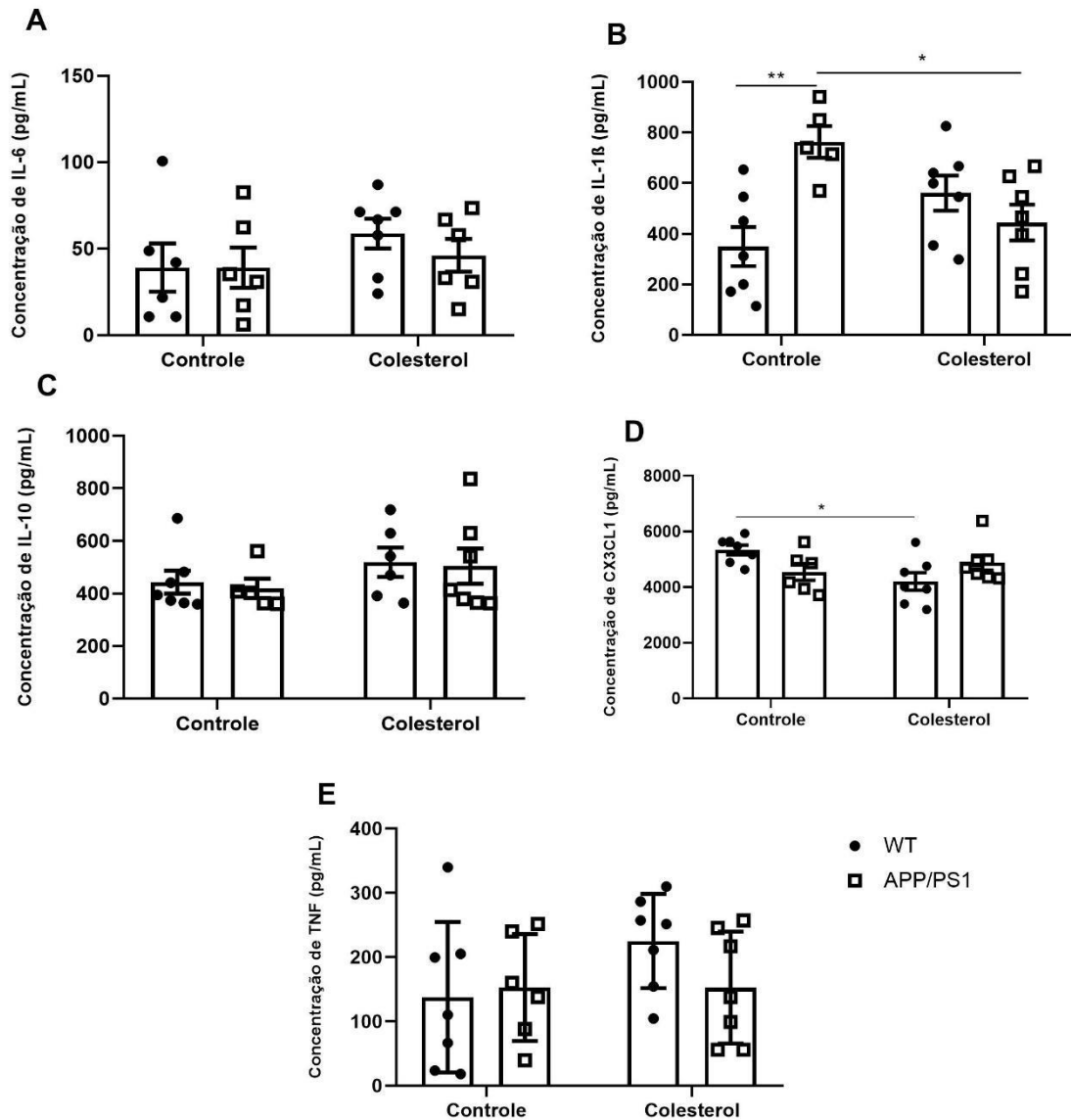


Figura 17: Efeito do colesterol sobre as concentrações de citocinas no hipocampo de animais APP/PS1 ou WT machos. A - Concentração de IL-6. B - Concentração de IL-1 β . C - Concentração de IL-10. D - Concentração de CX3CL1. E - Concentração de TNF. ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Quanto aos animais APP/PS1 fêmeas, não observamos diferenças nas concentrações de IL-6, IL-1 β , IL-10 e TNF (Figura 18 A-C, E). No entanto, o colesterol promoveu um aumento na concentração de CX3CL1 nos animais APP/PS1 e nos animais WT, quando comparados aos mesmos animais que receberam dieta controle (ANOVA dois

critérios; $F(1,21)$ interação=0,0009, $p=0,9216$; $F(1,21)$ genótipo=11,53; $p=0,0027$; $F(1,21)$ dieta=17,67 $p=0,0004$) (Figura 18D).

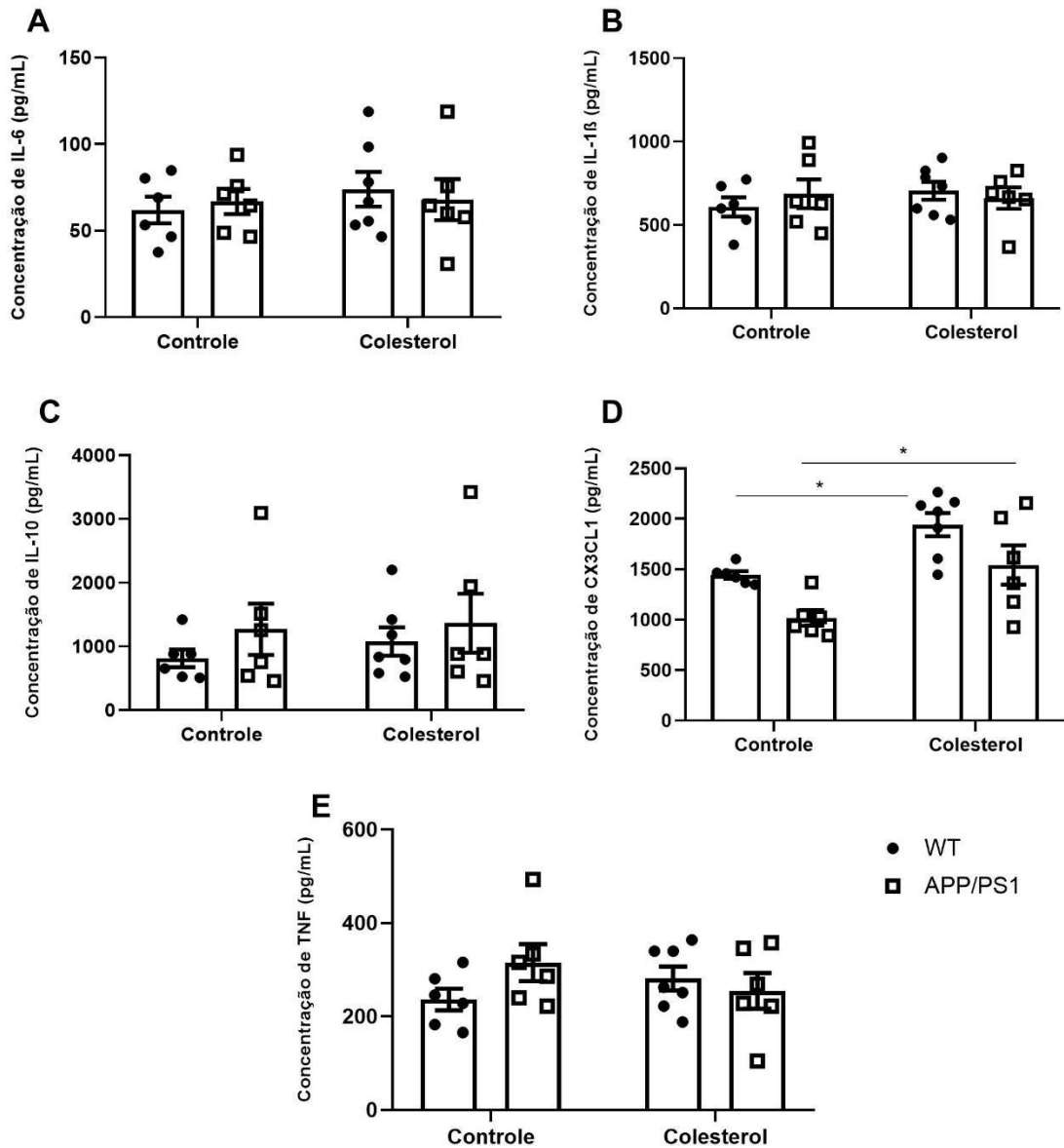


Figura 18: Efeito do colesterol sobre as concentrações de citocinas no hipocampo de animais APP/PS1 ou WT fêmeas. A - Concentração de IL-6. B - Concentração de IL-1 β . C - Concentração de IL-10. D - Concentração de CX3CL1. E - Concentração de TNF. ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p<0,05$.

É importante lembrar que conforme descrito no item 4.7, a dosagem da concentração de citocinas e da quimiocina (CX3CL1), foi realizada apenas nos animais

C57BL/6 machos, submetidos à microinjeção intrahipocampal (PBS ou A β_{1-42}) 7 dias antes do teste (Protocolo 7 d).

Observamos que nos animais que receberam colesterol, e foram injetados com A β_{1-42} , houve uma redução na concentração de IL-1 β quando comparados aos animais que receberam dieta controle (ANOVA dois critérios; F(1,19) interação=5,754, $p=0,0269$; F(1,19) injeção=8,696; $p=0,0082$; F(1,19) dieta=5,731 $p=0,0271$) (Figura 19B). Assim como, observamos um aumento de CX3CL1 no hipocampo de animais injetados com PBS que receberam dieta colesterol, quando comparados aos animais que receberam dieta controle (ANOVA dois critérios; F(1,22) interação=0,6437, $p=0,4310$; F(1,22) injeção=3,961; $p=0,0591$; F(1,22) dieta=16,38 $p=0,0005$) (Figura 19D). Não observamos diferenças nas concentrações de IL-6 (Figura 19A), IL-10 (Figura 19C) ou TNF (Figura 19E).

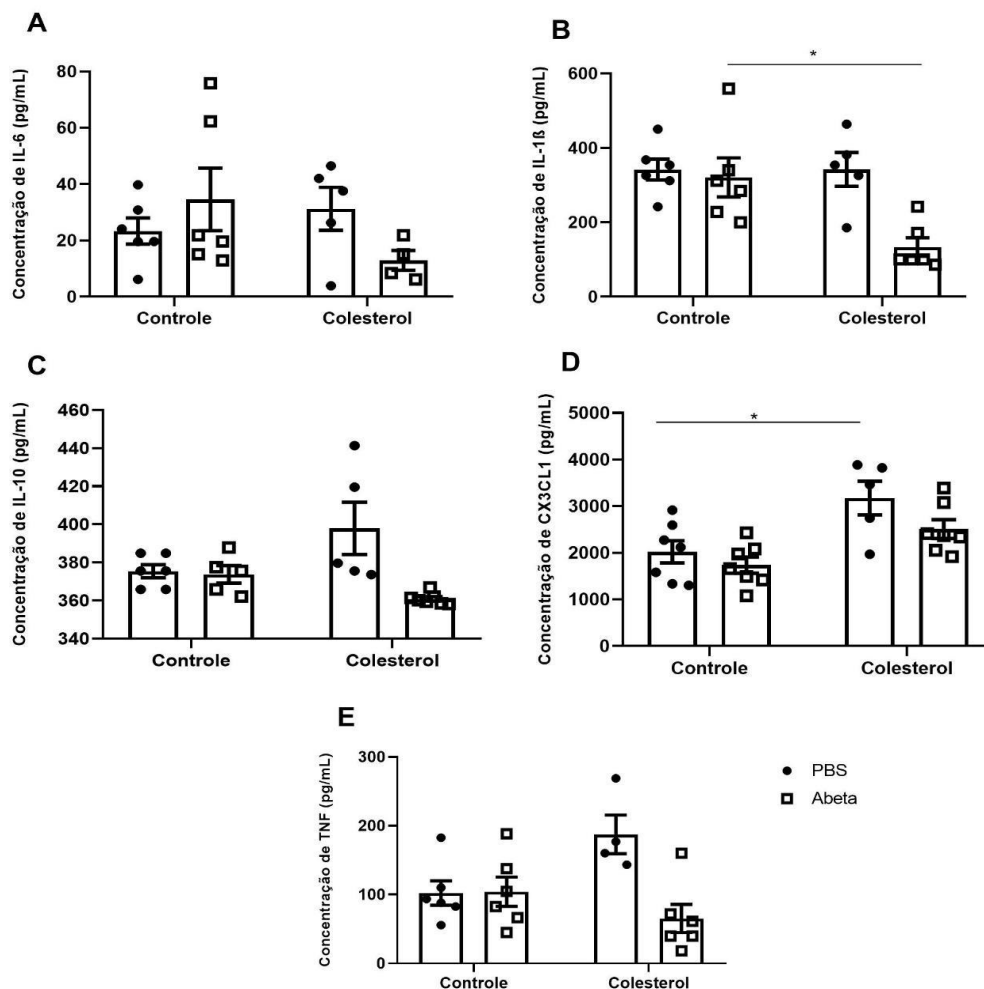


Figura 19: Efeito do colesterol sobre as concentrações de citocinas no hipocampo de animais C57BL/6 machos, submetidos ao protocolo de injeção de 7 d. A - Concentração de IL-6. B - Concentração de IL-1 β . C - Concentração de IL-10. D - Concentração de CX3CL1. E - Concentração de TNF. ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

4.8 Efeitos do colesterol sobre o peso e adiposidade corporal

4.8.1 Colesterol não altera o peso corporal e índice de adiposidade dos animais

A alteração de nutrientes na dieta pode alterar parâmetros como a massa corporal ou a adiposidade corporal. Nesse sentido, avaliamos se a dieta acrescida de colesterol era capaz de influenciar nesses parâmetros, tanto nos animais tratados com microinjeção hipocampal de $A\beta_{1-42}$, quanto nos animais APP/PS1.

Conforme mostra a figura 20 (A-B), não houve diferença significativa no peso dos animais APP/PS1, ou WT, machos ou fêmeas, após 16 semanas de dieta padrão ou acrescida de colesterol. Também não houve alteração no índice de adiposidade corporal dos animais (Figura 20C-D).

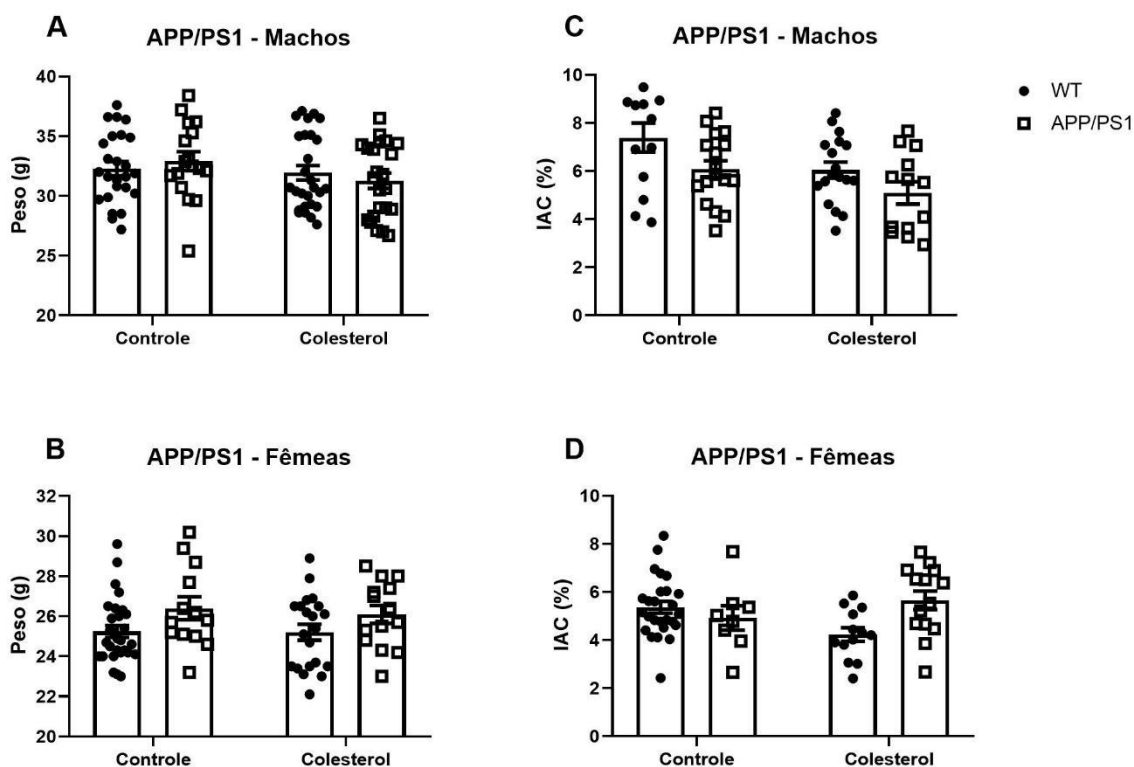


Figura 20: Efeito do colesterol sobre o peso corporal e índice de adiposidade de animais APP/PS1 ou WT, machos (A e C, respectivamente) e fêmeas (B e D, respectivamente). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey.

Da mesma forma, nenhuma alteração foi observada em relação ao peso corporal ou índice de adiposidade corporal, nos animais submetidos ao protocolo 24 h ou 7 d (Figura 21).

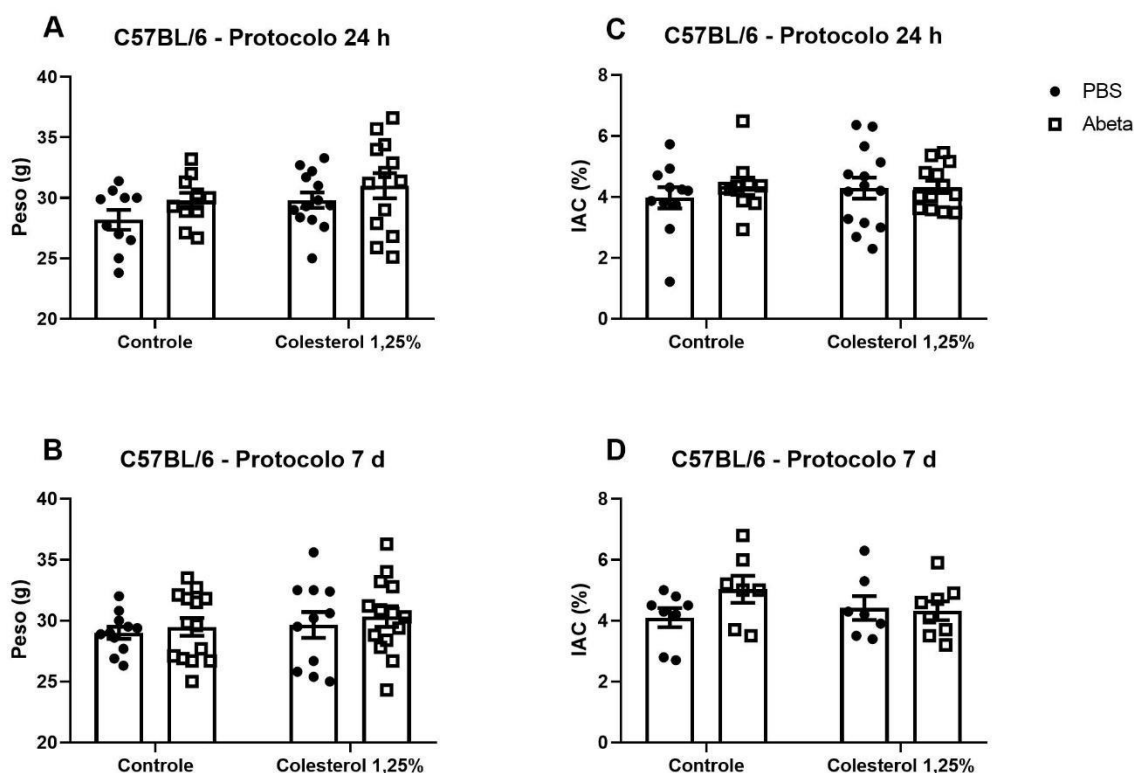


Figura 21: Efeito do colesterol sobre o peso corporal e índice de adiposidade de animais C57BL/6, submetidos ao protocolo de injeção Protocolo 24 h (A e C, respectivamente) e 7 d (B e D, respectivamente). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey.

4.9 Efeito do colesterol sobre os lipídeos no soro

4.9.1 Colesterol acrescentado à dieta não aumentou níveis de colesterol total

Como os animais foram alimentados com uma dieta acrescida somente de colesterol, decidimos avaliar a concentração sérica de colesterol total e triglicerídeos nos animais C57BL/6, submetidos aos dois protocolos de injeção de $A\beta_{1-42}$ e também nos animais APP/PS1. Nos animais APP/PS1, observamos influência do fator dieta na dosagem do colesterol total [fator dieta vs genótipo ($F(1,39)=0,0025$; ns), fator genótipo ($F(1,39)=0,1693$; ns) e fator dieta ($F(1,39)=11,79$; $p=0,0014$)]. Nesse sentido, a dosagem de colesterol foi significativamente menor para os animais WT que receberam dieta acrescida de colesterol, quando comparados aos que receberam dieta controle (ANOVA dois critérios, $F=1,39$, $P=0,0014$; pós-teste de Tukey) (Figura 22A). Por outro lado, nos animais C57BL/6, não houve diferença estatística no nível de colesterol total entre os grupos de animais que foram submetidos à microinjeção hipocampal de $A\beta_{1-42}$, realizada 24 horas antes do teste (Protocolo 24 h) [fator dieta vs injeção ($F(1,19)=1,416$; ns), fator injeção ($F(1,19)=0,2293$; ns) e fator dieta ($F(1,19)=3,705$; ns) Figura 22B]. No entanto, o colesterol acrescentado à dieta diminuiu os níveis

de colesterol total no soro dos animais que foram submetidos à microinjeção hipocampal de PBS 7 dias antes do teste, quando comparados aos mesmos animais que receberam dieta controle (Protocolo 7 d) [fator dieta vs injeção ($F(1,18)=7,120$; $p=0,0157$), fator injeção ($F(1,18)=10,29$; $p=0,0049$) e fator dieta ($F(1,18)=32,91$; $p<0,0001$)] (Figura 22C).

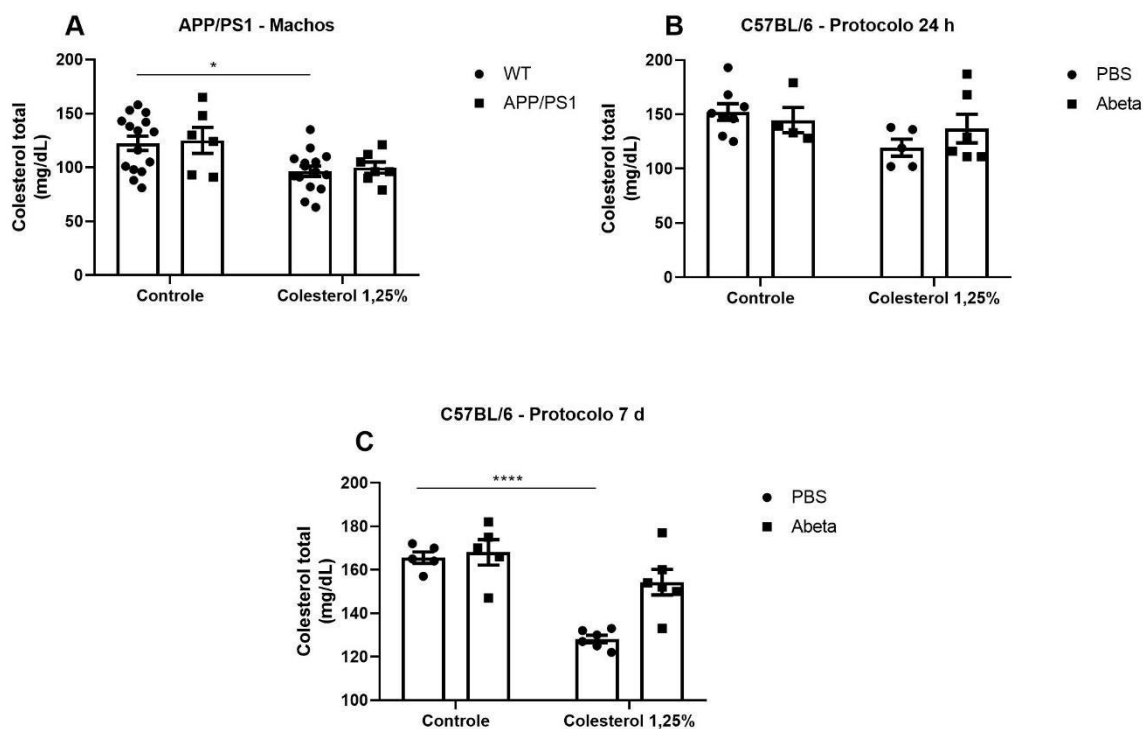


Figura 22: Níveis séricos de colesterol em animais que receberam dieta controle ou acrescida de colesterol, APP/PS1 ou WT, machos (A); e C57BL/6 dos protocolos 24 h (B) e 7 d (C). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

4.9.2 Colesterol acrescido à dieta alterou níveis de triglicerídeos no soro

Ainda acerca do perfil lipídico no soro, avaliamos o nível de triglicerídeos. Houve diminuição desses lipídeos no grupo de animais WT, machos, que receberam dieta colesterol, quando comparados aos que receberam dieta controle (ANOVA dois critérios; $F(1,37)$ interação=4,768, $p=0,0354$; $F(1,37)$ genótipo=0,0323; $p=0,8583$; $F(1,37)$ dieta=0,5595, $p=0,4592$) (Figura 23A). Para os animais C57BL/6 que foram submetidos ao primeiro protocolo de injeção (24 h), percebemos que os grupos que receberam colesterol apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de triglicerídeos, em relação aos grupos que receberam dieta controle [fator dieta vs injeção ($F(1,14)=0,2567$; ns), fator injeção ($F(1,14)=0,5643$; ns) e fator dieta ($F(1,14)=22,97$; $p=0,003$) (Figura 23B). Para os animais que

foram submetidos ao segundo protocolo de injeção de $A\beta_{1-42}$ (7 d) não houve alteração significativa no nível de triglicerídeos (Figura 23C).

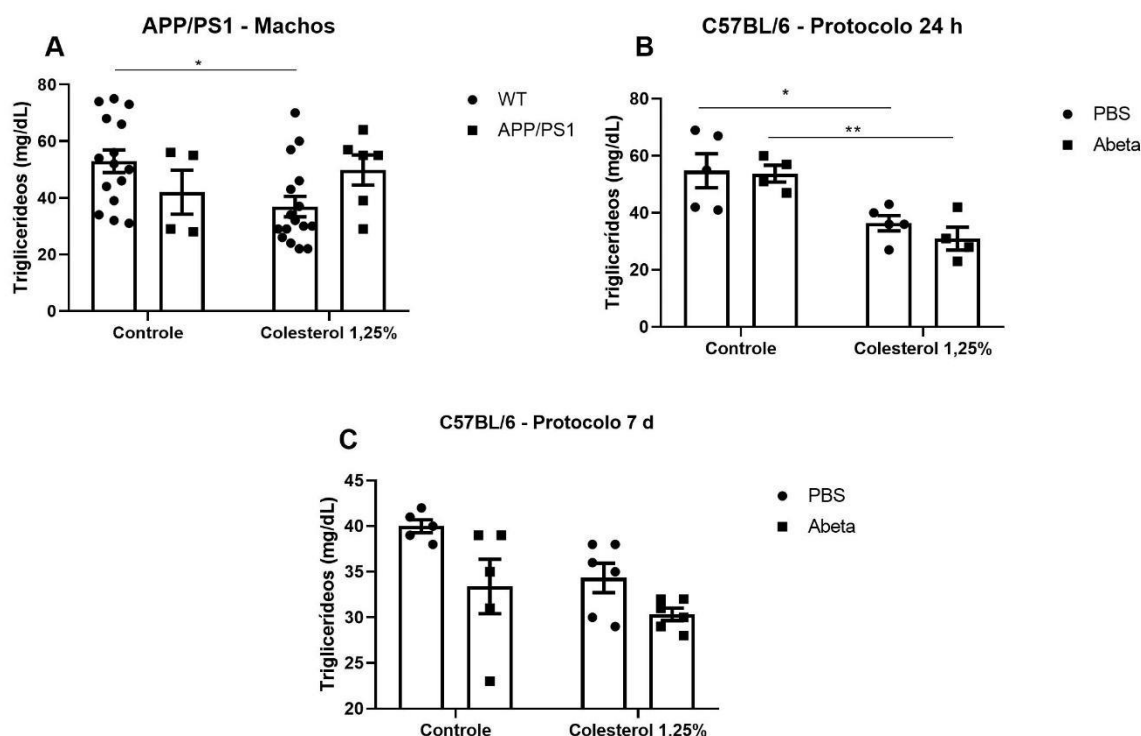


Figura 23: Níveis séricos de triglicerídeos em animais que receberam dieta controle ou acrescida de colesterol, APP/PS1 ou WT, machos (A); e C57BL/6 dos protocolos 24 h (B) e 7 d (C). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. *p<0,05, **p<0,01.

4.10 Efeitos da dieta sobre o fígado

Levando-se em conta que o fígado é o órgão central envolvido no metabolismo do colesterol e que, no presente trabalho o aporte deste lipídio estava aumentado devido à sua maior ingestão, realizamos algumas avaliações no tecido hepático.

4.10.1 Colesterol acrescido à dieta aumenta a razão peso do fígado/peso corporal

A seguir, avaliamos a razão peso do fígado/ peso corporal dos animais. Não houve diferença entre os grupos de animais APP/PS1 e WT, ou animais que receberam injeção de PBS ou $A\beta_{1-42}$, que receberam dieta controle. No entanto, o tratamento com colesterol aumentou a razão peso do fígado / peso corporal dos animais entre os grupos APP/PS1 ou WT, machos ou fêmeas, assim como nos dois protocolos de injeção de $A\beta_{1-42}$ (Figura 24).

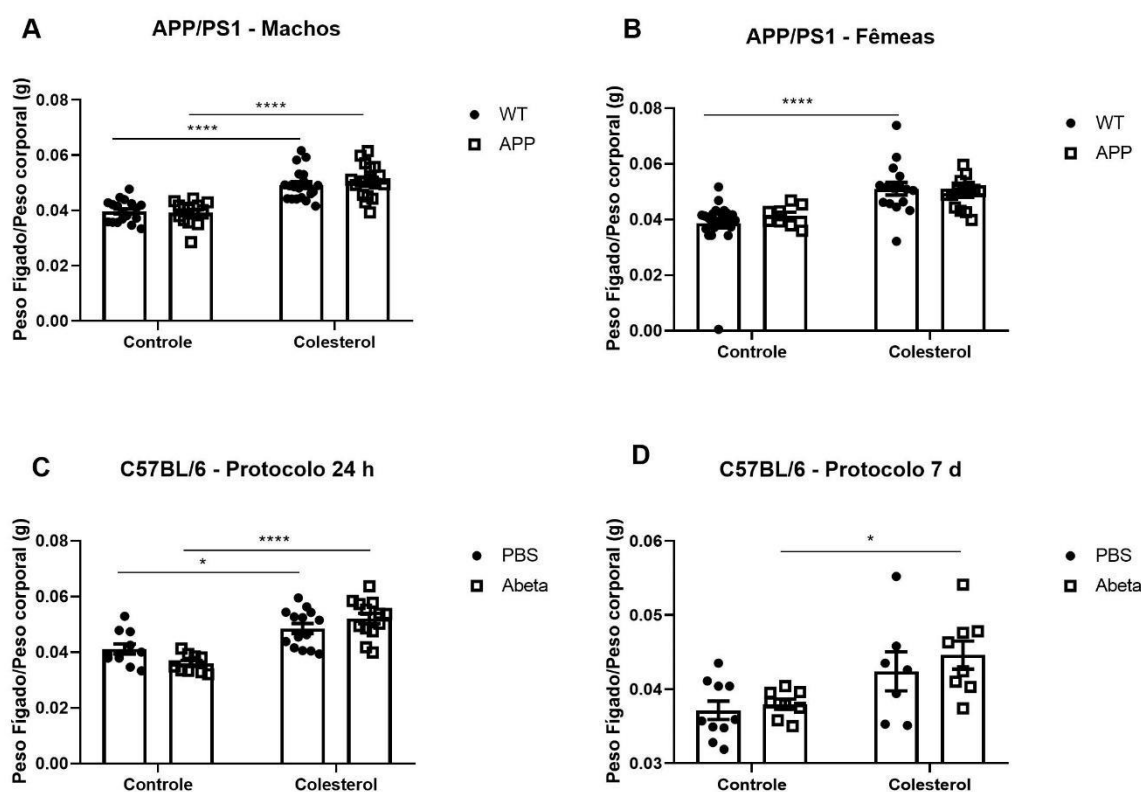


Figura 24: Efeito do colesterol sobre a razão peso do fígado/peso corporal de animais APP/PS1 ou WT, machos e fêmeas (A e B, respectivamente); e C57BL/6 dos protocolos 24 h (C) e 7 d (D). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

4.10.2 Dieta acrescida de colesterol aumenta a quantidade de lipídeos totais no fígado

Apesar de uma tendência, não observamos alterações significativas entre os grupos de animais APP/PS1, machos, que receberam dieta acrescida de colesterol (ANOVA dois critérios; $F(1,19)$ interação=0,0727, $P=0,7903$; $F(1,19)$ genótipo=0,0082, $P=0,7774$; $F(1,19)$ dieta=4,810, $p=0,0409$) (Figura 25A). No entanto, a dieta acrescida de colesterol aumentou os lipídeos totais hepáticos nas fêmeas APP/PS1 e WT (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=0,4481, $P=0,5109$; $F(1,20)$ genótipo=0,6257, $P=0,4382$; $F(1,20)$ dieta=71,66, $P < 0,0001$) (Figura 25B).

Observamos um aumento nos lipídeos totais dos animais que receberam dieta colesterol, quando comparados aos animais que receberam dieta controle, tanto injetados com PBS quanto com $A\beta_{1-42}$, no protocolo 24 h (ANOVA dois critérios; $F(1,19)$ interação=0,1965, $p=0,6626$; $F(1,19)$ injeção=2,696; $p=0,1170$; $F(1,19)$ dieta=0,406; $p < 0,0001$) (Figura 25C) e no 02 (ANOVA dois critérios; $F(1,19)$ interação=2,066, $P=0,1669$; $F(1,19)$ injeção=10,40; $P=0,0045$; $F(1,19)$ dieta=82,43, $P < 0,0001$) (Figura 25D).

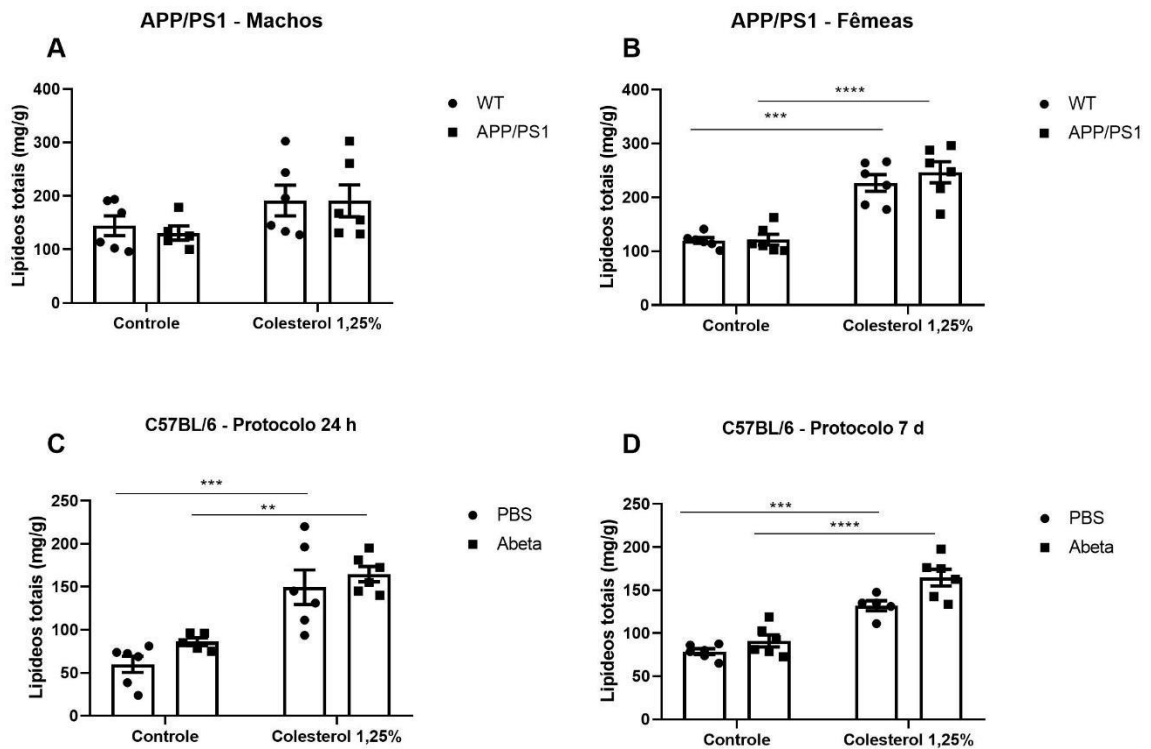


Figura 25: Níveis de lipídeos totais hepáticos de animais APP/PS1 ou WT, machos e fêmeas (A e B, respectivamente); e C57BL/6 dos protocolos 24 h (C) e 7 d (D). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. **p<0,01; ***p<0,001, ****p<0,0001.

4.10.3 Dieta acrescida de colesterol aumenta a concentração de colesterol hepático

O colesterol adicionado à dieta aumentou a concentração hepática deste lipídeo em todos os grupos APP/PS1 ou WT, machos ou fêmeas, e também em ambos os protocolos realizados com os animais C57BL/6, quando comparados aos animais que receberam dieta controle (Figura 26).

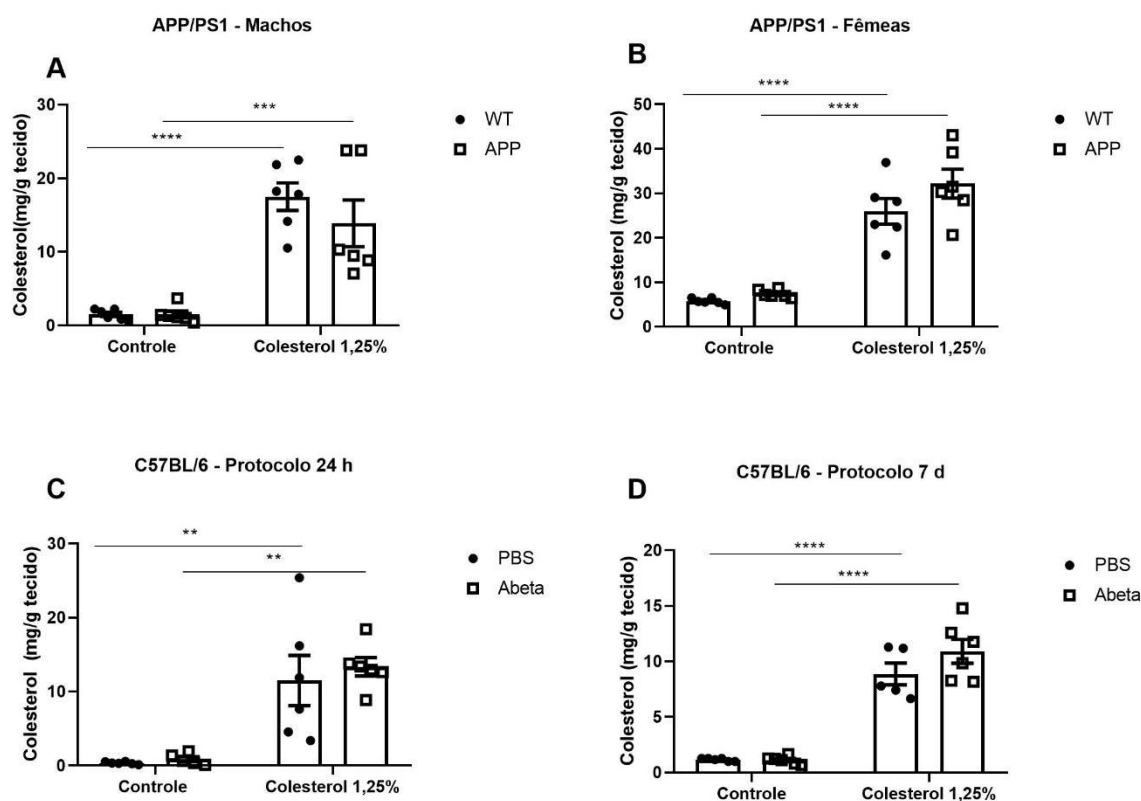


Figura 26: Concentração de colesterol hepático de animais APP/PS1 ou WT, machos e fêmeas (A e B, respectivamente); e C57BL/6 dos protocolos 24 h (C) e 7 d (D). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.10.4 Dieta acrescida de colesterol aumenta a concentração de triglicerídeos no fígado

Ainda em relação ao conteúdo lipídico hepático, houve um aumento na concentração de triglicerídeos no fígado dos animais alimentados com dieta acrescida de colesterol em todos os grupos APP/PS1 ou WT, machos ou fêmeas, e também nos animais C57BL/6, submetidos aos dois protocolos de injeção de $A\beta_{1-42}$, quando comparados aos animais que receberam dieta controle (Figura 27).

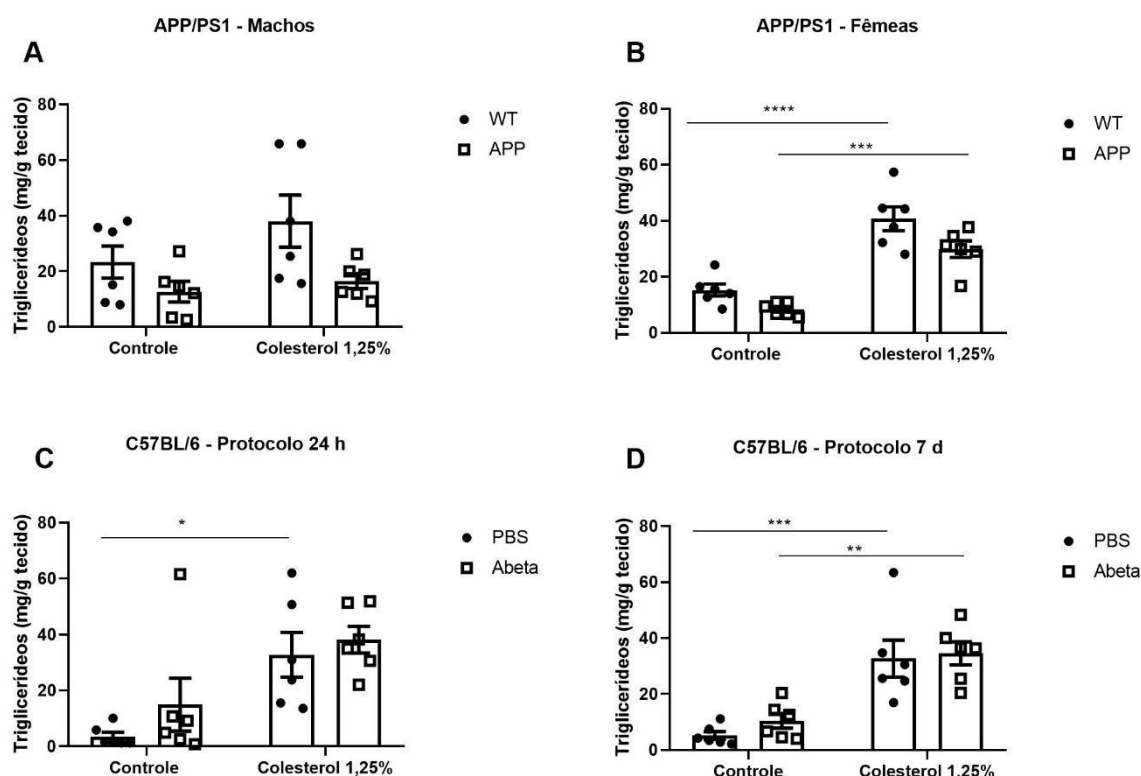


Figura 27: Concentração de triglicerídeos hepáticos de animais APP/PS1 ou WT, machos e fêmeas (A e B, respectivamente); e C57BL/6 dos protocolos 24 h (C) e 7 d (D). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.10.5 Efeito do colesterol sobre os marcadores do estresse oxidativo no fígado

Com o objetivo de avaliar se o colesterol na dieta promoveu um aumento no estresse oxidativo hepático, realizamos a medida da peroxidação lipídica e dosamos a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase no fígado dos animais. Não observamos alteração na atividade das enzimas CAT (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=0,0215, $p=0,884$; $F(1,20)$ genótipo=0,001; $p=0,966$; $F(1,20)$ dieta=0,077=0,784) (Figura 28A) ou SOD (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=0,537, $p=0,472$; $F(1,20)$ genótipo=0,028; $p=0,868$; $F(1,20)$ dieta=0,113=0,740) (Figura 28B), bem como na peroxidação lipídica (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=0,212, $p=0,649$; $F(1,20)$ genótipo=4,368; $p=0,049$; $F(1,20)$ dieta=0,053=0,819) (Figura 28C) no fígado dos animais APP/PS1 machos que receberam dieta controle ou colesterol.

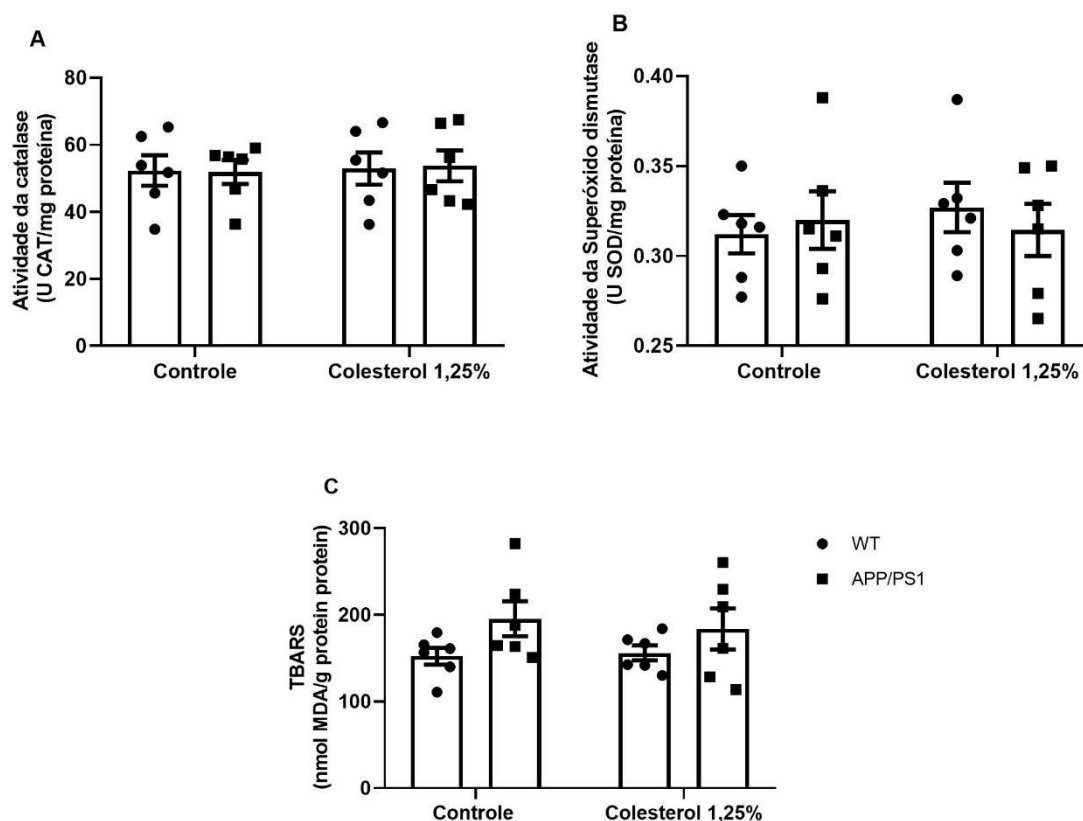


Figura 28: Atividade dos marcadores do estresse oxidativo no fígado de animais APP/WT machos. A- Atividade da catalase. B- Atividade da superóxido dismutase. C- Lipoperoxidação lipídica (TBARS). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey.

A dieta acrescida de colesterol não promoveu alteração na atividade da CAT (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=0,0623, $p=0,439$; $F(1,20)$ genótipo=1,881; $p=0,185$; $F(1,20)$ dieta=1,472=0,239) (Figura 29A) ou SOD (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=0,195, $p=0,663$; $F(1,20)$ genótipo=0,977; $p=0,334$; $F(1,20)$ dieta=2,194=0,154) nos animais APP/PS1 fêmeas (Figura 29B). No entanto, houve uma diminuição na peroxidação lipídica nos animais APP/PS1 que receberam colesterol, quando comparados aos animais APP/PS1 que receberam dieta controle (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=1,895, $p=0,1839$; $F(1,20)$ genótipo=0,008; $p=0,925$; $F(1,20)$ dieta=8,337; $p=0,009$) (Figura 29C).

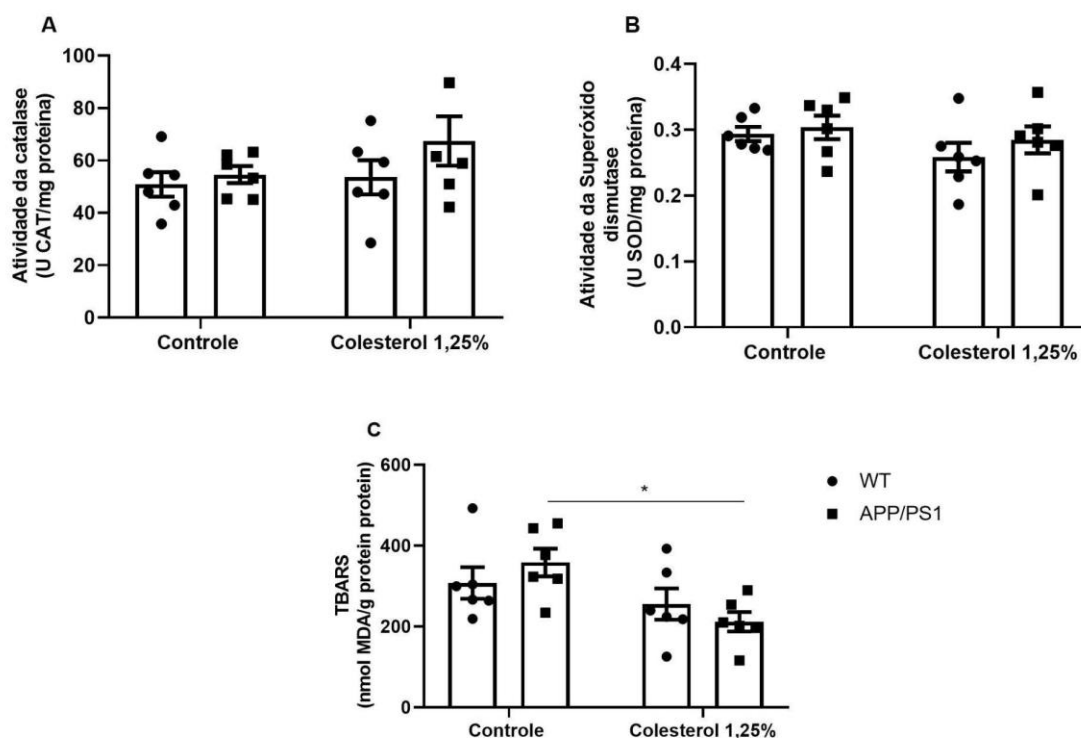


Figura 29: Atividade dos marcadores do estresse oxidativo no fígado de animais APP/WT fêmeas. A- Atividade da catalase. B- Atividade da superóxido dismutase. C- Lipoperoxidação lipídica (TBARS). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$.

Nos animais injetados com PBS ou $A\beta_{1-42}$, 24 horas antes do teste (Protocolo 24 h) a dieta acrescida de colesterol não alterou a atividade da CAT (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=0,606, $p=0,445$; $F(1,20)$ injeção=0,805; $p=0,380$; $F(1,20)$ dieta=0,475, $p=0,498$ (Figura 30A). No entanto, houve uma diminuição da atividade da SOD no grupo injetado com $A\beta_{1-42}$, que recebeu dieta colesterol em comparação com o grupo que recebeu dieta controle (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=3,249, $p=0,086$; $F(1,20)$ injeção=0,193; $p=0,664$; $F(1,20)$ dieta=29,76, $p=0,0001$) (Figura 30B). Não observamos alteração na peroxidação lipídica nesses animais (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=0,981, $p=0,333$; $F(1,20)$ injeção=0,628; $p=0,437$; $F(1,20)$ dieta=3,633, $p=0,071$ (Figura 30C).

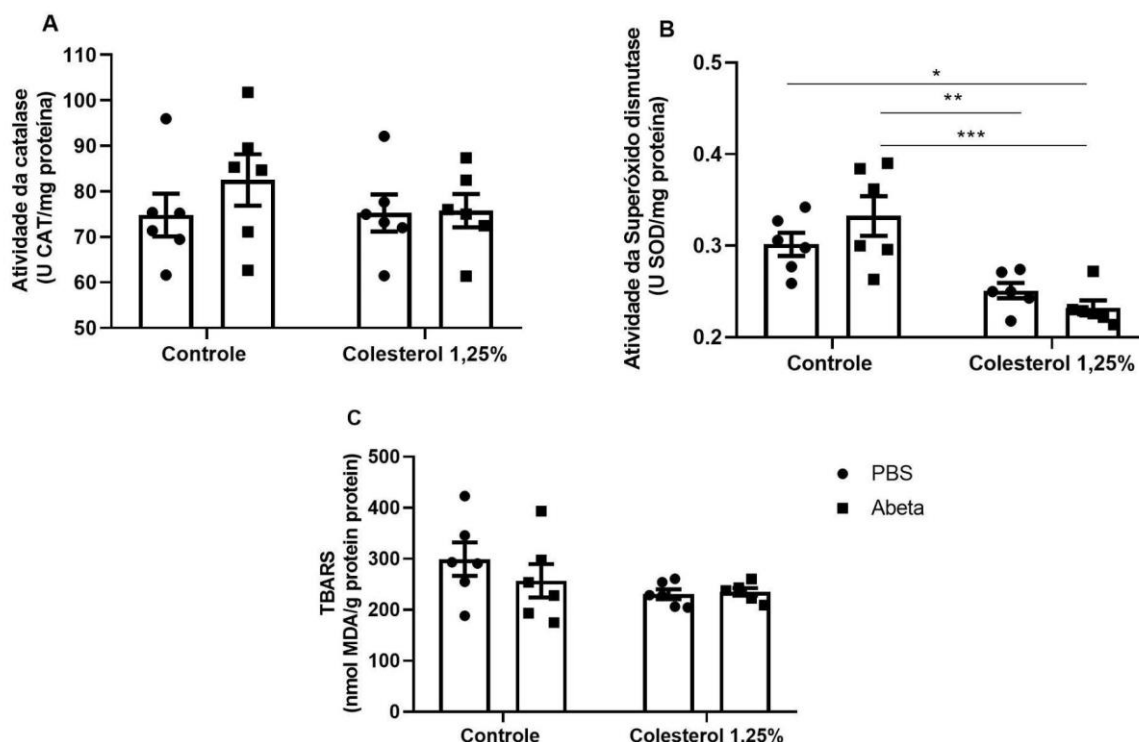


Figura 30: Atividade dos marcadores do estresse oxidativo no fígado de animais C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de injeção 24 h. A- Atividade da catalase. B- Atividade da superóxido dismutase. C- Lipoperoxidação lipídica (TBARS). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Para os animais C57BL/6 que foram submetidos ao protocolo de injeção 7 d, a dieta acrescida de colesterol aumentou a atividade da CAT no grupo injetado com $A\beta_{1-42}$, que recebeu dieta colesterol em comparação com o grupo que recebeu dieta controle (ANOVA dois critérios; $F(1,19)$ interação=10,48, $p=0,004$; $F(1,19)$ injeção=10,90; $p=0,038$; $F(1,19)$ dieta=8,136, $p=0,010$) (Figura 31A). No entanto, não houve alteração da atividade da SOD (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=2,283, $p=0,146$; $F(1,20)$ injeção=0,064; $p=0,802$; $F(1,20)$ dieta=1,269*, $p=0,273$) (Figura 31B). Também não observamos alteração na peroxidação lipídica nesses animais (ANOVA dois critérios; $F(1,20)$ interação=1,062, $p=0,315$; $F(1,20)$ injeção=0,114; $p=0,739$; $F(1,20)$ dieta=0,032, $p=0,858$) (Figura 31C).

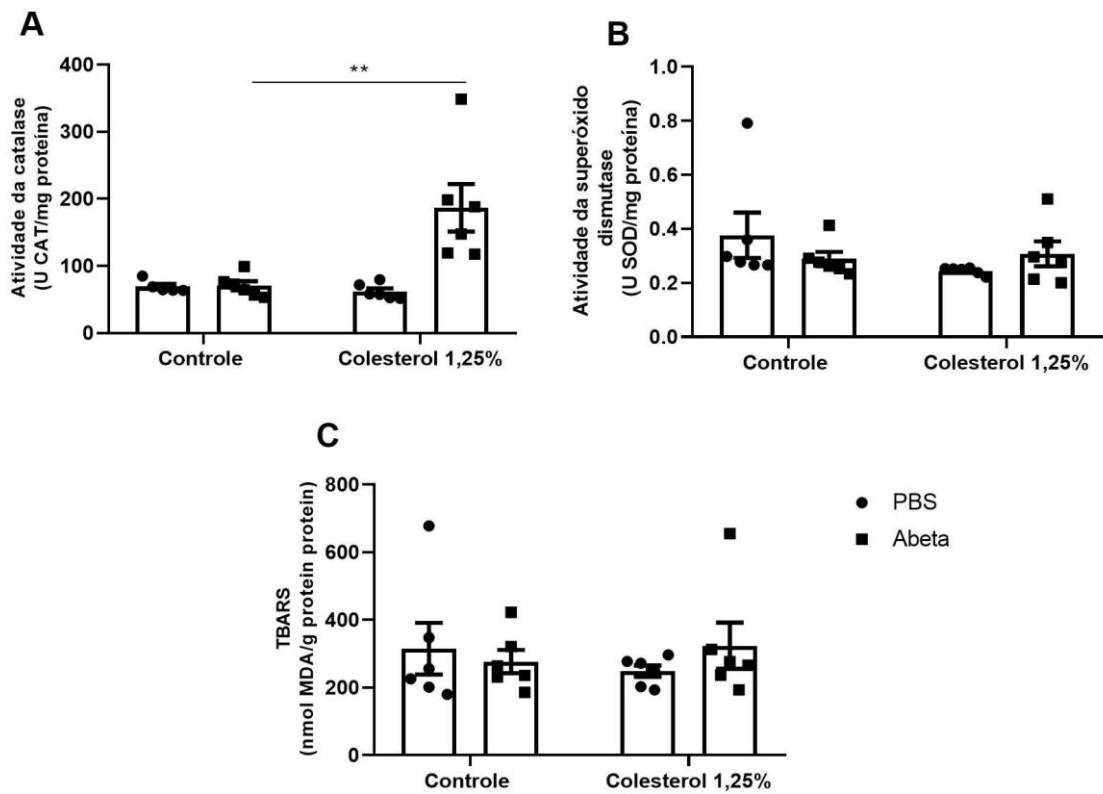


Figura 31: Atividade dos marcadores do estresse oxidativo no fígado de animais C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de injeção 7 d. A- Atividade da catalase. B- Atividade da superóxido dismutase. C- Lipoperoxidação lipídica (TBARS). ANOVA dois critérios, pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós demonstramos que uma dieta acrescida de colesterol foi capaz de impedir o comprometimento cognitivo induzido pela microinjeção intrahipocampal de $A\beta_{1-42}$ e de melhorar o comprometimento cognitivo em animais APP/PS1. Esse efeito nos animais transgênicos foi acompanhado por uma redução na microgliose hipocampal e na marcação de placas amiloides. Além disso, não houve alteração de peso, índice de adiposidade, e níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos. Por fim, o colesterol na dieta foi capaz de aumentar a razão peso do fígado/peso corporal e a concentração de lipídeos totais hepáticos, além de diminuir a atividade da SOD no modelo de microinjeção intrahipocampal.

Apesar de mais de um século desde a descoberta da DA, décadas de intensa pesquisa e a falha de abordagens terapêuticas (CUMMINGS et al., 2007; RASCHETTI et al., 2007; EXTANCE, 2010; VAN DYCK, 2018), hoje sabemos que alguns fatores de risco podem aumentar a propensão da doença, como envelhecimento, sexo e genética (EDUARDES LII et al., 2019; CASTELLO; SORIANO, 2013). Além disso, também existem fatores de risco modificáveis – em termos de condições médicas tratáveis e escolhas de estilo de vida – que desempenham um papel no desenvolvimento dessa condição (REIJIS et al., 2017; LIVINGSTON et al., 2017). Muitas pesquisas mostram que, dentre esses fatores, a desregulação na homeostase do colesterol é importante para a fisiopatologia da doença (CANEVARI; CLARK, 2007; SCHREURS, 2010; KOUDINOV; KOUDINOVA, 2003; LEDESMA; DOTTI, 2006; LUKIW et al, 2005; MAYAGOITIA et al., 2020). No entanto, a maneira específica de como o colesterol pode atuar na DA, ainda não foi esclarecida. Portanto, o presente estudo foi desenhado na tentativa de tentar responder à pergunta: uma dieta acrescida de colesterol acelera os processos neurodegenerativos em animais transgênicos para a doença de Alzheimer ou injetados com $A\beta_{1-42}$, em comparação com seus respectivos controles? Os resultados apresentados mostram um efeito oposto ao levantado pela hipótese inicial.

A importante estratégia de indução de hipercolesterolemia em modelos animais é fornecer aos mesmos uma dieta enriquecida com colesterol (MATOS et al., 2005). Esta abordagem tenta simular uma condição de hipercolesterolemia ambiental, ou seja, derivada da absorção do colesterol por meio da dieta. Diversas composições de dieta podem ser observadas na literatura. No entanto, é importante mencionar que, nos estudos publicados, podemos distinguir dietas enriquecidas em gordura daquelas com colesterol. Em geral, as primeiras apresentam taxas de gorduras totais geralmente elevadas (> 50 %) e nenhum acréscimo de colesterol. Por outro lado, dietas hipercolesterolêmicas são aquelas que

possuem enriquecimento com colesterol, apresentando baixa adição de outros tipos de gordura (em torno de 20 %) (LICHTMAN et al., 1999; SILVA et al., 2000).

Pensando nisso e nos diversos estudos que buscaram entender a relação entre hipercolesterolemia e DA que demonstraram resultados controversos (IADECOLA, 2013; BRENOWITZ et al., 2017; SAH et al., 2017), acrescentamos apenas colesterol à dieta, sem adição de gordura, tentando avaliar o efeito do lipídio isolado. No entanto, uma das limitações do presente estudo foi não termos observado hipercolesterolemia, o qual era nosso objetivo inicial, já que não houve aumento do colesterol sérico em nenhum dos modelos avaliados. Acreditamos que isso seja devido a ausência de fontes de gordura ou mesmo de ácido fólico na dieta. Porém, o acréscimo apenas de colesterol reduz a quantidade de variáveis a serem analisadas, uma vez que não há gorduras saturadas e carboidratos na dieta, que conhecidamente estão associados ao desenvolvimento de doenças metabólicas e vasculares (SIRI-TARINO et al., 2010).

Com objetivo de avaliar os efeitos do colesterol acrescentado na dieta na função cognitiva de animais C57BL/6 injetados com $A\beta_{1-42}$, realizamos a TRO, um paradigma amplamente utilizado para avaliação cognitiva em camundongos (LUEPTOW, 2017). Verificamos que a injeção de $A\beta_{1-42}$, em dois tempos diferentes, foi capaz de induzir comprometimento na evocação da memória de reconhecimento do objeto novo. Estudos anteriores demonstram que a injeção intracerebral de $A\beta_{1-42}$ induz déficit de memória em tarefas comportamentais, como TRO (BELLOZI et al., 2016; SELKOE, 2002; LEGGIO; CATANIA; PUZZO; SPATUZZA et al., 2016), labirinto aquático de Morris (AHMAD et al., 2016; HU, Z. et al., 2016; KALRA et al., 2016; LI, J. et al., 2016; SHARIATPANAH et al., 2016), labirinto em Y e esquiva passiva (LEGGIO et al., 2016; MEUNIER; IENI; MAURICE, 2006; MOON et al., 2011), o que foi confirmado em nosso trabalho. Também observamos que o colesterol na dieta impediu o comprometimento cognitivo induzido pela injeção intracerebral de $A\beta_{1-42}$.

Com base nesse resultado, resolvemos avaliar o efeito da dieta em animais APP/PS1, modelo que mimetiza melhor o curso da doença, sendo importante para avaliações crônicas. Com 10 meses de idade, foi possível observar a redução da cognição nos animais APP/PS1. Esses dados estão de acordo com a literatura, já tendo sido demonstrados déficits de memória de animais transgênicos para APP em diferentes tarefas comportamentais (EVANS et al., 2018; GÖTZ; ITTNER, 2008; ODDO et al., 2006; KALLOP et al., 2014; KELLY et al., 2017; KNOWLES et al., 2013). Também observamos que os animais que receberam colesterol apresentaram uma melhora cognitiva, o que já foi sugerido para outras espécies. Por exemplo, uma dieta acrescida de colesterol (2%), realizada por 2 a 4 meses, melhorou o aprendizado espacial no labirinto aquático de Morris em ratos *Wistar* (DUFOUR et al., 2006;

MICALE et al., 2008). Essa melhora cognitiva induzida por dieta acrescida de 2% de colesterol também já foi observada em coelhos (SCHREUS et al., 2003). Outro estudo demonstrou que animais com deficiência de colesterol ou com síntese do colesterol bloqueada apresentaram déficit na aprendizagem e na memória no labirinto aquático de Morris (VÖIKAR; RAUVALA; IKONEN, 2002). É importante salientar que o colesterol na dieta ou o genótipo não tiveram efeito sobre a atividade locomotora dos animais, o que reforça a validade dos resultados obtidos no teste comportamental.

Existem muitos dados na literatura que sugerem um papel prejudicial do colesterol em doenças neurodegenerativas, como a DA, influenciando na deposição do A β (CANEVARI; CLARK, 2007; HIRSCH-REINSHAGEN; WELLINGTON, 2007; LEDESMA; DOTTI, 2006; REID et al., 2007). Portanto, dependendo da idade dos animais testados, do protocolo de alimentação usado, e de outras variáveis, os efeitos do colesterol na aprendizagem e na memória podem ser diferentes (CARTOCCI et al., 2017).

A partir desses resultados sobre a melhora cognitiva induzida pelo colesterol, optamos por nos dedicar apenas ao modelo transgênico, uma vez que ocorre a deposição crônica das placas amiloides com progressão lenta da condição (LI et al., 2015). Entretanto, a maioria dos modelos transgênicos são baseados na expressão de genes mutantes que causam a DA, que, apesar de mimetizar algumas características clínicas e patológicas de casos esporádicos, apresentam diferenças (ELDER et al., 2010), como uma mutação da APP ou déficits cognitivos precedendo os depósitos de A β (BALDUCCI; FORLONI, 2011).

Como no presente trabalho observamos que a dieta acrescida de colesterol preveniu o déficit cognitivo nos animais APP/PS1, investigamos se esse efeito estaria relacionado a uma maior sobrevivência de neurônios. Não observamos diferença na viabilidade neuronal entre os animais APP/PS1 e os WT. De fato, em camundongos transgênicos para DA, a ocorrência de perda neuronal em várias linhagens foi relatada apenas após intenso desenvolvimento de placas amiloides (DUYCKAERTS et al., 2008). Ainda, estudos mostram que a perda neuronal significativa é observada em animais idosos. Por exemplo, Tomiyama e colaboradores (2010) avaliaram camundongos transgênicos para APP e observaram perda neuronal significativa na região CA3 do hipocampo apenas aos 24 meses, sugerindo que a morte neuronal requer longa exposição das células aos oligômeros *in vivo* e ocorre em células vulneráveis a essas espécies (TOMIYAMA et al., 2010). Além disso, em nosso estudo, o colesterol também não foi capaz de alterar esse parâmetro nos animais transgênicos ou WT. Em estudo anterior, Chen e colaboradores (2018), demonstraram que camundongos CD-1 fêmeas de 16 meses de idade, alimentados com dieta contendo 3% de colesterol durante 8 meses não apresentaram alteração na sobrevivência neuronal, quando comparados a animais

de mesma idade que receberam dieta controle. Resultados semelhantes foram observados em camundongos C57BL/6 de 6 meses de idade (CHEN et al., 2016). Dessa forma, seria necessária uma avaliação de outro parâmetro ou um tratamento mais prolongado com colesterol para que possíveis diferenças neste parâmetro possam ser observadas.

Já foi observado que o colesterol é crucial para a formação de novas sinapses, para a função normal dos receptores e para a plasticidade sináptica (GÖRITZ et al., 2002; KOUDINOV et al., 2001). Novas sinapses são formadas por neurônios através de colesterol derivado da glia, que também aumenta a frequência da atividade sináptica espontânea, aumentando o tamanho e a eficiência de liberação do transmissor (GÖRITZ et al., 2002; MAUCH et al., 2001). Além disso, muitos trabalhos têm mostrado que a disfunção sináptica é mais evidente e está mais relacionada ao comprometimento cognitivo do que a perda neuronal (DA SILVA et al., 2016; KASHYAP et al., 2019; SCHEFF et al., 2006; SELKOE, 2002). Nesse sentido, avaliamos nos animais APP/PS1 machos os níveis das proteínas sinápticas syntaxina e PSD-95, conhecidas por desempenhar um papel na capacidade cognitiva (GORDON et al., 2002). Não houve alterações nos dois genes avaliados em nenhum dos grupos. Outros trabalhos já avaliaram marcadores neuronais sinápticos, como sinaptofisina, neurofilamento-M, sinapsina-1 e sinaptotagmina, nesse mesmo modelo animal, e observaram expressão desses genes em níveis normais em animais transgênicos (DICKEY et al., 2003; STEIN et al., 2002). Além disso, reduções significativas em sinaptofisina e syntaxina já foram demonstradas na literatura, mas apenas em casos graves de DA (MINGER et al., 2001). Ainda assim, esses resultados não descartam a hipótese de que outras alterações sinápticas possam ocorrer no modelo APP/PS1, o que pode ter sido alterado pelo colesterol, uma vez que o processo de neurotransmissão é complexo e envolve várias proteínas de sinalização, receptores, transportadores, entre outros.

Sabendo que uma das principais características patológicas da DA é a existência de deposição extracelular de placas amiloides (JI et al., 2018), e que esse peptídeo está associado ao déficit cognitivo encontrado em pacientes ou em modelos para DA (LIN, WEI et al., 2013; O' NEILL, 2013), decidimos avaliar se as alterações comportamentais observadas estariam associadas à deposição de A β no hipocampo. Embora mais aceita, é importante ressaltar que a hipótese da cascata amiloide tem sido debatida há muito tempo e ainda é alvo de discussão (HARDY et al., 2006; TAYEB et al., 2013; KARRAN et al., 2011; FRISONI et al., 2022).

Para avaliar se houve deposição de A β no hipocampo de animais APP/PS1 machos, realizamos a marcação das placas amiloides no hipocampo com Thioflavina S (ThioS), marcador amiloidal usual na imunohistoquímica (DETURE; DICKSON, 2019).

Observamos acúmulo de placas nos animais APP/PS1, quando comparados aos WT, o que corrobora o fato de a deposição de A β ser um dos principais marcadores histopatológicos da doença (YAN et al., 2009; LIN, WEI et al., 2013; O' NEILL, 2013). Também observamos que o colesterol na dieta foi capaz de reduzir o acúmulo de placas observadas no hipocampo de animais APP/PS1. Esses resultados contrastam com a literatura. Por exemplo, coelhos alimentados por 24 meses com dieta acrescida de colesterol, apresentam um aumento de placas amiloides (CHEN et al., 2018). Além disso, camundongos APP/PS1 com 8 semanas de vida, quando alimentados por 5 semanas com dieta acrescida de colesterol e gordura, apresentaram um aumento de A β no cérebro. Novamente, essas diferenças podem estar relacionadas à espécie, tempo e conteúdo da dieta, entre outros fatores.

Os fatores neurotróficos são descritos por manter a sobrevivência e a função de populações neuronais específicas (SCHINDOWSKI et al., 2008). Dentre os fatores neurotróficos com alterações significativas no presente estudo, o GDNF, por exemplo, está envolvido na sobrevivência, crescimento de neuritos e diferenciação de populações distintas de neurônios centrais e periféricos (AIRAKSINEN; SAARMA, 2002). Seu papel neuroprotetor já foi demonstrado em diferentes modelos experimentais (DUARTE et al., 2012; FAN et al., 2016; KONISHI et al., 2014). Neste estudo, encontramos um aumento significativo de GDNF no hipocampo dos animais WT machos, com 10 meses de idade, quando tratados com colesterol, bem como nos animais C57BL/6 que receberam injeção de PBS e colesterol na dieta. Apesar de estudos demonstrarem que um aumento no GDNF pode desempenhar um papel crucial na cognição, incluindo retenção de memória espacial (CHIAVELLINI et al., 2022), o presente resultado não nos permite inferir nenhuma função desse fator neurotrófico no protocolo, uma vez que não houve alteração mediada pela dieta.

O BDNF é uma proteína pró-sobrevivência que suporta a viabilidade de neurônios periféricos e centrais (XIANG et al., 2014). Estudos relataram que a deficiência de BDNF começa na fase inicial da DA e eventualmente causa degeneração neuronal, morte celular e perda da neurotransmissão colinérgica na fase tardia da doença (COUNTS; MUFSON et al., 2005; TAPIA-ARANCIBIA et al., 2008). A expressão de BDNF também é prejudicada em pacientes com DA e em modelos animais para DA (FUMAGALLI et al., 2006). No presente estudo, foi observado um aumento na concentração de BDNF nos animais APP/PS1 machos e fêmeas em relação aos WT submetidos à dieta controle. Esses resultados contrastam com a literatura, já tendo sido demonstrado que animais APP/PS1 apresentam uma diminuição de BDNF (PENG et al., 2009). Também observamos que o colesterol na dieta foi capaz de reduzir a concentração de BDNF nos animais APP/PS1 machos. Apesar dos mecanismos exatos subjacentes ao efeito da sinalização prejudicada do BDNF na DA ainda serem desconhecidos (GAO et al., 2022), acreditamos que esse resultado sozinho é inconclusivo.

Uma vez que o acúmulo de A β tem sido associado ao aumento da resposta inflamatória, especialmente mediada pela micróglia (BABCOCK et al., 2015; BLOCK; ZECCA; HONG, 2007; HICKMAN; ALLISON; EL KHOURY, 2008), nosso próximo passo foi avaliar a microgliose no hipocampo dos animais. De fato, já foi demonstrado que a resposta inflamatória local em modelos para DA é mediada pela micróglia ativada (WYSS-CORAY et al., 2006; AKIYAMA et al., 2000) e ocorre após a formação da placa amilóide (DUYCKAERTS et al., 2008). Nossos resultados mostraram que animais APP/PS1 apresentaram microgliose aumentada no hipocampo em comparação aos animais WT. Curiosamente, o grupo que recebeu colesterol na dieta apresentou redução da microgliose no hipocampo. De forma interessante, esse resultado se correlaciona com a diminuição da deposição amiloide nos mesmos animais.

Além da microgliose, muitos trabalhos já mostraram alterações no perfil de liberação de citocinas em animais APP/PS1 de diferentes idades (BABCOCK et al., 2015; BELLOZI; GOMES; DA SILVA; et al., 2019; PATEL et al., 2005), o que poderia contribuir para a neurodegeneração (TOMIYAMA et al., 2010). Dessa forma, avaliamos se citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias estavam alteradas no hipocampo dos grupos avaliados.

No SNC, fractalquina é constitutivamente e abundantemente expressa em neurônios, com níveis particularmente elevados em neurônios hipocámpais (HARRISON et al., 1998) e encontra-se diminuída no cérebro de roedor envelhecido em relação ao cérebro jovem (MECCA et al., 2018). No presente estudo, foi observado que o colesterol diminuiu a concentração de CX3CL1 no hipocampo de animais WT machos. Nas fêmeas, a adição de colesterol na dieta aumentou a concentração de CX3CL1. Esse marcador também foi avaliado nos camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo 7 d. Neste caso, o colesterol aumentou apenas a concentração nos animais injetados com PBS. De acordo com a literatura, o CX3CL1 parece ser neuroprotetor em algumas configurações, enquanto contribui para danos neuronais em outras (SHERIDAN; MURPHY, 2013).

A IL-1 β pode ser produzida pela micróglia ativada e contribuir para a degeneração neuronal (GRIFFIN et al., 2002). No presente estudo, verificamos que houve um aumento na concentração de IL-1 β nos animais APP/PS1 machos, comparados aos WT, na dieta controle. De forma interessante, houve redução da concentração desta citocina no hipocampo dos animais APP/PS1 que receberam colesterol, comparados aos que receberam dieta controle. Este resultado é interessante, uma vez que acompanha o padrão de microgliose e de marcação de A β ₁₋₄₂. Com relação às demais citocinas avaliadas, de forma geral, ocorreram alterações pontuais nos modelos avaliados. É importante ressaltar que a inflamação observada no cérebro do paciente com DA não é adequadamente reproduzida em todos os

modelos murinos transgênicos, pois há diferenças entre as espécies, no que diz respeito à natureza e gravidade da inflamação (LITHNER et al., 2011; SCHWAB; HOSOKAWA; MCGEER, 2004).

Da mesma forma que há alterações ao nível do SNC associadas à DA, já foi verificado que outras alterações sistêmicas, como dislipidemias, podem contribuir para a progressão da doença (DE LIMA OLIVEIRA et al., 2018). No presente trabalho, a dieta enriquecida com colesterol não induziu dislipidemia. Apesar de já ter sido demonstrado que em modelos animais para DA pode-se observar aumento nos níveis de colesterol sérico, é necessário levar em consideração que as dietas destes estudos continham também gordura em sua composição (FOIDL; HUMPEL, 2019; HOHSFIELD et al., 2014; REFOLO et al., 2000). Somado a isso, a concentração de colesterol utilizada na dieta, a idade dos animais, a espécie ou a linhagem, o tempo de tratamento, e os métodos de dosagem utilizados, podem contribuir para essas discrepâncias entre o nosso estudo e os outros.

A adição de colesterol à dieta pode resultar em alterações hepáticas (ANDERSEN; TURLEY; DIETSCHY, 1982; NERVI; WEIS; DIETSCHY, 1975; PÜSCHEL; HENKEL, 2018). No presente estudo observamos que o colesterol na dieta aumentou a razão peso do fígado/peso corporal e a concentração dos lipídeos no órgão. Esses dados estão de acordo com a literatura, já tendo sido demonstrados aumento no peso do fígado (HOWLAND et al., 1998) e aumento na concentração dos lipídeos hepáticos (GEORGE et al., 2004; HOWLAND et al., 1998; REFOLO et al., 2000; MAHFOUZ; KUMMEROW, 2000) em animais que receberam dieta acrescida de colesterol.

Como verificamos esse aumento da razão peso do fígado/peso corporal, e da concentração de colesterol no tecido hepático, nosso próximo objetivo foi avaliar se o colesterol acrescentado à dieta estaria ocasionando um estresse oxidativo no tecido. Não observamos alterações significativas nas dosagens de CAT, SOD ou TBARs nos animais APP/PS1 machos. Esse resultado está de acordo com outro trabalho, em que ratos alimentados com 1-3% de colesterol, não apresentaram alterações na atividade de enzimas antioxidantes (BOBEK et al., 1997), ou na lipoperoxidação no fígado (MAHFOUZ; KUMMEROW, 2000). Nas fêmeas alimentadas com colesterol, observamos uma diminuição significativa nos níveis de TBARs nos animais APP/PS1 e uma tendência a diminuição nos WT. Sabe-se que o estrogênio pode ocasionar alterações gerais do metabolismo, que são detectadas no fígado (KANKOFER et al., 2007). Além disso, já foi demonstrado que as terapias de reposição hormonal diminuem os marcadores de estresse oxidativo no plasma e no tecido, sugerindo um efeito protetor dos estrogênios (ALBANO et al., 2005). Já nos animais C57BL/6, apesar de não termos observado diferenças significativas na atividade da CAT, e

nos níveis de TBARs, verificamos uma diminuição significativa na atividade da SOD, quando os animais receberam colesterol na dieta. Isso já foi demonstrado em outro trabalho em que animais C57BL/6 alimentados com uma dieta rica em colesterol e gordura apresentam concentrações mais baixas de SOD hepática (ZHANG et al., 2021). No entanto, a contribuição do colesterol em todos esses parâmetros precisa ser melhor investigada.

Observamos que as 16 semanas de dieta com colesterol não altera o peso corporal de animais C57BL/6 ou de animais APP/PS1. Resultado semelhante foi encontrado em outros estudos que utilizaram modelo genético para DA (HOHSFIELD et al., 2014; GEORGE et al., 2004). Por outro lado, outros trabalhos utilizando diferentes modelos animais, mostraram que o colesterol acrescido à dieta pode levar ao aumento do peso corporal (EHRlich et al, 2012; FOIDL; HUMPEL, 2019; ULLRICH et al., 2010). Apesar disso, um estudo que administrou diferentes dietas em animais C57BL/6, mostrou que esses animais só ganham peso, se forem alimentados com dietas acrescidas de gordura e não somente colesterol (HWANG et al., 2010). Por fim, em nosso estudo, o colesterol não alterou a adiposidade dos animais em nenhum dos modelos avaliados. Resultado similar foi encontrado em estudo com animais C57BL/6 alimentados com 1,5% de colesterol por 25 semanas, os quais não apresentaram alteração na massa de tecido adiposo (SUMIYOSHI; SAKANAKA; KIMURA, 2010).

6. CONCLUSÃO

Apesar de mais de um século desde a descoberta da DA, não há cura que possa deter, retardar ou reverter a progressão da doença. Independentemente do tremendo esforço que o campo científico tem feito para encontrar tratamentos eficazes. Portanto, uma estratégia alternativa para combater a DA poderia ser a prevenção dos fatores de risco modificáveis conhecidos e o entendimento dos mecanismos metabólicos relacionados à doença, isso inclui o entendimento dos efeitos do colesterol na doença.

O presente trabalho adiciona à literatura novas evidências de que animais alimentados apenas com colesterol, sem acréscimo de gordura à dieta, apresentam uma melhora cognitiva, especialmente aquela que depende do funcionamento hipocampal. Esses resultados ampliam o conhecimento sobre complexidade dos efeitos promovidos pelo colesterol em um contexto de condições patológicas.

Os resultados comportamentais, histológicos e bioquímicos apresentados no presente trabalho não são suficientes para explicar a melhora cognitiva observada nos animais, sendo necessária a continuidade do estudo para o esclarecimento acerca das bases celulares e moleculares desses achados. No entanto, nossos resultados reforçam o que outros estudos já vêm demonstrando, que o metabolismo do colesterol é um fator importante para a patofisiologia desta doença neurodegenerativa. O esclarecimento da maneira específica de como o colesterol pode atuar na DA pode indicar novos alvos para abordagens terapêuticas.

7. REFERENCIAS

- AHMAD, A. et al. Neuroprotective Effect of Fisetin Against Amyloid-Beta-Induced Cognitive/Synaptic Dysfunction, Neuroinflammation, and Neurodegeneration in Adult Mice. **Mol Neurobiol**, Mar 5 2016.
- AIRAKSINEN, Matti S.; SAARMA, Mart. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 5, p. 383-394, 2002.
- AKIYAMA, Haruhiko et al. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 14, n. 1, p. S47-S53, 2000.
- AKIYOSHI, Ryohei et al. Microglia enhance synapse activity to promote local network synchronization. **eneuro**, v. 5, n. 5, 2018.
- ALBANO, E. et al. role of oxidative stress in the progression of non- alcoholic steatosis. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 22, p. 71-73, 2005.
- ALVING, Carl R. et al. Immunization with cholesterol-rich liposomes induces anti-cholesterol antibodies and reduces diet-induced hypercholesterolemia and plaque formation. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 127, n. 1, p. 40-49, 1996.
- AMOR, Sandra; WOODROOFE, M. Nicola. Innate and adaptive immune responses in neurodegeneration and repair. **Immunology**, v. 141, n. 3, p. 287-291, 2014.
- ANDERSEN, John M.; TURLEY, Stephen D.; DIETSCHY, John M. Relative rates of sterol synthesis in the liver and various extrahepatic tissues of normal and cholesterol-fed rabbits: relationship to plasma lipoprotein and tissue cholesterol levels. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 711, n. 3, p. 421-430, 1982.
- BABCOCK, Alicia A. et al. Cytokine-producing microglia have an altered beta-amyloid load in aged APP/PS1 Tg mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 48, p. 86-101, 2015.
- BAGYINSZKY, Eva et al. The genetics of Alzheimer's disease. **Clinical interventions in aging**, v. 9, p. 535, 2014.
- BALDUCCI, Claudia; FORLONI, Gianluigi. APP transgenic mice: their use and limitations. **Neuromolecular medicine**, v. 13, n. 2, p. 117-137, 2011.
- BALIN, Brian J.; HUDSON, Alan P. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. **Current allergy and asthma reports**, v. 14, n. 3, p. 1-10, 2014.
- BAMBERGER, Maria E. et al. A cell surface receptor complex for fibrillar β -amyloid mediates microglial activation. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 2665-2674, 2003.
- BELLOZI, Paula Maria Quaglio et al. Neuroprotective effects of the anticancer drug NVPBEZ235 (dactolisib) on amyloid- β 1-42 induced neurotoxicity and memory impairment. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.
- BELLOZI, Paula Maria Quaglio et al. NVP-BEZ235 (dactolisib) has protective effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 1345, 2019.
- BENARROCH, Eduardo E. Brain cholesterol metabolism and neurologic disease. **Neurology**, v. 71, n. 17, p. 1368-1373, 2008.
- BENILOVA, Iryna; KARRAN, Eric; DE STROOPER, Bart. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 349-357, 2012.
- BINOTTI, Beyenech; JAHN, Reinhard; PÉREZ-LARA, Ángel. An overview of the synaptic vesicle lipid composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 709, p. 108966, 2021.
- BJÖRKHEM, Ingemar; MEANEY, Steve. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 5, p. 806-815, 2004.

- BLOCK, Michelle L.; ZECCA, Luigi; HONG, Jau-Shyong. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2007.
- BOBEK, Pavel; OZDÍN, Ľubomír; KUNIAK, Ľudovít. Effect of oyster mushroom and isolated β -glucan on lipid peroxidation and on the activities of antioxidative enzymes in rats fed the cholesterol diet. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, n. 8, p. 469-471, 1997.
- BRENEWITZ, Willa D. et al. Mixed neuropathologies and estimated rates of clinical progression in a large autopsy sample. **Alzheimer's & Dementia**, v. 13, n. 6, p. 654-662, 2017.
- BROCHARD, Vanessa et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 1, 2008.
- BUEGE, John A.; AUST, Steven D. [30] Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1978. p. 302-310.
- CANEVARI, Laura; CLARK, John B. Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. **Neurochemical research**, v. 32, n. 4, p. 739-750, 2007.
- CARMONA, Susana; HARDY, John; GUERREIRO, Rita. The genetic landscape of Alzheimer disease. **Handbook of clinical neurology**, v. 148, p. 395-408, 2018.
- CARONE, Marco; ASGHARIAN, Masoud; JEWELL, Nicholas P. Estimating the lifetime risk of dementia in the Canadian elderly population using cross-sectional cohort survival data. **Journal of the American Statistical Association**, v. 109, n. 505, p. 24-35, 2014.
- CARTOCCI, Veronica et al. Can cholesterol metabolism modulation affect brain function and behavior?. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 2, p. 281-286, 2017.
- CASTELLO, Michael A.; SORIANO, Salvador. On the origin of Alzheimer's disease. Trials and tribulations of the amyloid hypothesis. **Ageing research reviews**, v. 13, p. 10-12, 2014.
- CATALDO, Janine K.; PROCHASKA, Judith J.; GLANTZ, Stanton A. Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 19, n. 2, p. 465-480, 2010.
- CHANG, Catherine et al. Human acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its potential as a target for pharmaceutical intervention against atherosclerosis. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 38, n. 3, p. 151-156, 2006.
- CHEN, Y. L. et al. Changes in astrocyte functional markers and β -amyloid metabolism-related proteins in the early stages of hypercholesterolemia. **Neuroscience**, v. 316, p. 178-191, 2016.
- CHEN, Yuanxin et al. In vivo MRI of amyloid plaques in a cholesterol-fed rabbit model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 64, n. 3, p. 911-923, 2018.
- CHIAVELLINI, Priscila et al. Therapeutic potential of glial cell line-derived neurotrophic factor and cell reprogramming for hippocampal-related neurological disorders. **Neural Regeneration Research**, v. 17, n. 3, p. 469, 2022.
- COLOVIC, Mirjana B. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.
- COUNTS, Scott E.; MUFSON, Elliott J. Noradrenaline activation of neurotrophic pathways protects against neuronal amyloid toxicity. **Journal of neurochemistry**, v. 113, n. 3, p. 649-660, 2010.
- COX-YORK, K. et al. Lower body adipose tissue removal decreases glucose tolerance and insulin sensitivity in mice with exposure to high fat diet. **Adipocyte**, v. 4, n. 1, p. 32-43, 2015.
- CUMMINGS, Jeffrey L.; DOODY, Rachele; CLARK, Christopher. Disease-modifying therapies for Alzheimer disease: challenges to early intervention. **Neurology**, v. 69, n. 16, p. 1622-1634, 2007.
- DASON, Jeffrey S. et al. Cholesterol and F- actin are required for clustering of recycling synaptic vesicle proteins in the presynaptic plasma membrane. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 4, p. 621-633, 2014.

- DE BRUIJN, Renée FAG; IKRAM, M. Arfan. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. **BMC medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2014.
- DE CALIGNON, Alix et al. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 685-697, 2012.
- DE LA TORRE, J. C. Critical threshold cerebral hypoperfusion causes Alzheimer's disease?. **Acta neuropathologica**, v. 98, n. 1, p. 1-8, 1999.
- DE LA TORRE, J. C.; MUSSIVAN, T. Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease?. **Neurological research**, v. 15, n. 3, p. 146-153, 1993.
- DE LIMA OLIVEIRA, Bruno Cabral et al. Inflammation as a possible link between dyslipidemia and Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 376, p. 127-141, 2018.
- DE OLIVEIRA E SILVA, Elizabeth R. et al. Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins AI and A-II. **Circulation**, v. 102, n. 19, p. 2347-2352, 2000.
- DETURE, Michael A.; DICKSON, Dennis W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. **Molecular neurodegeneration**, v. 14, n. 1, p. 1-18, 2019.
- DICKEY, Chad A. et al. Selectively reduced expression of synaptic plasticity-related genes in amyloid precursor protein+ presenilin-1 transgenic mice. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 5219-5226, 2003.
- DIETSCHY, John M. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. 2009.
- DIETSCHY, John M.; TURLEY, Stephen D. Cholesterol metabolism in the brain. **Current opinion in lipidology**, v. 12, n. 2, p. 105-112, 2001.
- DIETSCHY, John M.; TURLEY, Stephen D. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. **Journal of lipid research**, v. 45, n. 8, p. 1375-1397, 2004.
- DORNAS, Waleska C. et al. Experimental atherosclerosis in rabbits. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 95, p. 272-278, 2010.
- DORSZEWSKA, Jolanta et al. Molecular basis of familial and sporadic Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 13, n. 9, p. 952-963, 2016.
- DUARTE, Emília P. et al. Neuroprotection by GDNF in the ischemic brain. **Growth factors**, v. 30, n. 4, p. 242-257, 2012.
- DUFOUR, Franck et al. Cholesterol-enriched diet affects spatial learning and synaptic function in hippocampal synapses. **Brain Research**, v. 1103, n. 1, p. 88-98, 2006.
- DUYCKAERTS, Charles; POTIER, Marie-Claude; DELATOUR, Benoît. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. **Acta neuropathologica**, v. 115, n. 1, p. 5-38, 2008.
- EDMOND, John et al. Dietary cholesterol and the origin of cholesterol in the brain of developing rats. **The Journal of nutrition**, v. 121, n. 9, p. 1323-1330, 1991.
- EDWARDS III, George A. et al. Modifiable risk factors for Alzheimer's disease. **Frontiers in aging neuroscience**, p. 146, 2019.
- EHEHALT, Robert et al. Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. **The Journal of cell biology**, v. 160, n. 1, p. 113-123, 2003.
- EHRlich, Daniela; HUMPEL, Christian. Chronic vascular risk factors (cholesterol, homocysteine, ethanol) impair spatial memory, decline cholinergic neurons and induce blood-brain barrier leakage in rats in vivo. **Journal of the neurological sciences**, v. 322, n. 1-2, p. 92-95, 2012.
- ELDER, G. A.; GAMA SOSA, M. A.; DE GASPERI, R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Mt Sinai J Med**, v. 77, n. 1, p. 69-81, Jan-Feb 2010.

- ELETI, Saigeet. Drugs in Alzheimer's disease Dementia: An overview of current pharmacological management and future directions. **Psychiatra Danubina**, v. 28, n. suppl 1, p. 136-140, 2016.
- ENGELHARDT, Britta; RANSOHOFF, Richard M. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. **Trends in immunology**, v. 26, n. 9, p. 485-495, 2005.
- EVANS, Charles et al. A rapidly acquired foraging-based working memory task, sensitive to hippocampal lesions, reveals age-dependent and age-independent behavioural changes in a mouse model of amyloid pathology. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 149, p. 46-57, 2018.
- EXTANCE A. Alzheimer's failure raises questions about disease-modifying strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Oct;9(10):749-51. doi: 10.1038/nrd3288. PMID: 20885394.
- FAN, Ching-Hsiang et al. Noninvasive, targeted and non-viral ultrasound-mediated GDNF-plasmid delivery for treatment of Parkinson's disease. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.
- FERREIRA, Sergio T.; KLEIN, William L. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiology of learning and memory**, v. 96, n. 4, p. 529-543, 2011.
- FINCH, Caleb E.; SAPOLSKY, Robert M. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms \star . **Neurobiology of aging**, v. 20, n. 4, p. 407-428, 1999.
- FOIDL, Bettina M.; HUMPEL, Christian. Chronic treatment with five vascular risk factors causes cerebral amyloid angiopathy but no Alzheimer pathology in C57BL6 mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 78, p. 52-64, 2019.
- FOLCH, Jordi et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.
- FONSECA, Emerson A. et al. A fingerprint of amyloid plaques in a bitransgenic animal model of Alzheimer's disease obtained by statistical unmixing analysis of hyperspectral Raman data. **Analyst**, v. 144, n. 23, p. 7049-7056, 2019.
- FRISONI, Giovanni B. et al. The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 53-66, 2022.
- FUMAGALLI, Fabio; RACAGNI, G.; RIVA, M. A. The expanding role of BDNF: a therapeutic target for Alzheimer's disease?. **The pharmacogenomics journal**, v. 6, n. 1, p. 8-15, 2006.
- GAMBA, Paola et al. The controversial role of 24-S-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 740, 2021.
- GAO, Shunxiang et al. One-step high-throughput detection of low-abundance biomarker BDNF using a bilayer interferometry-based 3D aptasensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 215, p. 114566, 2022.
- GEORGE, A. J.; HOLSINGER, R. M.; MCLEAN, C. A.; LAUGHTON, K. M. et al. APP
- GETZ, Godfrey S.; REARDON, Catherine A. ApoE knockout and knockin mice: the history of their contribution to the understanding of atherogenesis. **Journal of lipid research**, v. 57, n. 5, p. 758-766, 2016.
- GHRIBI, Othman et al. High cholesterol content in neurons increases BACE, β -amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. **Experimental neurology**, v. 200, n. 2, p. 460-467, 2006.
- GHRIBI, Othman. Potential mechanisms linking cholesterol to Alzheimer's disease-like pathology in rabbit brain, hippocampal organotypic slices, and skeletal muscle. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 15, n. 4, p. 673-684, 2008.
- GIUFFRIDA, Maria Laura; COPANI, Agata; RIZZARELLI, Enrico. A promising connection between BDNF and Alzheimer's disease. **Aging (Albany NY)**, v. 10, n. 8, p. 1791, 2018.

- GOEDEKE, Leigh; FERNÁNDEZ-HERNANDO, Carlos. Regulation of cholesterol homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 6, p. 915-930, 2012.
- GOLDSTEIN, Joseph L.; BROWN, Michael S. The cholesterol quartet. **Science**, v. 292, n. 5520, p. 1310-1312, 2001.
- GONG, Cheng-Xin et al. Multi-Targets: An Unconventional Drug Development Strategy for Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, p. 86, 2022.
- GORDON, Marcia N. et al. Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1+ APP mouse. **Experimental neurology**, v. 173, n. 2, p. 183-195, 2002.
- GÖRITZ, Christian et al. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse–glia affair. **Journal of Physiology-Paris**, v. 96, n. 3-4, p. 257-263, 2002.
- GÖTZ, Jürgen; ITTNER, Lars M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 532-544, 2008.
- GRIFFIN, W. Sue T.; MRAK, Robert E. Interleukin- 1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. **Journal of leukocyte biology**, v. 72, n. 2, p. 233-238, 2002.
- GRIMM, Marcus OW et al. APP function and lipids: a bidirectional link. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, p. 63, 2017.
- GRIMM, Marcus OW et al. The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer's disease. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- GRUNDY, Scott M. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. **Annual review of nutrition**, v. 3, n. 1, p. 71-96, 1983.
- GRUTZENDLER, Jaime; MORRIS, John C. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Drugs**, v. 61, n. 1, p. 41-52, 2001.
- HAASS, Christian; SELKOE, Dennis J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 2, p. 101-112, 2007.
- HAMILTON, Alison et al. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout reduces cognitive impairment and pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. **Molecular brain**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2014.
- HAMPEL, Harald et al. The amyloid- β pathway in Alzheimer's disease. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 10, p. 5481-5503, 2021.
- HARDY, John. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 9, n. s3, p. 151-153, 2006.
- HARRISON, Jeffrey K. et al. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 18, p. 10896-10901, 1998.
- HARTVIGSEN, Karsten et al. A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, n. 4, p. 878-885, 2007.
- HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. *Bioquímica Ilustrada*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- HENEKA, Michael T.; KUMMER, Markus P.; LATZ, Eicke. Innate immune activation in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 463-477, 2014.
- HICKEY, W. F.; HSU, B. L.; KIMURA, H. T- lymphocyte entry into the central nervous system. **Journal of neuroscience research**, v. 28, n. 2, p. 254-260, 1991.
- HICKMAN, Suzanne E.; ALLISON, Elizabeth K.; EL KHOURY, Joseph. Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 33, p. 8354-8360, 2008.

- HIRSCH-REINSHAGEN, Veronica; WELLINGTON, Cheryl L. Cholesterol metabolism, apolipoprotein E, adenosine triphosphate-binding cassette transporters, and Alzheimer's disease. **Current opinion in lipidology**, v. 18, n. 3, p. 325-332, 2007.
- HOWLAND, D. S.; TRUSKO, S. P.; SAVAGE, M. J.; REAUME, A. G. et al. Modulation
- HU, Z. et al. Ovarian hormones ameliorate memory impairment, cholinergic deficit, neuronal apoptosis and astrogliosis in a rat model of Alzheimer's disease. **Exp Ther Med**, v. 11, n. 1, p. 89-97, Jan 2016.
- HWANG, Ling- Ling et al. Sex differences in high- fat diet- induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. **Obesity**, v. 18, n. 3, p. 463-469, 2010.
- hypercholesterolemia in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol*
- IADECOLA, Costantino. The pathobiology of vascular dementia. **Neuron**, v. 80, n. 4, p. 844-866, 2013.
- IMTIAZ, Bushra et al. Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 661-670, 2014.
- intracellular domain is increased and soluble Abeta is reduced with diet-induced
- IQBAL, Jahangir; HUSSAIN, M. Mahmood. Evidence for multiple complementary pathways for efficient cholesterol absorption in mice. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 7, p. 1491-1501, 2005.
- JEREMIC, Danko; JIMÉNEZ-DÍAZ, Lydia; NAVARRO-LÓPEZ, Juan D. Past, present and future of therapeutic strategies against amyloid- β peptides in Alzheimer's disease: A systematic review. **Ageing research reviews**, v. 72, p. 101496, 2021.
- Jl, Minbiao et al. Label-free imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease with stimulated Raman scattering microscopy. **Science advances**, v. 4, n. 11, p. eaat7715, 2018.
- JIA, Jun-yong et al. Quantitative Proteomics Analysis of Detergent-resistant Membranes from Chemical Synapses: Evidence for Cholesterol as Spatial Organizer of Synaptic Vesicle Cycling* S. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 11, p. 2060-2071, 2006.
- JIANG, Shangtong et al. M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. **Neuroscience bulletin**, v. 30, n. 2, p. 295-307, 2014.
- JIANG, Teng et al. Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 13, p. 2949-2962, 2014.
- KAGEYAMA, Yusuke et al. Amyloid β toxic conformer has dynamic localization in the human inferior parietal cortex in absence of amyloid plaques. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2018.
- KALLOP, Dara Y. et al. A death receptor 6-amyloid precursor protein pathway regulates synapse density in the mature CNS but does not contribute to Alzheimer's disease-related pathophysiology in murine models. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 19, p. 6425-6437, 2014.
- KALRA, J. et al. Modulation of LOX and COX pathways via inhibition of amyloidogenesis contributes to mitoprotection against beta-amyloid oligomer-induced toxicity in an animal model of Alzheimer's disease in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 146-147, p. 1-12, Jul-Aug 2016.
- KANKOFER, M. et al. Anti- oxidative/oxidative status of rat liver after ovariectomy. **Journal of veterinary medicine series A**, v. 54, n. 5, p. 225-229, 2007.
- KARRAN, Eric; MERCKEN, Marc; STROOPER, Bart De. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature reviews Drug discovery**, v. 10, n. 9, p. 698-712, 2011.
- KASHYAP, G. et al. Synapse loss and progress of Alzheimer's disease-A network model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.
- KEITH, B. J.; FRANKLIN, M. A.; PAXINOS, G. The mouse brain in stereotaxic coordinates, compact: the coronal plates and diagrams. 2008.
- KELLY, Patricia et al. Microvascular ultrastructural changes precede cognitive impairment in the murine APP^{swe}/PS1^{dE9} model of Alzheimer's disease. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 567-580, 2017.

KHOURY, Rita; GROSSBERG, George T. Deciphering Alzheimer's disease: Predicting new therapeutic strategies via improved understanding of biology and pathogenesis. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 24, n. 9, p. 859-868, 2020.

KIVIPELTO, Miia et al. Apolipoprotein E ϵ 4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. **Annals of internal medicine**, v. 137, n. 3, p. 149-155, 2002.

KIVIPELTO, Miia et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. **Bmj**, v. 322, n. 7300, p. 1447-1451, 2001.

KIVIPELTO, Miia et al. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and

KNOWLES, Juliet K. et al. A small molecule p75NTR ligand prevents cognitive deficits and neurite degeneration in an Alzheimer's mouse model. **Neurobiology of aging**, v. 34, n. 8, p. 2052-2063, 2013.

KOCAHAN, Sayad; DOĞAN, Zumrut. Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: the brain, neural pathology, N-methyl-D-aspartate receptors, tau protein and other risk factors. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 1, 2017.

KONISHI, Yoshihiro et al. Deficiency of GDNF receptor GFR α 1 in Alzheimer's neurons results in neuronal death. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 39, p. 13127-13138, 2014.

KOROLEV, Igor O. Alzheimer's disease: a clinical and basic science review. **Medical Student Research Journal**, v. 4, n. 1, p. 24-33, 2014.

KOUDINOV, Alexei R.; KOUDINOVA, Natalia V. Cholesterol, synaptic function and Alzheimer's disease. **Pharmacopsychiatry**, v. 36, n. S 2, p. 107-112, 2003.

KOUDINOV, Alexei R.; KOUDINOVA, Natalia V. Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 10, p. 1858-1860, 2001.

KRABBE, Grietje et al. Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60921, 2013.

KREUTZBERGER, Alex JB; KIESSLING, Volker; TAMM, Lukas K. High cholesterol obviates a prolonged hemifusion intermediate in fast SNARE-mediated membrane fusion. **Biophysical journal**, v. 109, n. 2, p. 319-329, 2015.

KRUIT, Janine K. et al. Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 12, n. 40, p. 6429, 2006.

KUNKLE, B. W. et al. Alzheimer Disease Genetics Consortium (ADGC); European Alzheimer's Disease Initiative (EADI); Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology Consortium (CHARGE); Genetic and Environmental Risk in AD/Defining Genetic, Polygenic and Environmental Risk for Alzheimer's Disease Consortium (GERAD/PERADES). Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. **Nat Genet**, v. 51, n. 3, p. 414-430, 2019.

KUO, Yu-Min et al. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain A β 1-42 levels. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 252, n. 3, p. 711-715, 1998.

LANGE, Yvonne. Tracking cell cholesterol with cholesterol oxidase. **Journal of lipid research**, v. 33, n. 3, p. 315-321, 1992.

LANOISELÉE, Hélène-Marie et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. **PLoS medicine**, v. 14, n. 3, p. e1002270, 2017.

LEDESMA, Maria Dolores; DOTTI, Carlos G. Amyloid excess in Alzheimer's disease: What is cholesterol to be blamed for?. **FEBS letters**, v. 580, n. 23, p. 5525-5532, 2006.

LEE, Eunbeol; CHUNG, Won-Suk. Glial control of synapse number in healthy and diseased brain. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 13, p. 42, 2019.

- LEE, Jun-Young et al. Brief screening for mild cognitive impairment in elderly outpatient clinic: validation of the Korean version of the Montreal Cognitive Assessment. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v. 21, n. 2, p. 104-110, 2008.
- LEE, Yee Ting et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2017.
- LEGGIO, G. M. et al. The antineoplastic drug flavopiridol reverses memory impairment induced by Amyloid-ss1-42 oligomers in mice. **Pharmacol Res**, v. 106, p. 10-20, Apr 2016.
- LEONI, Valerio; CACCIA, Claudio. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. **Biochimie**, v. 95, n. 3, p. 595-612, 2013.
- LI, Hao et al. Application of APP/PS1 transgenic mouse model for Alzheimers disease. **J. Alzheimers Dis. Parkinsonism**, v. 5, n. 201, p. 10.4172, 2015.
- LICHTMAN, Andrew H. et al. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 19, n. 8, p. 1938-1944, 1999.
- LIN, Wei et al. The role of TLR2/JNK/NF- κ B pathway in amyloid β peptide-induced inflammatory response in mouse NG108-15 neural cells. **International immunopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 880-884, 2013.
- LIVINGSTON, Gill et al. Dementia prevention, intervention, and care. **The Lancet**, v. 390, n. 10113, p. 2673-2734, 2017.
- LUEPTOW, Lindsay M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 126, p. e55718, 2017.
- LUKIW, Walter J. et al. Alzheimer's disease—a dysfunction in cholesterol and lipid metabolism. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 25, n. 3, p. 475-483, 2005.
- LÜTJOHANN, Dieter; VANMIERLO, Tim; MULDER, Monique. Cholesterol trafficking in the brain. In: **Cellular Lipid Metabolism**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 131-155.
- LYONS, Anthony et al. Fractalkine- induced activation of the phosphatidylinositol- 3 kinase pathway attenuates microglial activation in vivo and in vitro. **Journal of neurochemistry**, v. 110, n. 5, p. 1547-1556, 2009.
- MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. A microtiter plate assay for superoxide using MTT reduction method. **Indian journal of biochemistry and biophysics**, v. 34, p. 535-539, 1997.
- MAHFOUZ, Mohamedain M.; KUMMEROW, Fred A. Oxidized low-density lipoprotein (LDL) enhances thromboxane A2 synthesis by platelets, but lysolecithin as a product of LDL oxidation has an inhibitory effect. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 62, n. 2, p. 183-200, 2000.
- MASON, R. Preston; TULENKO, Thomas N.; JACOB, Robert F. Direct evidence for cholesterol crystalline domains in biological membranes: role in human pathobiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1610, n. 2, p. 198-207, 2003.
- MATOS, Sheyla Leite et al. Dietary models for inducing hypercholesterolemia in rats. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 48, p. 203-209, 2005.
- MAUCH, Daniela H. et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1354-1357, 2001.
- MAYAGOITIA, Karina et al. Short-term exposure to dietary cholesterol is associated with downregulation of interleukin-15, reduced thigmotaxis and memory impairment in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 393, p. 112779, 2020.
- MAYEUX, Richard; STERN, Yaakov. Epidemiology of Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 8, p. a006239, 2012.
- MCLEAN, Catriona A. et al. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Annals of neurology**, v. 46, n. 6, p. 860-866, 1999.

- MECCA, Carmen et al. Microglia and aging: the role of the TREM2–DAP12 and CX3CL1–CX3CR1 axes. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 318, 2018.
- MEHTA, Kala M.; YEO, Gwen W. Systematic review of dementia prevalence and incidence in United States race/ethnic populations. **Alzheimer's & Dementia**, v. 13, n. 1, p. 72-83, 2017.
- MENDEZ, Mario F. Early-onset Alzheimer disease. **Neurologic clinics**, v. 35, n. 2, p. 263-281, 2017.
- MEUNIER, J.; IENI, J.; MAURICE, T. The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta₂₅₋₃₅ peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma₁ receptor. **Br J Pharmacol**, v. 149, n. 8, p. 998-1012, Dec 2006.
- MICALE, Vincenzo et al. Behavioral effects of dietary cholesterol in rats tested in experimental models of mild stress and cognition tasks. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 6, p. 462-471, 2008.
- MINGER, Stephen L. et al. Synaptic pathology in prefrontal cortex is present only with severe dementia in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 60, n. 10, p. 929-936, 2001.
- MITTER, Diana et al. The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. **Journal of neurochemistry**, v. 84, n. 1, p. 35-42, 2003.
- MOHAMMAD, Dana et al. Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms-a safety evaluation. **Expert opinion on drug safety**, v. 16, n. 9, p. 1009-1019, 2017.
- MOKHTAR, Sara H. et al. The Beta-amyloid protein of Alzheimer's disease: communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton. **International journal of Alzheimer's disease**, v. 2013, 2013.
- MOON, Minho et al. Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid- β 1-42 oligomer-injected mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 23, n. 1, p. 147-159, 2011.
- MORGAN, A. E. et al. Cholesterol metabolism: A review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. **Ageing research reviews**, v. 27, p. 108-124, 2016.
- MORI, Takashi et al. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP^{sw} mice. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 60, n. 8, p. 778-785, 2001.
- MURPHY, M. P. LeVine 3rd, H., 2010. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. **J. Alzheimers Dis**, v. 19, n. 1, p. 311-323.
- NÄSLUND, Jan et al. Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. **Jama**, v. 283, n. 12, p. 1571-1577, 2000.
- NERVI, F. O.; WEIS, H. J.; DIETSCHY, J. M. The kinetic characteristics of inhibition of hepatic cholesterologenesis by lipoproteins of intestinal origin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 11, p. 4145-4151, 1975.
- NES, W. David. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. **Chemical reviews**, v. 111, n. 10, p. 6423-6451, 2011.
- NG, Adeline Su Lyn et al. Distinct network topology in Alzheimer's disease and behavioral variant frontotemporal dementia. **Alzheimer's research & therapy**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2021.
- NISHINA, Patsy M.; VERSTUYFT, J.; PAIGEN, B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. **Journal of lipid research**, v. 31, n. 5, p. 859-869, 1990.
- NITRINI, Ricardo et al. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. **International Psychogeriatrics**, v. 21, n. 4, p. 622-630, 2009.
- NIZARI, Shereen; CARARE, Roxana O.; HAWKES, Cheryl A. Increased A β pathology in aged Tg2576 mice born to mothers fed a high fat diet. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

- ODDO, Salvatore et al. Temporal profile of amyloid- β (A β) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease: a link between A β and tau pathology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1599-1604, 2006.
- O'NEILL, Cora. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. **Experimental gerontology**, v. 48, n. 7, p. 647-653, 2013.
- OW, Sian- Yang; DUNSTAN, Dave E. A brief overview of amyloids and Alzheimer's disease. **Protein Science**, v. 23, n. 10, p. 1315-1331, 2014.
- PAIGEN, Beverly et al. Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 11, p. 3763-3767, 1987.
- PARATCHA, Gustavo; IBÁÑEZ, Carlos F. Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. **Current opinion in neurobiology**, v. 12, n. 5, p. 542-549, 2002.
- PATEL, Nikunj S. et al. Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Journal of neuroinflammation**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2005.
- PENG, Shiyong et al. Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 29, p. 9321-9329, 2009.
- PENKE, Botond; BOGÁR, Ferenc; FÜLÖP, Lívia. β -Amyloid and the pathomechanisms of Alzheimer's disease: a comprehensive view. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1692, 2017.
- PFRIEGER, Frank W.; UNGERER, Nicole. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. **Progress in lipid research**, v. 50, n. 4, p. 357-371, 2011.
- PIFFERI, Fabien; LAURENT, Benoit; PLOURDE, Mélanie. Lipid transport and metabolism at the blood-brain interface: Implications in health and disease. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 645646, 2021.
- PÜSCHEL, Gerhard P.; HENKEL, Janin. Dietary cholesterol does not break your heart but kills your liver. **Porto biomedical journal**, v. 3, n. 1, 2018.
- QUERZFURTH, H. W. Review article. Mechanism of disease Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 329-344, 2010.
- RABINOVICI, Gil D. Late-onset Alzheimer disease. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, v. 25, n. 1, p. 14, 2019.
- RAICHLIN, David A.; ALEXANDER, Gene E. Exercise, APOE genotype, and the evolution of the human lifespan. **Trends in neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 247-255, 2014.
- RANSOHOFF, Richard M.; ENGELHARDT, Britta. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 9, p. 623-635, 2012.
- RASCHETTI, Roberto et al. Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials. **PLoS medicine**, v. 4, n. 11, p. e338, 2007.
- REEVE, Emily et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations in older people with dementia. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 13, n. 6, p. 651-668, 2017.
- REFOLO, Lorenzo M. et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. **Neurobiology of disease**, v. 7, n. 4, p. 321-331, 2000.
- REID, Patrick C. et al. Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 11, n. 3, p. 383-392, 2007.
- REIJS, Babette LR et al. Association between later life lifestyle factors and Alzheimer's disease biomarkers in non-demented individuals: a longitudinal descriptive cohort study. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 60, n. 4, p. 1387-1395, 2017.

- ROBINSON, John L. et al. Perforant path synaptic loss correlates with cognitive impairment and Alzheimer's disease in the oldest-old. **Brain**, v. 137, n. 9, p. 2578-2587, 2014.
- ROCHA, Natália Pessoa et al. Peripheral blood mono-nuclear cells derived from Alzheimer's disease patients show elevated baseline levels of secreted cytokines but resist stimulation with β -amyloid peptide. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 49, n. 1, p. 77-84, 2012.
- RODWELL, VICTOR W.; NORDSTROM, JEFFREY L.; MITSCHELEN, JONATHAN J. Regulation of HMG-CoA reductase. **Advances in lipid research**, v. 14, p. 1-74, 1976.
- SAEZ-ATIENZAR, Sara; MASLIAH, Eliezer. Cellular senescence and Alzheimer disease: the egg and the chicken scenario. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 8, p. 433-444, 2020.
- SAH, Saroj Kumar et al. Effect of high-fat diet on cognitive impairment in triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 493, n. 1, p. 731-736, 2017.
- SCHEFF, Stephen W. et al. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Neurobiology of aging**, v. 27, n. 10, p. 1372-1384, 2006.
- SCHINDOWSKI, K.; BELARBI, K.; BUEE, L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. **Genes, brain and behavior**, v. 7, p. 43-56, 2008.
- SCHREURS, Bernard G. The effects of cholesterol on learning and memory. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 8, p. 1366-1379, 2010.
- SCHREYER, Sandra A.; WILSON, Deborah L.; LEBOEUF, Renée C. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 136, n. 1, p. 17-24, 1998.
- SCHWAB, Claudia; HOSOKAWA, Masato; MCGEER, Patrick L. Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. **Experimental neurology**, v. 188, n. 1, p. 52-64, 2004.
- SELKOE, Dennis J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 789-791, 2002.
- SENGUPTA, U.; NILSON, A. N.; KAYED, R. The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. **EBioMedicine**. 2016; 6: 42–49.
- SHAFATI, M. et al. Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes in vivo. **Journal of internal medicine**, v. 270, n. 4, p. 377-387, 2011.
- SHARIATPANAHI, M. et al. The involvement of PKG inhibitor in regulation of apoptosis and autophagy markers in spatial memory deficit induced by A β . **Fundam Clin Pharmacol**, Mar 15 2016.
- SHARMA, Diya; HILL, Ashley E.; CHRISTOPHER, Mary M. Hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia as biochemical markers of disease in companion rabbits. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 47, n. 4, p. 589-602, 2018.
- SHERIDAN, Graham K.; MURPHY, Keith J. Neuron–glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. **Open biology**, v. 3, n. 12, p. 130181, 2013.
- SIMONS, Mikael et al. Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6460-6464, 1998.
- SIMS, Rebecca; HILL, Matthew; WILLIAMS, Julie. The multiplex model of the genetics of Alzheimer's disease. **Nature neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 311-322, 2020.
- SIRI-TARINO, Patty W. et al. Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 3, p. 535-546, 2010.
- SOLOMON, Alina et al. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. **Dementia and geriatric cognitive disorders**, v. 28, n. 1, p. 75-80, 2009.

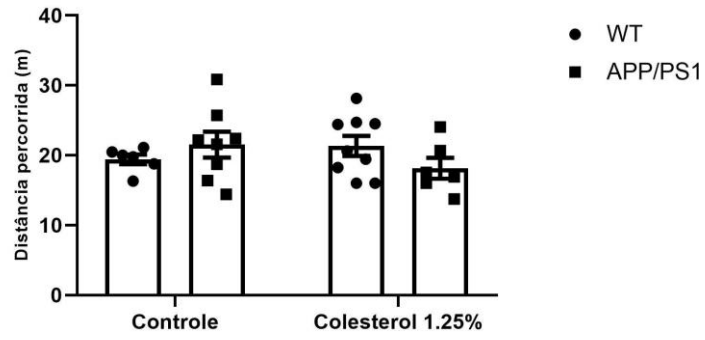
- SONG, Jing-Hui; YU, Jin-Tai; TAN, Lan. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease: risk, mechanisms, and therapy. **Molecular neurobiology**, v. 52, n. 3, p. 1477-1493, 2015.
- SONG, Xiaowei; MITNITSKI, Arnold; ROCKWOOD, Kenneth. Age-related deficit accumulation and the risk of late-life dementia. **Alzheimer's research & therapy**, v. 6, n. 5, p. 1-13, 2014.
- SPARKS, D. Larry et al. Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. **Archives of neurology**, v. 62, n. 5, p. 753-757, 2005.
- SPARKS, D. Larry et al. Induction of Alzheimer-like β -amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. **Experimental neurology**, v. 126, n. 1, p. 88-94, 1994.
- SPARKS, D. Larry et al. Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease: a review. **Microscopy research and technique**, v. 50, n. 4, p. 287-290, 2000.
- SPARKS, D. Larry; SCHREURS, Bernard G. Trace amounts of copper in water induce β -amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 11065-11069, 2003.
- SPILLANTINI, Maria Grazia; GOEDERT, Michel. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. **Trends in neurosciences**, v. 21, n. 10, p. 428-433, 1998.
- STEFANI, Massimo; LIGURI, Gianfranco. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. **Current Alzheimer Research**, v. 6, n. 1, p. 15-29, 2009.
- STROBEL, S. et al. Changes in the expression of genes related to neuroinflammation over the course of sporadic Alzheimer's disease progression: CX3CL1, TREM2, and PPAR γ . **Journal of neural transmission**, v. 122, n. 7, p. 1069-1076, 2015.
- SUÁREZ BAGNASCO, Mariana. Psychological issues and cognitive impairment in adults with familial hypercholesterolemia. **Family practice**, v. 34, n. 5, p. 520-524, 2017.
- SUMIYOSHI, Maho; SAKANAKA, Masahiro; KIMURA, Yoshiyuki. Chronic intake of a high-cholesterol diet resulted in hepatic steatosis, focal nodular hyperplasia and fibrosis in non-obese mice. **British journal of nutrition**, v. 103, n. 3, p. 378-385, 2010.
- TAKECHI, Ryusuke et al. Probucol prevents blood-brain barrier dysfunction in wild-type mice induced by saturated fat or cholesterol feeding. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, n. 1, p. 45-52, 2013.
- TANQUEIRO, S. R. et al. Inhibition of NMDA receptors prevents the loss of BDNF function induced by amyloid, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 237. 2018.
- TAPIA-ARANCIBIA, Lucia et al. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. **Brain research reviews**, v. 59, n. 1, p. 201-220, 2008.
- TAYEB, Haythum O. et al. Bapineuzumab and solanezumab for Alzheimer's disease: is the 'amyloid cascade hypothesis' still alive?. **Expert opinion on biological therapy**, v. 13, n. 7, p. 1075-1084, 2013.
- TELL, Volkmar; HILGEROTH, Andreas. Recent developments of protein kinase inhibitors as potential AD therapeutics. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 189, 2013.
- THELEN, Karin M. et al. Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 3, p. 1146-1152, 2006.
- THIELE, Christoph et al. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. **Nature cell biology**, v. 2, n. 1, p. 42-49, 2000.
- TOMIYAMA, Takami et al. A mouse model of amyloid β oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 14, p. 4845-4856, 2010.

- TRICARICO, Paola Maura; CROVELLA, Sergio; CELSI, Fulvio. Mevalonate pathway blockade, mitochondrial dysfunction and autophagy: a possible link. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 16067-16084, 2015.
- TSUI-PIERCHALA, Brian A. et al. Lipid rafts in neuronal signaling and function. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 8, p. 412-417, 2002.
- TSUTSUMI, Kazuhiko; HAGI, Akifumi; INOUE, Yasuhide. The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 24, n. 5, p. 579-581, 2001.
- TURLEY, Stephen D.; SPADY, David K.; DIETSCHY, John M. Alteration of the degree of biliary cholesterol saturation in the hamster and rat by manipulation of the pools of preformed and newly synthesized cholesterol. **Gastroenterology**, v. 84, n. 2, p. 253-264, 1983.
- ULLRICH, Celine; PIRCHL, Michael; HUMPEL, Christian. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 45, n. 4, p. 408-417, 2010.
- UNGER LITHNER, Christina; M HEDBERG, Monika; NORDBERG, Agneta. Transgenic mice as a model for Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 8, n. 8, p. 818-831, 2011.
- VAN DER WULP, Mariëtte YM; VERKADE, Henkjan J.; GROEN, Albert K. Regulation of cholesterol homeostasis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 368, n. 1-2, p. 1-16, 2013.
- VAN DYCK, Christopher H. Anti-amyloid- β monoclonal antibodies for Alzheimer's disease: pitfalls and promise. **Biological psychiatry**, v. 83, n. 4, p. 311-319, 2018.
- VAN VLIET, Peter et al. The influence of age on the association between cholesterol and cognitive function. **Experimental gerontology**, v. 44, n. 1-2, p. 112-122, 2009.
- VESSELINOVITCH, D.; WISSLER, R. W.; DOULL, J. Experimental production of atherosclerosis in mice: Part 1. effect of various synthetic diets and radiation on survival time, food consumption and body weight in mice. **Journal of Atherosclerosis Research**, v. 8, n. 3, p. 483-495, 1968.
- VETRIVEL, Kulandaivelu S.; THINAKARAN, Gopal. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 8, p. 860-867, 2010.
- VIANA DA SILVA, Silvia et al. Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016.
- VÖIKAR, Vootele; RAUVALA, Heikki; IKONEN, Elina. Cognitive deficit and development of motor impairment in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. **Behavioural brain research**, v. 132, n. 1, p. 1-10, 2002.
- WANG, Tao et al. A phase II randomized trial of sodium oligomannate in Alzheimer's dementia. **Alzheimer's research & therapy**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2020.
- WANG, Wen-Ying et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. **Annals of translational medicine**, v. 3, n. 10, 2015.
- WANG, Zi-Xuan et al. The essential role of soluble A β oligomers in Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1905-1924, 2016.
- WILBERDING, Akiko et al. Multiple cytokines are involved in the early events leading to the Alzheimer's disease pathology. **Tottori Rinsho Kagaku Kenkyukai Shi**, v. 1, n. 2, p. 359, 2008.
- WU, Wanqiang et al. Astaxanthin alleviates brain aging in rats by attenuating oxidative stress and increasing BDNF levels. **Food & function**, v. 5, n. 1, p. 158-166, 2014.
- WYSS-CORAY, Tony; MUCKE, Lennart. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. **Neuron**, v. 35, n. 3, p. 419-432, 2002.

- YAMAZAKI, Yu et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 9, p. 501-518, 2019.
- YAN, Shi Du et al. RAGE and Alzheimer's disease: a progression factor for amyloid- β -induced cellular perturbation?. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, n. 4, p. 833-843, 2009.
- YIN, Wu et al. Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia [S]. **Journal of lipid research**, v. 53, n. 1, p. 51-65, 2012.
- YUAN, Yiqiong et al. Holothuria leucospilota polysaccharides ameliorate hyperlipidemia in high-fat diet-induced rats via short-chain fatty acids production and lipid metabolism regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4738, 2019.
- ZADELAAR, Susanne et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, n. 8, p. 1706-1721, 2007.
- ZAMBÓN, Daniel et al. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **The American journal of medicine**, v. 123, n. 3, p. 267-274, 2010.
- ZHANG, Juan; LIU, Qiang. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. **Protein & cell**, v. 6, n. 4, p. 254-264, 2015.
- ZHANG, Juan; LIU, Qiang. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. **Protein & cell**, v. 6, n. 4, p. 254-264, 2015.
- ZHANG, Xiang et al. Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites. **Gut**, v. 70, n. 4, p. 761-774, 2021.
- ZHAO, Yihan et al. Small rodent models of atherosclerosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, p. 110426, 2020.
- ZONTA, Barbara; MINICHIELLO, Liliana. Synaptic membrane rafts: traffic lights for local neurotrophin signaling?. **Frontiers in synaptic neuroscience**, v. 5, p. 9, 2013.

8. ANEXOS

ANEXO A: Efeito da dieta acrescida de colesterol sobre a locomoção de animais APP/PS1 ou WT, machos no teste de campo aberto.



ANEXO B: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo 374/2018.



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 374/2018
Título do projeto: Avaliação da associação entre dislipidemia e neurodegeneração através da via PI3K/mTOR e do inflamassoma NRLP3 em modelo de Doença de Alzheimer
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Farmacologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 03/12/2018. Validade: 03/12/2018 à 02/12/2023 RECOMENDAÇÃO:
Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados. O e-mail enviado pelo CONCEA se refere ao credenciamento da CEUA, e não dos biotérios. CIAEP é designado para a CEUA.

Belo Horizonte, 03/12/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO C: Artigo submetido a revista Current Neuropharmacology.

Current Neuropharmacology



**Receptors for Advanced Glycation End products (RAGE):
promising targets aiming the treatment of
neurodegenerative conditions**

Journal:	<i>Current Neuropharmacology</i>
Manuscript ID	CN-2022-0076.R2
Manuscript Type:	Thematic Issue Article
Date Submitted by the Author:	14-Jul-2022
Complete List of Authors:	Koerich, Suelyn; Universidade Federal de Minas Gerais Parreira, Gabriela; Universidade Federal de Minas Gerais Lamounier, Douglas; Universidade Federal de Minas Gerais Vieira, Rafael; Universidade Federal de Minas Gerais de Oliveira, Antonio
Keywords:	AGEs, Neuroinflammation, Neurodegeneration, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Oxidative stress, Drug development, RAGE

SCHOLARONE™
Manuscripts