

Daiane Fátima Engel

**EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A
HIPERCOLESTEROLEMIA E A DEPRESSÃO:
ENVOLVIMENTO DA NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL
ADULTA**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Andreza
Fabro de Bem

Coorientadora: Profa. Dra. Patricia de
Souza Brocardo

Florianópolis
2016

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

Engel, Daiane Fátima
EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A
HIPERCOLESTEROLEMIA E A DEPRESSÃO: ENVOLVIMENTO DA
NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL ADULTA / Daiane Fátima Engel ;
orientadora, Andreza Fabro de Bem ; coorientadora,
Patricia de Souza Brocardo. - Florianópolis, SC, 2016.
184 p.

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

Inclui referências

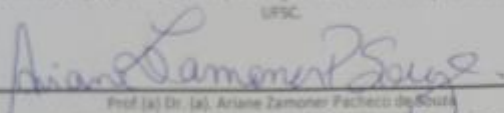
1. Bioquímica. 2. Hipercolesterolemia familiar. 3.
Depressão. 4. Neurogênese adulta. 5. Receptor de LDL. I.
de Bem, Andreza Fabro . II. Brocardo, Patricia de Souza.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

"Evidências Experimentais da Associação Entre a Hipercolesterolemia e a Depressão: Envolvimento da Neurogênese Hipocampal Adulta"

Por

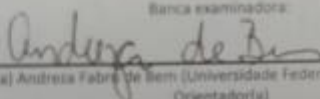
Dalane Fátima Engel

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (035/PPGBQJ/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.




Prof. (a) Dr. (a). Ariane Zamoner Pacheco de Sousa
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



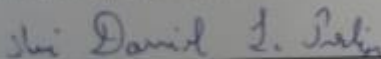
Dr. (a) Andressa Fabre de Bem (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



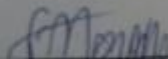
Dr. (a) Ana Lucia Severo Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina)



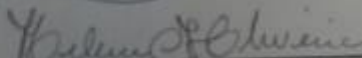
Dr. (a) Eduardo Luiz Gaspar Moreira (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. (a) Rui Daniel Schröder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. (a) Fabrício de Araujo Moreira (Universidade Federal de Minas Gerais)



Dr. (a) Helena Coutinho Franco de Oliveira (Universidade Estadual de Campinas)

Florianópolis, 16 de Dezembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Em cada etapa desta caminhada tive as pessoas certas ao meu lado e, portanto, gostaria de agradecer especialmente:

À minha família. Aos meus pais Romeu e Noeli por terem sempre compreendido as minhas escolhas me apoiando incondicionalmente. À minha irmã Sandra, obrigada especialmente por estar sempre junto aos nossos pais nas minhas sucessivas ausências.

À minha orientadora, Profa. Andreza Fabro de Bem, pela oportunidade de realizar o doutorado em seu grupo de pesquisa. Agradeço por todos os ensinamentos, incentivo e pela confiança no meu trabalho. Este período sob sua orientação foi de intenso crescimento e aprendizado. Seu entusiasmo pelo que faz me marcou.

À minha co-orientadora Profa. Patricia de Souza Brocardo, por todas as discussões científicas e auxílio constante durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório: Gabriela, Gianni, Letícia, Leysle e Ruth, pela amizade, auxílio nos experimentos e discussões científicas. À Jade, especialmente, pela nossa parceria desde os últimos experimentos do meu mestrado, por ter sido fundamental colaboradora e amiga durante toda esta etapa. Muito obrigada por todas as comidinhas e conversas compartilhadas para diminuir o cortisol ao fim do dia.

Aos colegas dos demais laboratórios que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho, em especial à Danúbia e Vivian.

Ao Prof. Gerd Kempermann que me recebeu em seu laboratório na Alemanha para a realização do doutorado sanduíche, proporcionando-me uma experiência de crescimento profissional e pessoal. Pela sua confiança e apoio científico.

À Dra. Anna Grzyb pela orientação nos experimentos, apontamentos críticos e amizade, durante o período de doutorado sanduíche.

Aos colegas do grupo alemão: Alexandra, Christina, Daniel, Fanny, Lisa, Muhammad, Odette, Rupert, Ruslan, Salma, Sara, Steffi, Tara e Zeina. Em especial Vijay, pelas incansáveis (mesmo) discussões científicas, mas principalmente pela sua amizade e por me deixar na dúvida se frequentei mais restaurantes indianos ou alemães enquanto estive em Dresden.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, por todos os ensinamentos e em especial à Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues, Prof. Marcelo Farina e Prof. Eduardo Moreira pela colaboração.

À professora Joana Gil-Mohapel pelas discussões científicas e indicação do grupo do Prof. Kempermann.

Aos técnicos do LAMEB I e II, Bibiana, Denis, Vanessa, Chirle, Emily e Demetrio pela disponibilidade e auxílio na utilização de equipamentos.

A todos os colaboradores e amigos, que foram fundamentais nesta fase da minha vida.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained”. (Marie Curie)

RESUMO

A hipercolesterolemia familiar é uma doença do metabolismo das lipoproteínas causada principalmente por mutações no gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL). A resultante perda da função do receptor de LDL (LDLr) tem como principal consequência o aumento das concentrações plasmáticas de colesterol. Estudos clínicos reportam, com certa frequência, a comorbidade entre a hipercolesterolemia e transtornos de humor, como a depressão. Além disso, aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica, redução na proliferação celular hipocampal adulta e prejuízos comportamentais de aprendizado e memória foram reportadas em camundongos LDLr^{-/-} (nocautes para o LDLr, modelo animal de hipercolesterolemia familiar). O primeiro objetivo deste estudo foi verificar o comportamento de camundongos LDLr^{-/-} em testes preditivos para a depressão. Sabendo que a neurogênese hipocampal adulta é importante para a manutenção do humor e da cognição, o segundo objetivo foi verificar se a comorbidade entre a hipercolesterolemia e a depressão envolve alterações na neurogênese hipocampal adulta. Nossos resultados demonstraram que os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram comportamento tipo-depressivo (anedonia, diminuição do auto-cuidado e da motivação) em testes preditivos para depressão. Este comportamento tipo-depressivo foi revertido pelo tratamento antidepressivo repetido (fluoxetina, 7 dias). Os camundongos LDLr^{-/-} também apresentaram aumento na atividade da monoamina oxidase (MAO) A no córtex cerebral e no hipocampo. Neste estudo as análises comportamentais também revelaram comprometimento de função cognitiva dependente do giro denteado (GD) hipocampal, o que corroborou a redução na proliferação e neurogênese das células precursoras neuronais (CPNs) observada nesta estrutura. Em outra etapa experimental, em cultivo primário de CPNs isoladas do GD de camundongos C57BL/6 adultos, foi caracterizada uma maior expressão gênica de enzimas de síntese de colesterol e do LDLr no estágio proliferativo, enquanto os genes do LRP1 e de enzimas de degradação têm sua expressão aumentada durante a diferenciação celular. Corroborando os resultados obtidos em camundongos LDLr^{-/-}, tanto a exposição destas células à LDL humana isolada, quanto o silenciamento gênico do LDLr (LDLr siRNA), reduziram a proliferação de CPNs. O tratamento com LDL também reduziu a diferenciação neuronal de CPNs, induziu acúmulo de gotículas lipídicas intracelulares e inibiu a expressão gênica de enzimas de síntese do colesterol e do LDLr. Por sua

vez, o LDLr siRNA reduziu também os níveis de RNAm do LRP1. A análise de *microarray* revelou que a LDL inibiu fortemente processos celulares relacionados ao metabolismo do colesterol. O tratamento com siRNA alterou a expressão relativa de muitos genes, no entanto a análise de ontologia não revelou associação significativa destes genes com processos celulares específicos. Ainda, ambos os tratamentos aumentaram a capacidade de reserva das CPNs no teste de função mitocondrial. Em conjunto, estes resultados caracterizam o fenótipo tipo-depressivo e a redução da neurogênese hipocampal adulta em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, sendo que a neurogênese parece ser influenciada tanto pela presença da LDL no nicho neurogênico quanto pela função do LDLr. Conjuntamente, estes dados destacam o papel do metabolismo do colesterol na neurogênese adulta e reforçam as observações clínicas que associam a hipercolesterolemia à depressão.

Palavras-chave: Depressão; Hipercolesterolemia familiar; Neurogênese adulta; LDL; Receptor de LDL; Colesterol.

ABSTRACT

Familial hypercholesterolemia is a lipoprotein metabolism disorder caused primarily by mutations in the low-density lipoprotein receptor (LDLr) gene, causing loss of function of the LDLr and increased plasma cholesterol. Clinical studies frequently report comorbidity between hypercholesterolemia and depression. Supporting those observations, pre-clinical studies from our group have shown impairments in the CNS of LDLr^{-/-} mice (knockout mice for the LDLr, a murine model of familial hypercholesterolemia). Increased blood brain barrier permeability, reduced hippocampal cell proliferation, and learning and memory impairments in behavioral tasks are some of the CNS abnormalities observed in these mice. The first aim in this study was to verify the behavior of LDLr^{-/-} mice in predictive tasks for depression. Considering that adult neurogenesis is thought to play a role in both mood regulation and cognition, the following objective in this study aimed to evaluate if an impairment in proliferation and differentiation of hippocampal adult neural stem cells (aNSC) may be underlying the comorbidity between hypercholesterolemia and depression. Endorsing this hypothesis, in the present study we show that LDLr^{-/-} mice present a depressive-like behavior (anhedonia, reduction in self-care and motivational behavior). This depressive-like behavior was abolished by repeated antidepressant treatment (fluoxetine, 7 days). In addition, the LDLr^{-/-} mice presented increased MAO-A activity in the cerebral cortex and hippocampus. Moreover, a deficit in dentate gyrus (DG)-dependent cognitive task was observed in these mice using a DG-dependent behavioral test, corroborating the reduction in DG cell proliferation and neurogenesis. Primary culture of aNSCs isolated from the DG of adult C57BL/6 mice demonstrated that the expression of enzymes involved in cholesterol synthesis (HMG-CoA reductase and squalene synthase) and of LDLr peaks during the proliferation stage of the neurogenic process. On the other hand, the expression of LRP1, cholesterol 24-hydroxylase, and sterol 27-hydroxylase is up-regulated during the differentiation stage. In agreement with the observations from the LDLr^{-/-} mice, exposure to both human LDL as well as silencing of the LDLr (using an LDLr siRNA) reduced cell proliferation and/or neuronal differentiation of aNSCs monolayers. LDL treatment was also associated with an increase in the number of lipid droplets and a down-regulation of mRNA levels of the LDLr and enzymes involved in cholesterol synthesis, whereas LDLr siRNA also reduced LRP1 gene expression. Microarray analysis showed that LDL down-regulated cholesterol

metabolism. On the other hand, LDLr siRNA altered the relative expression of hundreds of genes, however a gene ontology analysis failed to define a clear relationship with cellular functions. In addition, both treatments increased the reserve capacity of aNSCs to respond to mitochondrial stress. Altogether, this study describes the depressive-like phenotype and deficits in adult hippocampal neurogenesis in an experimental model of familial hypercholesterolemia. These deficits may result from LDL being present in the neurogenic niche and from compromised LDLr function. In conclusion, the present data implicate cholesterol metabolism as a modulator of adult hippocampal neurogenesis and support the observed co-morbidity between hypercholesterolemia and depression.

Keywords: Depression; Familial hypercholesterolemia; Adult neurogenesis; LDL; LDL receptor; Cholesterol.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Hipótese monoaminérgica da depressão..... | 27 |
| Figura 2. Hipótese neurotrófica da depressão..... | 28 |
| Figura 3. Neurogênese adulta no hipocampo..... | 31 |
| Figura 4. Principais etapas da biossíntese do colesterol..... | 38 |
| Figura 5. Captação de colesterol pelo receptor da lipoproteína de baixa densidade..... | 40 |
| Figura 6. Família dos receptores de lipoproteína de baixa densidade..... | 42 |
| Figura 7. Regulação do metabolismo do colesterol por SREBP..... | 43 |
| Figura 8. Metabolismo do colesterol no sistema nervoso central..... | 49 |
| Figura 9. Protocolo experimental 1..... | 56 |
| Figura 10. Comportamento tipo-depressivo e efeito da administração da fluoxetina em camundongos C57BL/6 e LDLr ^{-/-} | 64 |
| Figura 11. Coeficiente de correlação de Pearson entre os níveis de colesterol plasmático e o comportamento tipo-depressivo..... | 65 |
| Figura 12. Atividade das isoformas da monoamina oxidase em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} | 66 |
| Figura 13. Efeito da exposição à LDL sobre a atividade da monoamina oxidase e produção de espécies reativas em células SH-SY5Y..... | 68 |
| Figura 14. Protocolo experimental 2..... | 74 |
| Figura 15. Avaliação comportamental de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} em tarefas hipocampo-dependentes..... | 81 |
| Figura 16. Análise da proliferação celular na camada de células granulares do GD em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} | 82 |
| Figura 17. Maturação celular na camada de células granulares do GD em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} | 83 |
| Figura 18. Diferenciação neuronal na camada de células granulares do GD em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} | 83 |
| Figura 19. Correlação da razão de exploração no teste da mudança métrica e o número de células BrdU positivas..... | 84 |
| Figura 20. Expressão gênica de BDNF total e TrkB no córtex cerebral e hipocampo de camundongos selvagens e LDLr ^{-/-} | 85 |
| Figura 21. Protocolo experimental 3..... | 95 |
| Figura 22. Protocolo experimental dos pulsos de LDL marcada com fluoróforos..... | 104 |
| Figura 23. Protocolo experimental e parâmetros mitocondriais avaliados na respirometria de alta resolução..... | 106 |
| Figura 24. Expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo do colesterol..... | 110 |
| Figura 25. Efeito do tratamento in vitro com LDL, 27-OH e do silenciamento da expressão do LDLr sobre a viabilidade e proliferação de CPNs..... | 111 |
| Figura 26. Efeito do tratamento in vitro com LDL e do silenciamento da expressão do LDLr sobre o ciclo celular e a proliferação de CPNs..... | 113 |
| Figura 27. Efeito da incubação de CPNs com LDL na formação de neuroesferas e sua diferenciação..... | 114 |

| | |
|--|-----|
| Figura 28. Marcação de gotículas lipídicas com a sonda fluorescente LD540 | 115 |
| Figura 29. Detecção de colesterol intracelular com a sonda fluorescente filipina | 116 |
| Figura 30. Expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo do colesterol após o tratamento com LDL e do silenciamento gênico do LDLr | 118 |
| Figura 31. Internalização de LDL marcada com fluoróforos | 119 |
| Figura 32. Efeito do tratamento com LDL na internalização e transporte intracelular de LDL | 120 |
| Figura 33. Efeito do silenciamento do LDLr na internalização e transporte intracelular de LDL | 121 |
| Figura 34. Respirometria de alta resolução após o tratamento com LDL | 123 |
| Figura 35. Respirometria de alta resolução após o tratamento com LDLr siRNA | 124 |
| Figura 36. Análise da geração de espécies reativas após o tratamento com LDL | 125 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Níveis plasmáticos de colesterol total em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr ^{-/-} | 63 |
| Tabela 2. Sequências de iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR | 101 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

24-OH – 24-hidroxicolesterol
27-OH – 27-hidroxicolesterol
ABC – Transportadores de cassete de ligação de ATP
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
Acetil-CoA – Acetilcoenzima A
ACAT – Acetiltransferase
AL – Lipase ácida
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA – Análise de variância
ApoB100 – Apolipoproteína B100
ApoE – Apolipoproteína E
ApoER2 – Receptor de apoE 2
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE – Barreira hematoencefálica
BLBP – Proteína ligadora de lipídeo do cérebro
BrdU – 5-bromo-2'-deoxiuridina
CA – *Cornus ammon*
CFSE – Succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína
CPN – Células precursora neuronal
CREB – Proteína de ligação responsiva ao AMPc
CYP46A1 – colesterol 24-hidroxilase
DCX – Doublecortina
DSM-V – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais- 5ª Edição
EEA1 – Antígeno 1 do endossomo primário
ER – Espécies reativas
FGF-2 – Fator de crescimento de fibroblasto básico
FT – Fator trófico
GABA – Ácido gama-butírico
GCL – Camada de células granulares
GD – Giro denteado
GFAP – Proteína glial fibrilar ácida
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HF – Hipercolesterolemia familiar
HMGCR – Hidroxi 3-metilglutarilcoenzima A redutase
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISRS – Inibidor seletivo de recaptção de serotonina
LAMP-1 – Proteína de membrana 1 associada ao lisossomo

LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDLr – Receptor de LDL
LDLRAP – Proteína adaptadora do receptor
LDLr^{-/-} – Camundongos nocautes para o receptor de LDL
LRP1 – Proteína relacionada ao LDLr
LTP – Potenciação de longa duração
LXR – Receptor hepático X
MAO – Monoamina oxidase
MCM2 – Proteína de manutenção do mini-cromossoma
ML – Camada molecular
NE – Noradrenalina
NeuN – Antígeno nuclear neuronal
NGF – Fator de crescimento do nervo
PCSK9 – Proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9
Prox1: *Prospero homeobox 1*
RE – retículo endoplasmático
RNA – Ácido ribonucleico
RNAm – RNA mensageiro
qRT-PCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
SCP-2 – Proteína carreadora de colesterol
SiRNA – *Small interfering RNA*
SREBP – Proteína ligadora do elemento regulatório de esteróis
SGZ – Zona subgranular
SNC – Sistema nervoso central
Sox2 – Região y determinante do sexo-box 2
StAR – Proteína reguladora aguda da esteroidogênese,
SVZ – Zona subventricular
Tbr2 – *t-box brain 2*
TCA – Teste do campo aberto
TrkB – Cinase relacionada a tropomiosina – B
TSC – Teste de suspensão pela cauda
VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 25 |
| 1.1. Transtorno depressivo maior | 25 |
| 1.2. Neurogênese | 29 |
| 1.3. Hipercolesterolemia | 34 |
| 1.3.1. <i>Hipótese vascular da depressão</i> | 34 |
| 1.3.2. <i>Metabolismo do colesterol e o receptor de LDL</i> | 36 |
| 1.3.3. <i>Hipercolesterolemia familiar</i> | 43 |
| 1.3.4. <i>Hipercolesterolemia familiar e o sistema nervoso central</i> | 46 |
| 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE | 51 |
| 3. OBJETIVOS | 53 |
| 3.1. Objetivo geral | 53 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 53 |
| 4. CAPÍTULO I | 55 |
| 4.1. Materiais e métodos | 55 |
| 4.1.1. <i>Protocolo experimental</i> | 55 |
| 4.1.2. <i>Estudo in vivo</i> | 56 |
| 4.1.2.1. <i>Animais</i> | 56 |
| 4.1.2.2. <i>Tratamento</i> | 57 |
| 4.1.2.3. <i>Testes comportamentais</i> | 57 |
| 4.1.2.3.1. <i>Teste de preferência pela sacarose</i> | 57 |
| 4.1.2.3.2. <i>Teste de borrifagem da sacarose</i> | 57 |
| 4.1.2.3.3. <i>Teste de suspensão da cauda (TSC)</i> | 58 |
| 4.1.2.3.4. <i>Teste do campo aberto (TCA)</i> | 58 |
| 4.1.2.4. <i>Ensaio bioquímicos</i> | 58 |
| 4.1.2.4.1. <i>Quantificação do colesterol plasmático</i> | 58 |
| 4.1.2.4.2. <i>Ensaio de atividade da monoamina oxidase</i> | 59 |
| 4.1.3. <i>Estudo in vitro</i> | 59 |
| 4.1.3.1. <i>Materiais</i> | 59 |
| 4.1.3.2. <i>Preparo da LDL humana</i> | 60 |
| 4.1.3.3. <i>Cultivo celular e tratamento</i> | 60 |
| 4.1.3.4. <i>Determinação da geração de espécies reativas</i> | 61 |
| 4.1.3.5. <i>Determinação de proteínas</i> | 61 |
| 4.1.4. <i>Análise estatística</i> | 61 |
| 4.2. Resultados | 62 |
| 4.3. Discussão | 69 |
| 5. CAPÍTULO II | 73 |
| 5.1. Materiais e métodos | 73 |
| 5.1.1. <i>Protocolo experimental</i> | 73 |
| 5.1.2. <i>Animais</i> | 74 |
| 5.1.3. <i>Tratamento</i> | 74 |
| 5.1.4. <i>Testes comportamentais</i> | 75 |
| 5.1.4.1. <i>Aparato experimental e ambientação</i> | 75 |
| 5.1.4.2. <i>Teste da mudança métrica</i> | 75 |

| | |
|--|-----|
| 5.1.4.3. <i>Teste da ordem temporal</i> | 76 |
| 5.1.4.4. <i>Análise comportamental</i> | 76 |
| 5.1.5. <i>Análise da neurogênese hipocampal adulta</i> | 77 |
| 5.1.6. <i>Quantificação morfológica</i> | 78 |
| 5.1.7. <i>Análise fenotípica</i> | 78 |
| 5.1.8. <i>Determinação da expressão gênica (qRT-PCR)</i> | 78 |
| 5.1.9. <i>Análise estatística</i> | 79 |
| 5.2. Resultados | 80 |
| 5.3. Discussão | 86 |
| 6. CAPÍTULO III | 93 |
| 6.1. Materiais e métodos | 93 |
| 6.1.1. <i>Protocolo experimental</i> | 93 |
| 6.1.2. <i>Animais</i> | 95 |
| 6.1.3. <i>Materiais</i> | 95 |
| 6.1.4. <i>Cultura de células precursoras neuronais de hipocampo adulto</i> | 95 |
| 6.1.5. <i>Silenciamento gênico</i> | 97 |
| 6.1.6. <i>Preparo da LDL humana</i> | 97 |
| 6.1.7. <i>Imunocitoquímica</i> | 98 |
| 6.1.8. <i>Análise da viabilidade celular</i> | 99 |
| 6.1.9. <i>Análise da proliferação e do ciclo celular</i> | 99 |
| 6.1.10. <i>Determinação da expressão gênica (qRT-PCR)</i> | 100 |
| 6.1.11. <i>Análise de microarranjos de DNA</i> | 101 |
| 6.1.12. <i>Análise de gotículas lipídicas e colesterol intracelular</i> | 103 |
| 6.1.13. <i>Captação e transporte intracelular de LDL</i> | 103 |
| 6.1.14. <i>Respirometria de alta resolução</i> | 104 |
| 6.1.15. <i>Determinação da geração de espécies reativas</i> | 107 |
| 6.1.16. <i>Análise estatística</i> | 107 |
| 6.2. Resultados | 108 |
| 6.3. Discussão | 126 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 133 |
| 8. SUMÁRIO E CONCLUSÕES | 135 |
| 9. PERSPECTIVAS | 137 |
| REFERÊNCIAS | 139 |

Lista de publicações relacionadas à Tese:

Engel DF, de Oliveira J, Lopes JB, Santos DB, Moreira EL, Farina M, Rodrigues AL, de Souza Brocardo P, de Bem AF. Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr^{-/-} mouse experimental model. *Behav Brain Res*, 311:31-38, 2016.

Outras publicações durante o período de Doutorado:

Neves FS, Marques PT, Barros-Aragão F, Nunes JB, Venancio AM, Cozachenco D, Frozza RL, Passos GF, Costa R, de Oliveira J, Engel DF, De Bem AF, Benjamim CF, De Felice FG, Ferreira ST, Clarke JR, Figueiredo CP. Brain-Defective Insulin Signaling Is Associated to Late Cognitive Impairment in Post-Septic Mice. *Mol Neurobiol*. 2016, *in press*.

Szczepanik JC, de Oliveira PA, de Oliveira J, Mack JM, Engel DF, Rial D, Moreira EL, de Bem AF, Prediger RD. Caffeine mitigates the locomotor hyperactivity in middle-aged low-density lipoprotein receptor (LDLr)-knockout mice. *CNS Neurosci Ther*, 22(5):420-422, 2016.

Lopes JB, de Oliveira J, Engel DF, de Paula GC, Moreira EL, de Bem AF. Efficacy of donepezil for cognitive impairments in familial hypercholesterolemia: preclinical proof of concept. *CNS Neurosci Ther*, 21(12):964-966, 2015.

Colle D, Santos DB, Hartwig JM, Godoi M, Engel DF, de Bem AF, Braga AL, Farina M. Succinobucol, a lipid-lowering drug, protects against 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in SH-SY5Y cells via upregulation of glutathione levels and glutamate cysteine ligase activity. *Mol Neurobiol*, 53(2):1280-1295, 2016.

Moreira EL, de Oliveira J, Engel DF, Walz R, de Bem AF, Farina M, Prediger RD. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? *Journal of Neural Transmission*, 121(4):415-426, 2014.

Assis LC, Stralioetto MR, Engel D, Hort MA, Dutra RC, de Bem AF. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. *Neuroscience*, 279:220-231, 2014.

APRESENTAÇÃO

Esta Tese de Doutorado está organizada na forma de uma introdução geral, contendo a revisão da literatura, seguida por três capítulos. Cada capítulo contém materiais e métodos, resultados e discussão. Ao final, há uma breve conclusão geral dos resultados obtidos. As referências bibliográficas foram organizadas em seção única.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno depressivo maior

Segundo o último levantamento da Organização Mundial da Saúde, realizado em 2012, estima-se que o transtorno depressivo maior ou depressão, afeta em torno de 350 milhões de pessoas em todo o mundo. Com relação ao Brasil, são poucos os dados epidemiológicos sobre a prevalência de transtornos depressivos. Contudo, recentemente um estudo de meta-análise compilou os dados disponíveis de diversas observações realizadas até o ano de 2013. Este estudo concluiu que entre a população brasileira adulta a prevalência de episódios depressivos durante a vida é de 17%, e que essa prevalência é maior na população feminina (21,6%), dado que corrobora a prevalência na população mundial (Silva et al., 2014). Outro estudo, baseado no censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), concluiu que a prevalência absoluta (pessoas afetadas naquele momento) de depressão no Brasil é de cerca de 4% (4,8% na região Sul), o que se traduz em aproximadamente 8 milhões de pessoas afetadas (Munhoz et al., 2016).

A depressão pode ser caracterizada pela presença de humor deprimido, perda de interesse ou prazer, diminuição de ânimo, sentimento de culpa ou baixa autoestima, distúrbios de sono ou apetite, e baixa capacidade de concentração (WHO, 2012). Estas alterações podem tornar-se crônicas ou recorrentes e resultar em prejuízos significativos, sendo que os transtornos depressivos já são considerados a principal causa de incapacitação durante a vida (Ferrari et al., 2013). Na sua forma mais severa a depressão pode levar ao suicídio. Mundialmente, cerca de 1 milhão de casos resultam em suicídio todos os anos, o que se traduz em 3000 óbitos por suicídio todos os dias (WHO, 2012).

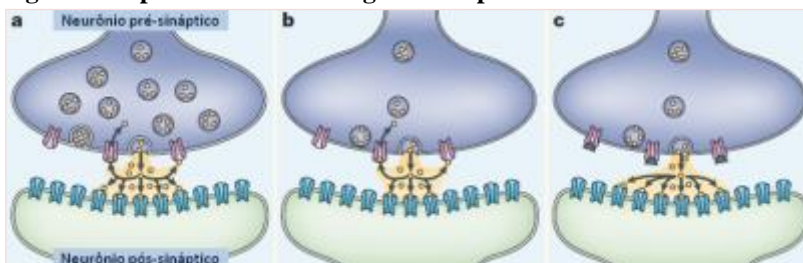
Na ausência de marcadores específicos, o diagnóstico da depressão é baseado na observação clínica dos sintomas, com base nos seguintes critérios estabelecidos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V): i) humor deprimido; ii) diminuição marcante no interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades (anedonia); iii) aumento ou diminuição de peso ou apetite; iv) insônia ou hipersônia; v) agitação ou retardo psicomotor; vi) fadiga ou falta de energia; vii) sentimentos de culpa ou desvalia excessivos; viii) diminuição na capacidade de concentração; ix) pensamentos recorrentes de morte ou ideação suicida. Um episódio depressivo é caracterizado

pela constatação de no mínimo cinco entre os nove sintomas citados e exige a presença de pelo menos um dos dois primeiros (humor deprimido ou anedonia) presentes na maior parte do tempo, com uma duração mínima de duas semanas. A severidade da doença é julgada como leve, moderada ou grave com base no grau de prejuízo ocupacional e social (Associação Americana de Psiquiatria, 2013).

A depressão possui uma importante carga hereditária, cerca de 40-50% dos casos estão associados a um componente genético, enquanto os casos remanescentes (50-60%) parecem ser causados por trauma na infância, estresse emocional e doença precedente (Berton e Nestler, 2006). Com base em evidências clínicas e experimentais, algumas hipóteses sugerem mecanismos envolvidos na fisiopatologia deste transtorno. Em 1965 Schildkraut postulou que a depressão estaria associada a uma redução nos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos no cérebro (Figura 1). Esta ideia foi reforçada alguns anos depois por observações clínicas de que pacientes usando reserpina (originalmente empregado com anti-hipertensivo) desenvolviam sintomas de depressão, isto porque este composto depleta monoaminas não apenas periféricamente, mas também no sistema nervoso central (SNC) (Berton e Nestler, 2006; Heninger et al., 1996). Outro aspecto que reforça esta hipótese é a atividade antidepressiva de compostos que aumentam a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica inibindo sua recaptção, como por exemplo, os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) como a fluoxetina, ou por inibição da sua degradação, por exemplo, os inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO), como a tranilcipromina (Berton e Nestler, 2006; Heninger et al., 1996).

Apesar de aumentar a disponibilidade de monoaminas de maneira imediata, os antidepressivos produzem seus efeitos benéficos sobre o humor somente semanas após o início do tratamento (Berton e Nestler, 2006). Atualmente está claro que o aumento agudo nos níveis de monoaminas induzido por antidepressivos resulta em alterações secundárias a logo prazo que envolvem a modulação transcricional e traducional de fatores determinantes na plasticidade neuronal (Altar, 1999; Duman et al., 2000, 2001; Nestler et al., 2002a; Pittenger e Duman, 2008).

Figura 1. Hipótese monoaminérgica da depressão



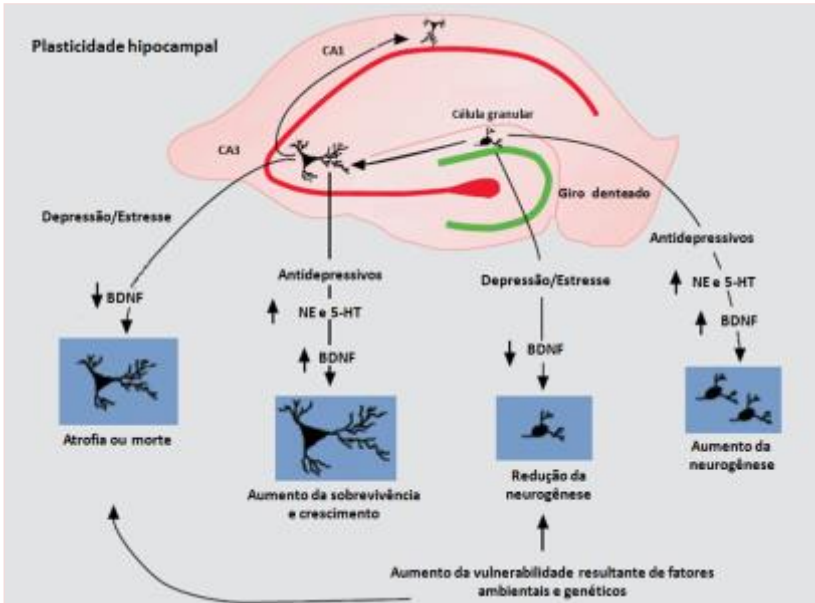
(a) No cérebro de indivíduos saudáveis, os neurotransmissores monoaminérgicos (dopamina, noradrenalina e serotonina - amarelo) são liberados e se ligam nos receptores localizados em neurônios pós-sinápticos. (b) Pacientes depressivos apresentam redução nos níveis sinápticos de monoaminas. (c) O bloqueio dos sítios de recaptação ou inibição da monoamina oxidase pelo tratamento com antidepressivos aumenta as concentrações e biodisponibilidade de monoaminas na fenda sináptica, os quais ativam seus receptores pós-sinápticos, sendo o humor restabelecido. Adaptado de Castren (2005).

Durante muitos anos acreditou-se que o cérebro não sofria alterações significativas depois de finalizado seu processo de desenvolvimento. Entretanto, atualmente existem evidências consistentes de que o cérebro é na verdade, capaz de continuar ajustando e remodelando sua estrutura durante toda a vida. O conjunto de fatores que resulta na sua resposta e adaptação a uma variedade de estímulos internos e externos é conhecido como neuroplasticidade e engloba diferentes processos: formação dendrítica, remodelagem sináptica, desenvolvimento axonal, extensão neurítica, sinaptogênese e neurogênese (Cotman e Nieto-Sampedro, 1984; Kempermann et al., 2002; Lamprecht e LeDoux, 2004; Zilles, 1992).

Diversos estudos têm demonstrado que alterações na neuroplasticidade em regiões cerebrais como o hipocampo podem influenciar na predisposição e na recuperação dos sintomas da depressão (Duman, 2002; Duman e Monteggia, 2006). A hipótese neurotrófica da depressão postula que a falta de fatores tróficos que promovam a neuroplasticidade está relacionada ao mecanismo implicado na gênese da depressão. Por outro lado, o reestabelecimento do suporte trófico, que resulta na melhora da neuroplasticidade (Figura 2), vem sendo associado à melhora dos sintomas após o tratamento. Esta necessidade de restabelecimento dos níveis de fatores neurotróficos seria uma das possíveis explicações para a janela terapêutica observada após o tratamento com antidepressivos clássicos (Duman, 2002; Duman e

Monteggia, 2006). Por exemplo, vários estudos utilizando roedores mostraram que o efeito antidepressivo da fluoxetina é dependente da modulação da neurogênese (David et al., 2009; Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003).

Figura 2. Hipótese neurotrófica da depressão



Alterações estruturais na plasticidade hipocampal em resposta ao estresse e depressão: atrofia e remodelagem de neurônios piramidais em CA3, com redução do número e comprimento dos dendritos apicais, e diminuição da neurogênese de células granulares no giro denteado. Este efeito em ambas as regiões hipocâmpais pode ser mediado por uma redução na expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro, BDNF. Os antidepressivos aumentam os níveis de serotonina (5-HT) e noradrenalina (NE), modulando vias de sinalização intracelular implicadas na regulação da expressão de BDNF, o que resulta no aumento da arborização dendrítica em CA3 e da neurogênese no giro denteado. Adaptado de Duman (2004a).

1.2. Neurogênese

A neurogênese adulta, ou seja, posterior ao período embrionário e pós-natal, é um importante contribuinte para a neuroplasticidade ao longo da vida. A primeira evidência acerca da neurogênese no cérebro adulto, em roedores, apresentada por Joseph Altman e Gopal Das nos anos 60 (Altman e Das, 1965) foi desacreditada pela comunidade científica. Pouco mais de uma década depois, Fernando Nottebohm e Michael Kaplan também foram fortemente criticados ao demonstrarem evidências de neurogênese em roedores e aves adultos, respectivamente (Kaplan e Hinds, 1977; Nottebohm, 1989). Somente nos anos 90 este conceito foi reavaliado com as diversas publicações de Elizabeth Gould, Fred Gage e Peter Eriksson, entre outros pesquisadores, que impulsionaram uma explosão na pesquisa da existência, função e implicações da neurogênese adulta em mamíferos (Eriksson et al., 1998; Gage, 2002; Gould et al., 1999a). A partir de então inúmeros estudos vem explorando diversos temas relacionados à neurogênese incluindo o entendimento de suas bases moleculares, envolvimento no aprendizado e memória, estratégias de estímulo (como enriquecimento ambiental, exercício físico), seu papel em doenças neurodegenerativas, e na recuperação de danos induzidos por traumas e doenças cerebrovasculares (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999a; Zhao et al., 2008).

Diferentemente do período embrionário, onde a neurogênese ocorre amplamente resultando no estabelecimento das diferentes camadas corticais cerebrais, a neurogênese na idade adulta resulta na adição de células a camadas pré-existentes. No cérebro adulto a neurogênese está restrita a duas regiões: zona subgranular (SGZ) do giro denteado (GD) hipocampal (Figura 3) e a zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais (os neurônios originados na SVZ migram rostralmente e são incorporados ao bulbo olfatório) (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009). Dentre estes nichos, a neurogênese hipocampal atrai mais atenção, devido o seu envolvimento em funções cognitivas complexas, particularmente, a memória e comportamentos afetivos. A neurogênese hipocampal resulta em novas células granulares excitatórias no GD, cujos axônios formam o trato de fibras musgosas que ligam o GD à região CA3 (Kempermann et al., 2015).

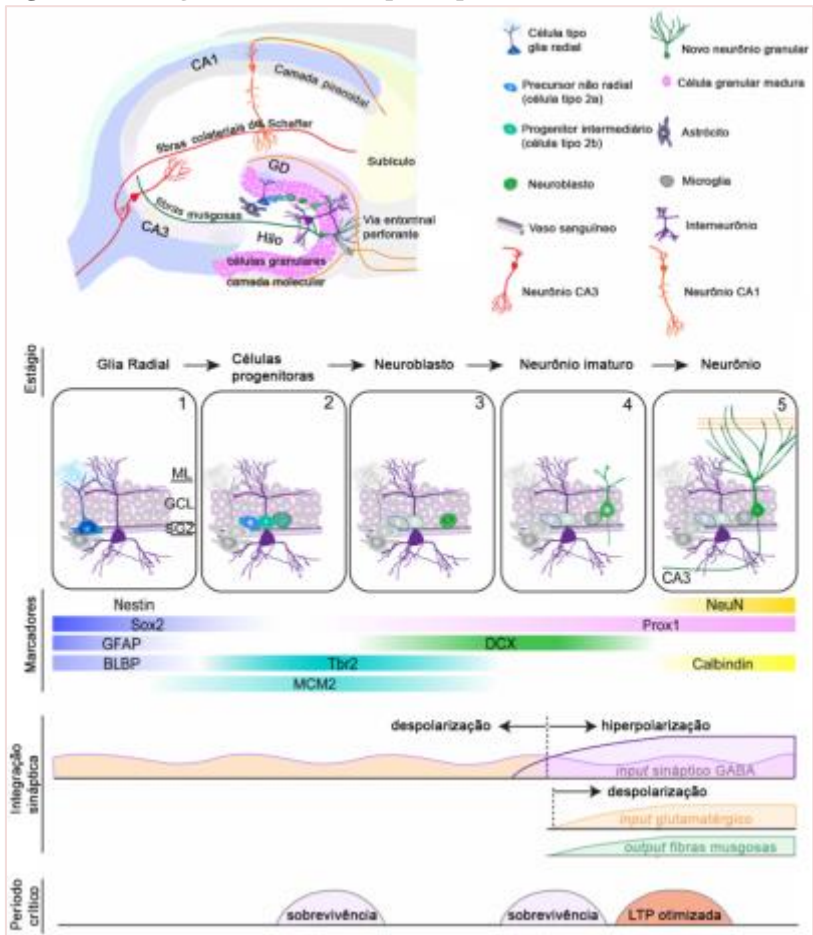
Os novos neurônios se originam especificamente de uma população de células precursoras do tipo glia radial (células tipo 1). As células do tipo 1 possuem propriedades astrocíticas (GFAP+), expressam marcadores de células tronco (nestina+) e se dividem

raramente (Palmer et al., 1997; Seri et al., 2001). Seu corpo celular localiza-se na SGZ enquanto seus processos adentram a camada molecular (Figura 3). Estas células dão origem a progenitores intermediários (células tipo 2a), primeiramente com fenótipo glial (GFAP+; proteína glial fibrilar ácida) e depois neuronal (tipo 2b; NeuroD1; Fator de diferenciação neurogênica, e Prox1+; *prospero homeobox 1*). Apesar das células do tipo 1 responderem a estímulos externos, aumentando sua proliferação celular (Hüttmann et al., 2003), a maior parcela da expansão clonal depende das células do tipo 2 (Kronenberg et al., 2003).

Passando por um estágio transitório de neuroblasto (tipo 3, DCX+; doublecortina), quando as novas células encerram seu ciclo celular já estão definidas quanto à linhagem (NeuN+; antígeno nuclear neuronal). A partir daí, iniciam a fase de maturação, durante a qual projetam seus dendritos para a camada molecular e seus axônios para a região CA3. Após um período de algumas semanas, nas quais ocorre intensa plasticidade sináptica, estas células se tornam indistinguíveis das células granulares pré-existentes.

As fases iniciais servem como um meio de expansão de células que poderão vir a se diferenciar em neurônios. Logo após a saída do ciclo celular, a grande maioria das novas células é eliminada, e a fase pós mitótica subsequente, para as células remanescentes, é considerada o período de aperfeiçoamento. Neste momento ocorre o estabelecimento de conexões sinápticas funcionais, crescimento axonal e dendrítico, e sinaptogênese. Estima-se que este processo completo de neurogênese leva cerca de 7 semanas (Kempermann et al., 2015). Estudos sugerem que estímulos que afetam a fase de expansão celular (principalmente células tipo 2) tendem a ser mais inespecíficos (ativação sináptica em convulsões, exercício físico), enquanto que estímulos mais específicos que refletem em funções dependentes do hipocampo (ambiente enriquecido, tarefas de aprendizado) parecem regular o número de células que sobreviverão na fase pós mitótica (Döbrössy et al., 2003; Gould et al., 1999b).

Figura 3. Neurogênese adulta no hipocampo



A neurogênese na SGZ do GD ocorre em 5 estágios: Estágio 1. Ativação das células tronco quiescentes (tipo 1-azul) cujos corpos celulares estão localizadas na SGZ e possuem processos radiais que se projetam através da GCL até a ML e hilo. Estágio 2. Proliferação das células precursoras não radiais (tipo 2a) (azul claro) e células amplificadoras (tipo 2b). Estágio 3: geração de neuroblastos que já expressam o marcador neuronal DCX (verde). Estágio 4. Migração: Neurônios imaturos (verde) migram uma curta distância até a camada de células granulares. Estágio 5. Direcionamento axonal e dendrítico: Neurônios imaturos projetam seus prolongamentos axonais ao longo da via das fibras musgosas para a camada de células piramidais em CA3. Integração sináptica: Novos neurônios recebem informação do córtex entorrinal e transmitem para CA3 e hilo. BLBP:

proteína ligadora de lipídeo do cérebro; CA: *cornus ammon*; SGZ: zona subgranular; DCX: doublecortina; GABA: ácido gama-butírico; GCL: camada de células granulares; GD: giro denteado; GFAP: proteína glial fibrilar ácida; LTP: potenciação de longa duração; MCM2: proteína de manutenção do minicromossoma; ML: camada molecular; NeuN: antígeno nuclear neuronal; Prox1: *prospero homeobox 1*; Sox2: região Y determinante do sexo-box 2; Tbr2: *t-box brain 2*. Adaptado de Ming e Song (2011).

Com o envelhecimento, a taxa de neurogênese hipocampal diminui consideravelmente, e sua contribuição quantitativa no número total de células granulares no adulto não está clara, podendo ser de fato mais qualitativa (Kempermann et al., 2002). O hipocampo é fundamental para a formação de memórias episódica e espacial (Squire, 1992). Neste sentido, acredita-se que o GD contribua com a aquisição destas memórias atuando como um separador de padrões (Leutgeb et al., 2007), isto é, formando distintas representações para estímulos semelhantes no tempo e espaço, porém não idênticos (Marr, 1971). Graças a esse padrão de separação, podemos lembrar onde estacionamos o carro hoje de manhã, em oposição onde paramos ontem ou na semana passada, por exemplo.

Em modelos experimentais utilizando roedores, a indução de lesão hipocampal pela administração de neurotoxinas diretamente no GD causa prejuízos na memória dependente deste padrão de separação (Gilbert et al., 1998, 2001; Hunsaker e Kesner, 2008). Ainda que o mecanismo envolvido não esteja totalmente elucidado, sabe-se que a neurogênese adulta tem um importante papel para o desempenho da separação de padrões no GD (Aimone et al., 2009; Clelland et al., 2009). Nesse sentido, uma estratégia amplamente utilizada para avaliar a função da neurogênese adulta é o estudo das consequências da ablação da neurogênese sobre processos relacionados à memória. Shors e colaboradores (2001) demonstraram que a redução na neurogênese hipocampal em ratos, por meio de uma neurotoxina dirigida às células proliferativas, prejudicou a aquisição de memórias associativas dependentes do hipocampo, mas não daquelas não dependentes desta estrutura. Por outro lado, roedores submetidos a tarefas de aprendizado dependentes do hipocampo apresentaram aumento na proliferação celular no GD, enquanto que a exposição a tarefas não dependentes do hipocampo não alteraram o número de novas células (Gould et al., 1999b). Além disso, reforçando esta associação entre proliferação celular no GD e memória, Nilsson e colaboradores (1999) observaram que o enriquecimento ambiental, além de induzir neurogênese,

(Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 2000) melhora a memória espacial em ratos.

Dada a importância do hipocampo em processos relacionados a aprendizado, memória e modulação de humor, o papel da neurogênese hipocampal vem sendo amplamente estudado neste contexto, assim como sua implicação na fisiopatologia e tratamento de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (Kempermann et al., 2008). A diminuição na neurogênese pode não explicar os transtornos psiquiátricos como um todo, mas corrobora os aspectos dependentes do hipocampo observados nestas patologias, o que contribui para que transtornos como a depressão, demência e esquizofrenia sejam também consideradas “transtornos de neurodesenvolvimento” (Kempermann et al., 2008).

A hipótese de que a diminuição na neurogênese adulta pode estar implicada na etiologia da depressão surgiu primeiramente a partir de evidências de uma drástica diminuição da neurogênese hipocampal em animais submetidos ao estresse - hipótese neurotrófica (Figura 2) (Duman et al., 2001; Gould et al., 1997; McEwen, 1999). A exposição de roedores, por exemplo, a protocolos de estresse agudo ou crônico é amplamente utilizada como ferramenta experimental de indução de comportamento tipo-depressivo, uma vez que a ocorrência de eventos estressores durante a vida é reconhecida como o principal fator de risco para episódios depressivos (Kendler et al., 1999; Nestler et al., 2002b; Paykel, 2001; Yadid et al., 2000). No entanto, a evidência pré-clínica de maior impacto sugerindo um papel da neurogênese hipocampal na depressão surgiu da observação de que a maioria dos antidepressivos e intervenções ambientais que possuem efeito tipo-antidepressivo também estimula a neurogênese (Duman, 2004b; Malberg et al., 2000; van Praag et al., 1999b). Neste sentido, sugere-se que a latência para o efeito terapêutico de antidepressivos pode estar relacionada, dentre outros fatores, com o período necessário para a maturação de novos neurônios no GD (Kempermann e Kronenberg, 2003). Entretanto, alguns autores sugerem que uma supressão da neurogênese, isoladamente, não é capaz de resultar em fenótipo tipo-depressivo, mas sim, que esta redução quando somada a uma predisposição genética ou outros fatores ambientais resulta em alterações fisiopatológicas (Sahay e Hen, 2008). Além disso, segundo os autores, alterações no desenvolvimento do GD no início do período pós-natal, teriam maiores consequências em modelos animais de depressão do que alterações hipocampais já na idade adulta.

Inicialmente, a teoria proposta por Jacobs e colaboradores (2002; 2000) tinha como protagonista a serotonina, dado o seu importante papel tanto na depressão quanto na neurogênese hipocampal. Ao mesmo tempo, complementando esta teoria, Ronald Duman aponta a via de sinalização AMPc (Adenosina monofosfato cíclico) - CREB (proteína de ligação responsiva ao AMPc)-BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) como principal mediador da reestruturação dendrítica, redução na sobrevivência neuronal e diminuição na neurogênese hipocampal na depressão (Figura 2) (D'Sa e Duman, 2002). Esta hipótese impulsionou o entendimento do possível papel da neurogênese adulta no contexto de diversas outras alterações bioquímicas e moleculares observadas na depressão (Pittenger e Duman, 2008). Outro aspecto que reforça esta hipótese é baseado em alterações morfológicas e morfométricas no hipocampo de pacientes depressivos (Sheline, 2000), que demonstram não apenas redução no volume, mas também anormalidades na substância cinzenta. Até certo estágio, as alterações parecem ser reversíveis nas fases de remissão da doença (Frodl et al., 2002). Em sua hipótese, Jacobs e colaboradores, também sugerem que um prejuízo na neurogênese adulta seria responsável por tais mudanças estruturais transitórias (Jacobs, 2002). As oscilações bioquímicas associadas à depressão, como hipercortisolemia e alterações no sistema serotoninérgico, não apenas influenciam a morfologia hipocampal, mas também afetam a neurogênese adulta. Por conter uma alta densidade de receptores de glicocorticóides, o hipocampo é consideravelmente impactado por elevados níveis de cortisol. O estudo experimental de McEwen e colaboradores (1999) demonstrou que os glicocorticóides contribuem para a atrofia de neurônios hipocampais e redução da neurogênese. Por outro lado, em camundongos a indução da neurogênese por estímulos ambientais, leva ao aumento do volume do giro denteado (Kempermann et al., 1997).

1.3. Hipercolesterolemia

1.3.1. Hipótese vascular da depressão

As hipóteses da etiologia da depressão relacionadas aos neurotransmissores monoaminérgicos e à neuroplasticidade, apesar de contribuírem significativamente para o estabelecimento de terapias, não respondem a uma série de questões, tais como “quais os mecanismos envolvidos nas alterações monoaminérgicas e de neuroplasticidade?”. Neste sentido, outras teorias vêm sendo propostas, dentre elas a

participação de mecanismos inflamatórios e do estresse nitroxidativo tem recebido grande atenção (Leonard e Maes, 2012; Maes et al., 2009, 2012). Por outro lado, outras hipóteses associam a fisiopatologia da depressão com alterações em sistemas específicos, como o sistema vascular. Com intuito de correlacionar a doença cerebrovascular à depressão, Alexopoulos e colaboradores postularam a “hipótese vascular da depressão” (Alexopoulos, 2006; Alexopoulos et al., 1997b, 1997a). Os autores relacionam o quadro depressivo associado à doença cerebrovascular, aos fatores de risco para doença vascular e a lesões cerebrovasculares difusas ou multifocais em exames de neuroimagem cerebral (Krishnan et al., 1997; Sneed e Culang-Reinlieb, 2011). Ainda que existam indícios isquêmicos nestas lesões, o mecanismo envolvido na isquemia é desconhecido apesar de apontar para danos às células endoteliais e aterosclerose (Sneed e Culang-Reinlieb, 2011). Assim, alterações estruturais no cérebro, devido à aterosclerose, representam uma variável importante neste cenário (Krishnan e McDonald, 1995). Alguns estudos demonstraram que a aterosclerose grave está associada à alta prevalência de transtornos depressivos, havendo forte correlação com coronariopatia grave e calcificação da aorta (Tiemeier et al., 2004). Além disso, enfermidades cardiovasculares estão positivamente correlacionadas com a ocorrência de depressão (Van der Kooy et al., 2007; Vural et al., 2009). No Brasil, por exemplo, enquanto a prevalência de depressão na população em geral é de cerca de 4%, esse percentual é expressivamente maior em pessoas com hipertensão arterial (7,5%), diabetes mellitus (8,6%) e doenças cardiovasculares (14%) (Munhoz et al., 2016).

Nesse contexto acredita-se que a depressão relacionada a alterações cerebrovasculares, tem como fatores de risco a hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus dentre outros fatores de risco cardiovascular (Göthe et al., 2012; Krishnan e McDonald, 1995). A hipercolesterolemia pode ser caracterizada por colesterol plasmático igual ou maior que 200 mg/dL. Especificamente no Brasil, um estudo conduzido em nove capitais e envolvendo 8.045 indivíduos com idade média de 35 ± 10 anos, mostrou que 38% dos homens e 42% das mulheres possuem níveis de colesterol total acima de 200 mg/dL (Sposito et al., 2007).

Particularmente, diversos estudos clínicos sugerem uma associação entre a hipercolesterolemia e transtornos psiquiátricos, como ansiedade e depressão (Davison e Kaplan, 2012; Nakao et al., 2001a; Tyrovolas et al., 2009; Vural et al., 2007), e com maior risco de suicídio (Tanskanen et al., 2000; Fiedorowicz e Coryell, 2007). Apesar de níveis

diminuídos de colesterol também serem reportados em indivíduos depressivos (Persons e Fiedorowicz, 2016), a hipercolesterolemia, por sua vez, também parece estar relacionada com insucesso da terapia antidepressiva: com demora na remissão dos sintomas ou resiliência ao tratamento (Iosifescu et al., 2005; Isingrini et al., 2010; Papakostas et al., 2003; Sonawalla et al., 2002). Em contrapartida, níveis moderados de colesterol, parecem proteger a saúde mental (Soeda et al., 2006).

Nesta linha de evidências experimentais, o estudo de Strekalova e colaboradores (2015) demonstrou que camundongos C57BL/6J expostos durante 3 semanas a uma dieta com teor aumentado de colesterol (0,2% de colesterol) apresentaram comportamento tipo-depressivo nos testes de suspensão pela cauda e da natação forçada. Por outro lado, quando a dieta com alto teor de colesterol foi descontinuada e a dieta padrão foi reintroduzida por 10 dias adicionais, este efeito comportamental desapareceu. Apesar da ingestão da dieta rica em colesterol, os autores não evidenciaram aumento nos níveis plasmáticos de colesterol total nestes animais. Outro trabalho que corrobora as observações clínicas, é o estudo de Isingrini e colaboradores (2010), que observou que camundongos submetidos ao estresse crônico não responderam ao tratamento antidepressivo quando mantidos em uma dieta rica em gordura (0,15% de colesterol). Todavia, os autores não descreveram alterações no perfil lipídico dos animais submetidos a ingesta desta dieta.

Muito além das complicações cardiovasculares, irregularidades no metabolismo do colesterol são apontadas, em estudos clínicos e pré-clínicos, como fatores importantes no desenvolvimento de distúrbios do SNC. Alterações no nível de colesterol circulante (hipercolesterolemia) ou intracelular (como o que ocorre nos portadores de doença de Niemann-Pick tipo C), incluindo mutações nos genes codificantes das proteínas envolvidas no seu metabolismo (síntese, absorção e catabolismo), parecem causar perturbações na homeostase do SNC.

1.3.2. Metabolismo do colesterol e o receptor de LDL

Importante componente de membranas nos organismos eucariotas, o colesterol auxilia na formação de uma barreira semipermeável entre compartimentos celulares e na manutenção da fluidez das membranas celulares (Mukherjee et al., 1998; Yeagle, 1985). Também modula a função de proteínas de membrana e participa de diversos processos de transporte e sinalização transmembrana, como por exemplo, a sinalização acoplada a proteína G. Os metabólitos do

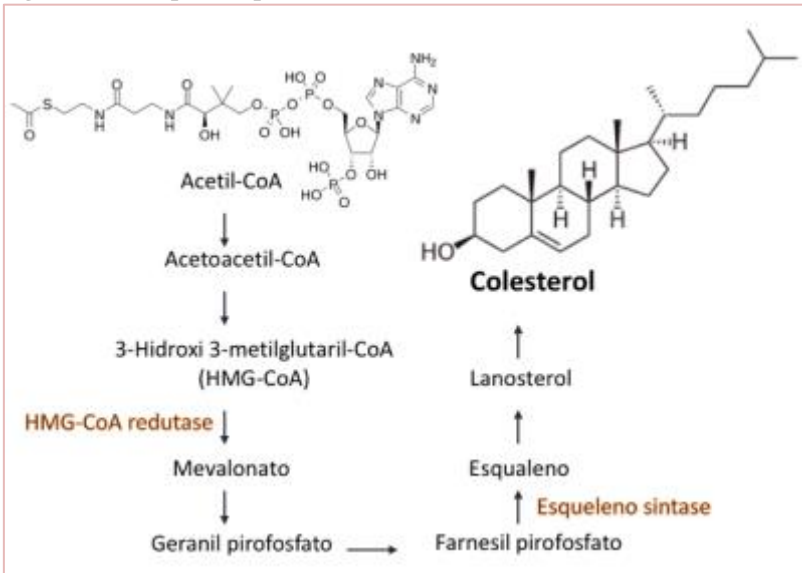
colesterol, como os esteróides e a vitamina D, tem papel biológico importante como moléculas sinalizadoras celulares, regulando por exemplo, a proliferação celular (Fernández et al., 2005), já os ácidos biliares atuam na solubilização de lipídeos (Ikonen, 2008).

Diferente da maioria dos fosfolipídeos, o colesterol é um lípideo constituído de 4 anéis de carbono ligados, que constituem o núcleo ciclo-pentano-peridro-fenantreno. As células obtêm colesterol da circulação através de lipoproteínas plasmáticas, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) ou o sintetizam endogenamente a partir de acetilcoenzima A (acetil-CoA) (Figura 4) (Bloch, 1992). Quase todos os tecidos estão envolvidos na síntese de colesterol, embora fígado, intestino, córtex adrenal e tecidos reprodutivos sejam os maiores responsáveis pela síntese endógena (Bloch, 1965, 1987).

Os níveis de colesterol intracelular são finamente regulados retrogradamente a nível transcricional e pós-transcricional (Brown e Goldstein, 1997; Goldstein e Brown, 1990). Quando a disponibilidade de colesterol intracelular está diminuída a proteína ligadora do elemento regulatório de esteróis (SREBP) coordena a transcrição de hidróxi 3-metilglutarilcoenzima A redutase (HMGCR), enzima que coordena a etapa limitante da biossíntese de colesterol, e de quase todas as enzimas subsequentes na via do mevalonato, no retículo endoplasmático (RE) (Sakakura et al., 2001). Do RE, o colesterol é secretado para outros compartimentos celulares como o complexo de Golgi ou é associado a proteínas transportadoras como SCP-2, StAR e caveolina. Ainda no RE, o excesso de colesterol também pode ser esterificado pela acetilcoenzima A colesterol acetiltransferase (ACAT) e armazenado em gotículas lipídicas.

As SREBPs também ativam a transcrição do receptor de LDL (LDLr), responsável pela maior parte da captação de colesterol pelas células, processo que será descrito no decorrer desta sessão. O receptor hepático X (LXR), de hormônios nucleares também contribui para a homeostase do colesterol. Os LXRs são importantes reguladores transcricionais de genes envolvidos na resposta ao colesterol em excesso, ativando a transcrição de genes responsáveis pelo transporte reverso de colesterol, como os transportadores ABC, transportadores de cassete de ligação de ATP (ABCA1 e ABCG1) (Beaven e Tontonoz, 2006; Tontonoz e Mangelsdorf, 2003).

Figura 4. Principais etapas da biossíntese do colesterol



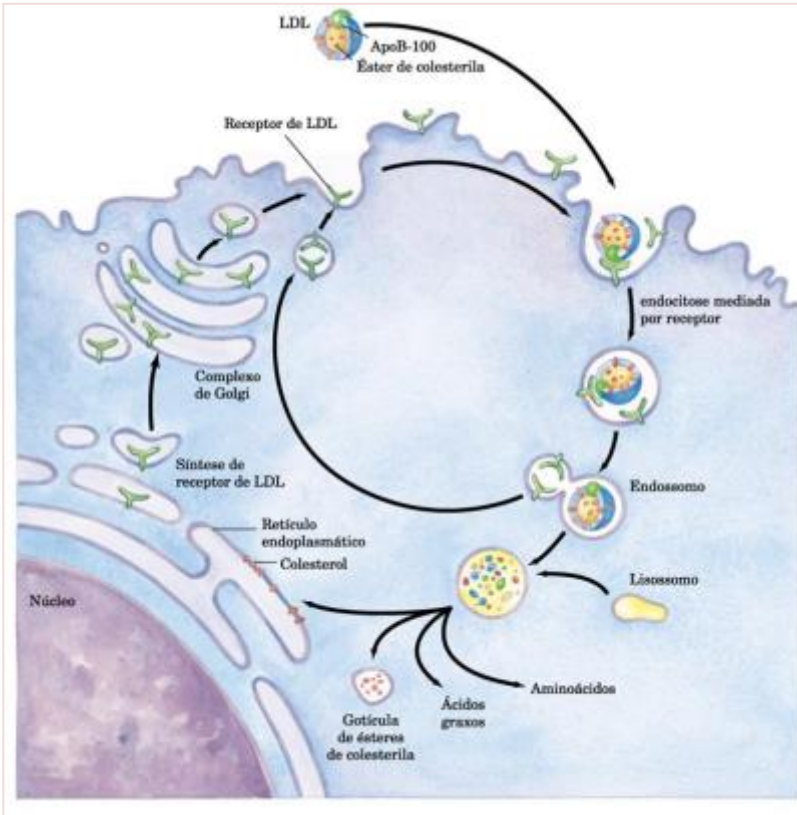
A síntese do colesterol inicia-se com a formação de um composto intermediário de seis carbonos, o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), a partir da condensação de três moléculas de acetil-CoA. Em seguida, o HMG-CoA é reduzido a mevalonato, à custa de duas moléculas de NADPH pela ação da enzima HMG-CoA redutase - uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático - na reação considerada a etapa limitante da síntese do colesterol e o principal ponto de regulação desta via. O mevalonato sofre duas fosforilações e uma descarboxilação originando a unidade isoprenóide, o isopentenil-pirofosfato que irá participar da formação dos dois intermediários seguintes geranyl e farnesil pirofosfatos. A síntese do esqualeno resulta de reações de isomerização, condensação, redução por NADPH e eliminação de pirofosfato promovidas pela enzima esqualeno sintase. Na etapa final a ciclização do esqualeno forma os quatro anéis do núcleo esteróide, e um número de subsequentes reações levam à produção do colesterol (Nelson et al., 2009; Sharpe e Brown, 2013).

O colesterol obtido da dieta é inicialmente transportado do intestino ao fígado, para ser então, distribuído aos demais órgãos e tecidos. Para o transporte no meio hidrofílico dos fluidos carreadores corpóreos, linfa e sangue, os enterócitos e hepatócitos empacotam o colesterol e ésteres de colesterol em lipoproteínas de vários tamanhos e composições, que são subsequentemente modificadas na circulação.

Após absorvido pelos enterócitos no intestino delgado, o colesterol é empacotado, juntamente com triglicerídeos, a quilomícrons. Uma parte destes triglicerídeos é hidrolisada na circulação e novas apoproteínas, como a apoE, são adicionadas gerando os chamados quilomícrons remanescentes, que são captados pelos hepatócitos. Os hepatócitos por sua vez, secretam lipídeos nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs) que são processadas, na circulação, em LDL, a principal lipoproteína de distribuição de colesterol às células. Quando tecidos extra-hepáticos possuem colesterol em excesso este pode ser captado pela lipoproteína de alta densidade (HDL) originalmente sintetizada no fígado. A HDL retorna o colesterol ao fígado no processo chamado de transporte reverso de colesterol. Do fígado, o colesterol é secretado na bile (como colesterol ou metabolizado em ácidos biliares), que é liberada no intestino delgado, onde pode ocorrer reabsorção deste colesterol e sais biliares (ciclo enterohepático) ou excreção através das fezes (Ikonen, 2008). O cérebro está isolado deste sistema, mas no SNC, as lipoproteínas também são a forma de transporte de lipídeos entre os diferentes tipos celulares, este mecanismo será discutido adiante.

As partículas da lipoproteína LDL, carreadora de colesterol, são captadas pelas células por meio de endocitose mediada por receptor, transportadas aos endossomos primários, depois aos endossomos tardios e finalmente, aos lisossomos onde os ésteres de colesterol são hidrolisados a colesterol livre pela lipase ácida (AL) (Maxfield e Wüstner, 2002; Soccio e Breslow, 2004). Os receptores são então reciclados de volta a membrana plasmática (Figura 5) (Brown e Goldstein, 1976, 1986). Os receptores da família do LDLr compreendem cerca de 10 diferentes receptores, sendo o LDLr o mais conhecido e estudado. Como outros membros importantes desta família ainda podemos citar a proteína 1 relacionada ao LDLr (LRP1), o receptor de VLDL, a megalina, e o receptor de apoE 2 (apoER2) (Hobbs et al., 1990; Hussain et al., 1999).

Figura 5. Captação de colesterol pelo receptor da lipoproteína de baixa densidade

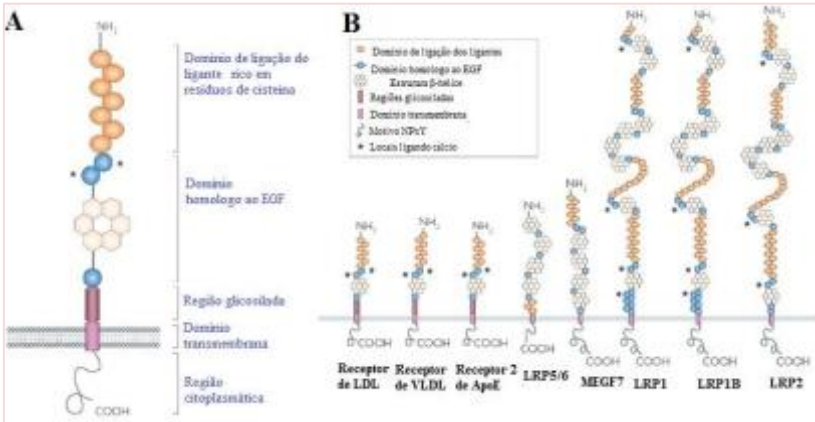


Os receptores de LDL são sintetizados e empacotados em vesículas no complexo de Golgi, as quais são transportadas para a membrana plasmática. Na membrana plasmática, os receptores funcionais estão agrupados dentro de vesículas revestidas contendo a proteína clatrina. As LDL plasmáticas vão interagir com o receptor de LDL por meio da ligação da apolipoproteína B100 (apoB100) presente na lipoproteína com o domínio de ligação do ligante do receptor de LDL, ocorrendo então a endocitose da vesícula revestida e internalização do complexo receptor-lipoproteína. Em seguida nos endossomos ocorre a diminuição do pH levando a dissociação deste complexo. Os receptores intactos são transportados de volta para a membrana plasmática para a reutilização, enquanto as lipoproteínas nos lisossomos são degradadas em colesterol e aminoácidos. Adaptado de Nelson e Cox, (2009).

O estudo da via celular de ligação, internalização e degradação da LDL levou à caracterização do LDLr, em 1974, pelos pesquisadores Goldstein e Brown. O LDLr é uma glicoproteína transmembrana composta por 839 resíduos de aminoácidos e medeia a captação celular de lipoproteínas contendo apolipoproteína B (apoB) e apolipoproteína E (apoE). Os estudos sobre endocitose mediada por receptor de Goldstein e Brown revelaram algumas das características funcionais do LDLr que são aplicáveis a maioria dos receptores desta família. Estas incluem o agrupamento destes receptores em vesículas revestidas pela proteína clatrina, o que é mediado por proteínas adaptadoras; o desacoplamento de ligantes induzido por modificações de pH; e a reciclagem dos receptores e seu retorno à superfície celular após a liberação do ligante (Brown e Goldstein, 1979).

O entendimento da estrutura do LDLr revelou regiões funcionais importantes deste receptor (Russell et al., 1989). Por exemplo, os ligantes se associam a uma região N-terminal de sete repetições de resíduos de cisteína, cada uma contendo 40 resíduos de aminoácidos (Figura 6). O receptor de LDL também contém uma sequência de 411 resíduos de aminoácidos similar ao precursor do fator de crescimento epidérmico (EGF), que compreende 6 segmentos do tetrapeptídeo YWTD, importante para o desacoplamento dos ligantes no pH ácido dos endossomos (Davis et al., 1987). A terceira região é rica em resíduos serina e treonina associados por meio de ligações O-glicosídicas, no entanto não possui finalidade funcional para o receptor. Na sequência há um domínio de ancoramento transmembrana de resíduos hidrofóbicos. A última região funcional é a porção C-terminal citoplasmática de 50 resíduos de aminoácidos, reconhecida pelas proteínas acopladoras que associam o receptor às vesículas revestidas por clatrina (Brown e Goldstein, 1986; Hobbs et al., 1990; Hussain et al., 1999).

Figura 6. Família dos receptores de lipoproteína de baixa densidade

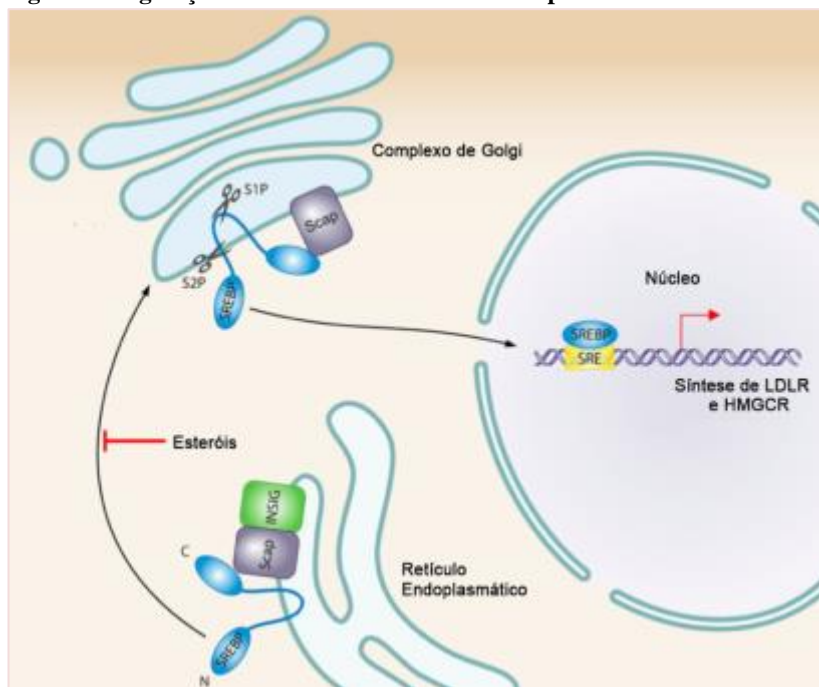


Esta família de receptores é composta de proteínas transmembrana que compartilham domínios estruturais que são característicos do receptor de LDL (A) (protótipo da família) e (B) membros da família de receptores de LDL Adaptado de Wasan et al. (2008).

A expressão do LDLr é regulada principalmente pelos níveis de colesterol, mas também por moléculas não esteróides, como fatores de crescimento e hormônios, cujo mecanismo ainda precisa ser melhor elucidado (Makar et al., 1998; Pak et al., 1996; Rudling et al., 1996). O LDLr tem um único promotor constituído de 200 pares de base. A região promotora contém 2 domínios TATA *box* e 2 sítios de ligação Sp1. Estes sítios são responsáveis pela transcrição gênica basal do LDLr. Entre estes dois sítios Sp1 encontra-se o elemento regulador de esterol 1 (SRE1). Na ausência de esteróis, as SREBPs ligam-se ao SRE1 e atuam sinergicamente ao Sp1 para levar à indução máxima da transcrição do gene do LDLr. Os esteróis regulam indiretamente a ligação das SREBPs ao SRE1. Os fatores de transcrição SREBPs usualmente estão associados à membrana do RE (Figura 7). Na ausência de esteróis, estes fatores tornam-se susceptíveis a clivagem proteolítica que resulta na liberação de um polipeptídeo N-terminal. Este peptídeo, ao chegar no núcleo se liga ao sítio SRE1 e promove a transcrição de genes que contém esta sequência, como o LDLr. Ao contrário, quando as células apresentam níveis regulares de esteróis, a proteólise dos SREBPs está inibida e a transcrição do gene LDLr mantida ao nível basal (Brown e Goldstein, 1986, 1997; Hobbs et al., 1990; Hussain et

al., 1999). Já o gene promotor do LRP1 não possui os sítios de ligação TATA *box* e SRE1 e portanto, não é regulado por SREBPs e flutuações nos níveis de esteróis (Gaëta et al., 1994; Kütt et al., 1989).

Figura 7. Regulação do metabolismo do colesterol por SREBP



Quando da diminuição dos níveis de colesterol, por exemplo, o complexo SREBP é transportado ao complexo de Golgi onde ocorre proteólise de sua subunidade N-terminal. Após clivado o SREBP adentra o núcleo e ativa a expressão de proteínas de síntese e captação de esteróis e lipídeos. HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase. INSIG-1: gene induzido pela insulina; LDLR: receptor de LDL; SCAP: proteína de ativação da clivagem do SREBP; SRE: elemento regulatório de esterol; SREBP: proteínas de ligação do elemento de regulação do esterol; S1P e S2P: proteases dos sítios 1 e 2; Adaptado de Bien e Espenshade (2010).

1.3.3. Hipercolesterolemia familiar

Atualmente, estima-se que em todo o mundo existam cerca de 20 milhões de indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF), sendo

esta reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como um problema de saúde global (Santos e Maranhao, 2014; Watts et al., 2014). A HF é a manifestação fenotípica de uma anormalidade no metabolismo de lipoproteínas, que pode ser causada por uma variedade de alterações genéticas. Após a importante descoberta de Brown e Goldstein (1974) de que mutações no gene que codifica o LDLr são a principal causa da HF, mais de 1500 mutações neste gene foram caracterizadas (Goldstein e Brown, 1974; Leigh et al., 2008), sendo que estas representam mais de 80% dos casos de HF monogênica (Soufi et al., 2009). Devido sua alta prevalência, a HF é uma das mais importantes doenças de caráter hereditário. A sua variação heterozigótica é consideravelmente mais comum, com prevalência de cerca 1 em 200 pessoas (Santos e Maranhao, 2014), o que eleva a estimativa para 34 milhões de indivíduos afetados no mundo todo (Nordestgaard et al., 2013). Os portadores de HF homozigotos, são afetados de maneira mais severa e classificados como receptores negativos (atividade residual do receptor < 2%) ou receptores defectivos (2-25% de atividade residual). Obviamente, os indivíduos LDLr-negativos têm maiores níveis de LDL plasmática e pior prognóstico clínico (Nordestgaard et al., 2013).

As mutações no LDLr resultam em diminuição da endocitose da lipoproteína, o que torna característico na HF níveis elevados de colesterol presente na LDL plasmática. Os diversos polimorfismos no gene do receptor de LDL podem afetar tanto o domínio do receptor alvo do principal ligante - a apoB-100 presente na LDL-, quanto outros domínios da lipoproteína, e, até mesmo, a recirculação dos receptores que, normalmente, são reciclados após a endocitose. Uma das proteínas reguladoras do processo de endocitose do receptor é a pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9). A PCSK9 se liga ao LDLr, que fica então marcado para degradação lisossomal, diminuindo a captação de colesterol da circulação (McKenney, 2015). Mutações resultantes em ganho de função da PCSK9 resultam em maior degradação do LDLr e ocorrem em 1% dos casos de HF. Já anormalidades no gene da apolipoproteína B, representam cerca de 5% dos casos (Nordestgaard et al., 2013; Soutar e Naoumova, 2007). A proteína adaptadora do receptor (LDLRAP), que auxilia no acoramento do LDLr na membrana e na sua internalização clatrina-dependente, também pode apresentar mutações que resultam em HF (Soutar e Naoumova, 2007).

Os portadores de HF podem ser homozigotos para a mesma mutação em ambos alelos do mesmo gene ou podem ser heterozigotos compostos com diferentes mutações em cada alelo do mesmo gene. Raramente, os indivíduos podem ser heterozigotos com mutações em

dois genes diferentes que afetam a função do LDLr. A severidade do fenótipo depende da qualidade da função residual do receptor. A variabilidade no fenótipo é possível devido a variantes genéticas ou influências epigenéticas (Cuchel et al., 2014), podendo ainda, ser modulada por hábitos de vida (Nordestgaard et al., 2013).

O diagnóstico da HF pode seguir diversos critérios, considerando histórico familiar, história clínica, exame físico, níveis de LDL e análise genética. Recentemente, a Associação Americana de Cardiologia propôs um protocolo para o diagnóstico de HF sem teste genético. Esta diretriz classifica a HF heterozigótica pela presença de histórico familiar para doença cardiovascular prematura, ou colesterol elevado, e $LDL \geq 190$ mg/dL em adultos ou ≥ 160 mg/dL em crianças, confirmados em duas ocasiões; $LDL > 400$ é considerada diagnóstico da forma homozigótica (Gidding et al., 2015), no entanto para a confirmação desta forma recomenda-se a verificação de outros critérios (Cuchel et al., 2014).

Clinicamente a elevação nos níveis de LDL resulta na presença de xantomas de tendões, xantelasma e aumentada deposição de colesterol nos vasos arteriais, levando ao desenvolvimento acelerado de aterosclerose associada à alta incidência de eventos cardiovasculares, particularmente a doença arterial coronariana (Brown e Goldstein, 1976; Soufi et al., 2002). Quando não tratados, homens com HF heterozigótica desenvolvem doença cardiovascular antes dos 55 anos de idade e mulheres por volta dos 60. Indivíduos com a forma homozigótica tipicamente desenvolvem comprometimento cardiovascular muito precocemente, e se não tratados, podem morrer antes dos 20 anos de idade (Nordestgaard et al., 2013). Por este motivo recomenda-se que uma terapia hipolipemiante seja iniciada o quanto antes. Em pacientes com a forma heterozigótica, o objetivo inicial é a redução de 50% da LDL plasmática (Watts et al., 2014).

Certamente a descoberta das estatinas (Endo et al., 1977), representa um marco no tratamento HF e prevenção das suas complicações cardiovasculares. As estatinas, inibidores da enzima limitante da velocidade da biossíntese do colesterol (HMG-CoA redutase), diminuem consideravelmente a síntese de colesterol intracelular, assim estimulando a síntese de LDLr e levando a redução dos níveis de LDL plasmática em média de 35 a 55%, dependendo da estatina (Hajar, 2011). Um estudo de meta-análise sumarizando resultados de 174.000 participantes em 27 estudos, concluiu que as

estatinas reduzem o risco de eventos cardiovasculares em 21% para cada 40 mg/dL de LDL reduzidas (Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration et al., 2015). Como consequência direta da redução de eventos cardiovasculares houve um significativo aumento na expectativa de vida dos portadores de HF, o que possibilitou o acompanhamento e a identificação do perfil de aparecimento de outras patologias evidenciadas em fases mais avançadas do envelhecimento.

1.3.4. Hipercolesterolemia familiar e o sistema nervoso central

Além de ser reconhecida como um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da doença arterial coronariana, a hipercolesterolemia vem sendo associada a um maior risco de deterioração cognitiva e posterior desenvolvimento de doença de Alzheimer (Kivipelto et al., 2001; Sparks et al., 2005). Particularmente, nos portadores de HF parece existir uma maior incidência de prejuízos cognitivos, com relação à hipercolesterolemia esporádica, o que indica que a disfunção do LDLr e a hipercolesterolemia precoce, que acomete os indivíduos com HF, podem ter um papel determinante como fator de risco para o comprometimento do SNC (Zambón et al., 2010).

Esta correlação entre distúrbios no metabolismo do colesterol, particularmente na HF, e alterações sobre o SNC também é reportada em modelos experimentais. Em especial, os camundongos nocautes para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}), desenvolvidos por Ishibashi e colaboradores (1993), reconhecidos como um modelo de hipercolesterolemia familiar humana (Zadelaar et al., 2007), vem sendo utilizados também como ferramenta para o estudo de alterações no SNC. Dentre as anormalidades descritas no SNC dos camundongos LDLr^{-/-} podemos destacar ativação de células da glia, aumento na produção de citocinas e mediadores inflamatórios; e também prejuízo do sistema antioxidante e na atividade de complexos da cadeia respiratória mitocondrial (de Oliveira et al., 2011; Thirumangalakudi et al., 2008). Recentemente nosso grupo também demonstrou que a astrogliose nestes animais está associada a um aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) no hipocampo (de Oliveira et al., 2014). Estudos prévios do nosso grupo e de outros também demonstraram que os camundongos LDLr^{-/-} apresentam prejuízos na memória espacial e de

trabalho (Moreira et al., 2012; Mulder et al., 2004, 2007; de Oliveira et al., 2014). Como o colesterol é requerido para a homeostase celular, acredita-se que a diminuição na captação neuronal de colesterol, devido à mutações no LDLr, pode resultar em consequências deletérias tanto estruturais quanto funcionais no SNC.

O colesterol é o principal componente lipídico das membranas celulares do SNC, o qual concentra 23-25% do conteúdo de colesterol corporal. Enquanto em tecidos periféricos o colesterol representa cerca de 2-3 mg/g de tecido, no cérebro chega a compor 15-30 mg/g de tecido (Dietschy, 2009). Neurônios precisam sintetizar uma grande quantidade de superfície de membranas para seus axônios, dendritos e sinapses, incluindo espinhas dendríticas pós-sinápticas e vesículas pré-sinápticas, para as quais uma grande quantidade de colesterol é necessária (Goritz et al., 2005; Pfenninger, 2009). Outra função primordial do colesterol no SNC, é seu papel na bainha de mielina, onde funciona como uma camada de isolamento, que possibilita uma maior velocidade na condução de estímulos nervosos (Dietschy, 2009).

O colesterol também modula funções celulares através da atividade biológica de seus produtos oxidados, os oxisteróis (Björkhem, 2006; Janowski et al., 1999). A demanda de colesterol para a fisiologia neuronal é grande tanto no período de desenvolvimento, período de mielinização, quanto no adulto. Em adultos a depleção de colesterol neuronal prejudica, principalmente, a exocitose de vesículas sinápticas, a atividade neuronal e a neurotransmissão, o que leva a degeneração de espinhas dendríticas e sinapses (Linetti et al., 2010; Liu et al., 2010).

É notório que, apesar da clareza quanto ao metabolismo periférico do colesterol, quando falamos de células neuronais ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas. Fora do SNC, o colesterol pode ser sintetizado *de novo*, processo que envolve mais de 30 enzimas, ou obtido da dieta (associado a lipoproteínas). No entanto, a BHE impede a captação, pelo SNC, de lipoproteínas da circulação. Desta forma, a maior parte do colesterol cerebral (~95%) resulta da síntese *in situ*, principalmente por células gliais (Dietschy, 2009). Outra característica adaptativa a esta grande demanda, é a eficiente reciclagem do colesterol cerebral, que apresenta uma meia-vida entre 1 e 5 anos, comparada a algumas horas na periferia (Andersson et al., 1990). Além da diferença na meia-vida, as lipoproteínas carreadoras deste colesterol também diferem entre os compartimentos periférico e cerebral. No

fluido cérebro espinal os tipos predominantes de lipoproteínas são a apoE ($0, 3 \pm 0, 2$ mg/dL) e apoA-I ($0, 37 \pm 0,08$ mg/dL) e em menores quantidades apoJ, apoD, apoA-II e apoA-IV (Borghini et al., 1995; Koch et al., 2001). É possível que algumas apolipoproteínas sintetizadas periféricamente adentrem o SNC, como a apoA-I e II que acredita-se sejam capazes de adentrar pelo plexo coróide (Pitas et al., 1987).

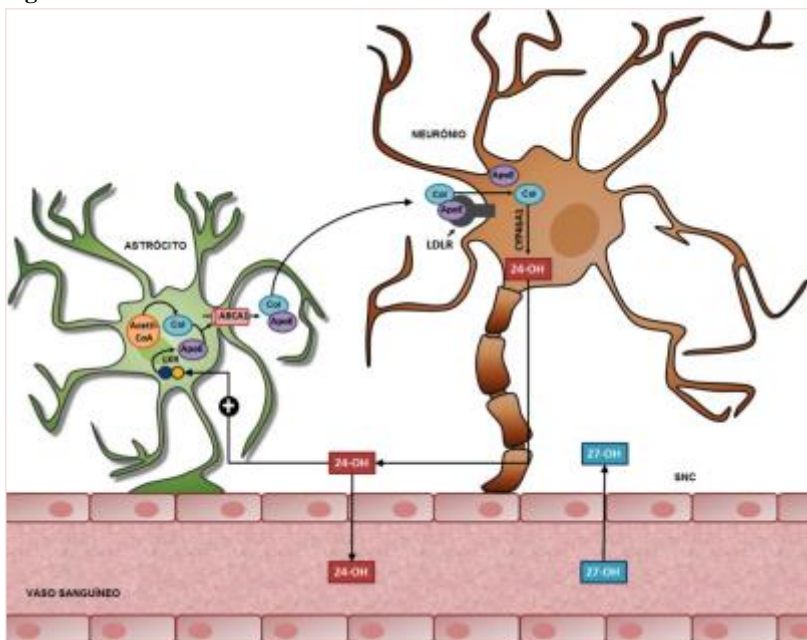
Com relação à síntese de colesterol, a hipótese mais aceita é de que os neurônios no período embrionário são autossuficientes em colesterol, e posteriormente passam a depender do suporte astrocitário (Pfrieger, 2003). Uma das razões evolutivas para esta transição provavelmente é o alto custo energético da síntese de esteróis e envolvimento de diversas enzimas distribuídas em diferentes compartimentos celulares. Assim, os neurônios, que possuem uma alta demanda energética pela geração de potenciais de ação nos axônios, não gastam energia com a síntese e o transporte de colesterol produzido no corpo celular, apenas o captam de outras fontes (de Chaves et al., 1997; Vance et al., 1994).

Após a síntese do colesterol, os astrócitos o secretam juntamente com a apoE e fosfolípidos, formando lipoproteínas similares às HDL plasmáticas (Boyles et al., 1985). A secreção ocorre por meio de transportadores ABC (tais como ABCA1, ABCG1 e ABCG4). Por sua vez, a captação dessas lipoproteínas pelos neurônios se dá por meio de endocitose mediada por receptores da LDL, principalmente o LDLr e o LRP1. Assumindo que o passo seguinte é conservado como em outras células, as lipoproteínas contendo colesterol endocitadas são hidrolisadas nos lisossomos neuronais permitindo a liberação intracelular de colesterol livre (Petrov et al., 2016).

O excesso de colesterol é eliminado por meio da formação e excreção para a circulação de oxisteróis, o que desempenha um papel importante na regulação da homeostase do colesterol no SNC. Nas células neuronais, o colesterol é convertido principalmente pela ação da enzima colesterol 24-hidroxilase (CYP46A1) em 24-hidroxicolesterol (24-OH), metabólito capaz de transpassar a BHE, que então será metabolizado no fígado. Além de ser um metabólito para eliminação do colesterol, o 24-OH também pode ser captado pelos astrócitos, onde atua como uma molécula sinalizadora que regula a homeostase do colesterol por meio da ativação dos receptores LXR. Estes receptores nucleares aumentam a expressão de elementos relacionados com a liberação de

colesterol da célula, incluindo os transportadores ABC e a apoE. O 27-hidroxicolesterol (27-OH) é outro oxisterol produzido no cérebro em quantidades menores que o 24-OH. No entanto, a maioria do 27-OH é produzido periféricamente e flui da circulação para o cérebro (Figura 8) (Petrov et al., 2016).

Figura 8. Metabolismo do colesterol no sistema nervoso central



O transporte do colesterol (col) dos astrócitos para os neurônios requer a ligação do colesterol à apolipoproteína E (apoE) em secreção pelos transportadores ABC. Os complexos col-apoE são captados pelos neurônios via endocitose mediada pelo LDLr e LRP-1. O excesso de colesterol é convertido em 24-hidroxicolesterol (24-OH) pela CYP46A1. O 27-hidroxicolesterol (27-OH) é produzido no SNC e na periferia (majoritariamente) e também atravessa a BHE. Adaptado de Moreira et al. (2015).

Diferentemente do cérebro adulto, que depende do fornecimento astroglial de colesterol, os neurônios em desenvolvimento são autossuficientes. De fato, a diferenciação neuronal, em particular a sinaptogênese, é um processo dependente de colesterol (Pfrieger, 2003). Apesar de a demanda de colesterol pelas células precursoras neuronais (CPN) durante o desenvolvimento do SNC de mamíferos ainda ser um tanto incompreendida, sabe-se que a interferência na biossíntese de

colesterol leva a defeitos no desenvolvimento que antecedem a neurogênese (Tozawa et al., 2001). Recentemente um estudo demonstrou que a supressão específica da atividade da enzima de síntese do colesterol, esqualeno sintase, nas CPNs da zona subventricular de camundongos embrionários, causa apoptose nos neurônios derivados destes progenitores o que ocasiona microcefalia e letalidade ao nascimento (Saito et al., 2009).

Contudo, exceto o desenvolvimento embrionário, somente alguns poucos estudos demonstram o papel de receptores da família do LDLr em nichos neurogênicos adultos. Por exemplo, o LRP2 é expresso na parede lateral dos ventrículos laterais, onde parte das CPNs está localizada. A supressão deste receptor, através de manipulação genética, em camundongos, resulta na diminuição da capacidade proliferativa das CPNs (Gajera et al., 2010). Já o LRP1 é necessário para a diferenciação de CPNs da zona subventricular em oligodendrócitos (Hennen et al., 2013). Além disso, Gan e colaboradores, demonstraram que as CPNs secretam apoE; e que o receptor de apoE medeia a ativação de vias de sobrevivência nestas células e sua diferenciação em oligodendrócitos (Gan et al., 2011).

Com exceção a essas poucas publicações, apenas os estudos de Mulder e colaboradores exploraram o papel do colesterol e do LDLr, assim como o efeito de condições como a HF, sobre a neurogênese adulta. Os autores evidenciaram em camundongos LDLr^{-/-} adultos uma diminuição na proliferação celular no GD hipocampal e reduzida densidade sináptica nas regiões GD e CA1 (Mulder et al., 2004, 2007). Por outro lado, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que o exercício físico voluntário (reconhecido por induzir proliferação celular hipocampal e plasticidade sináptica) durante 4 semanas, foi capaz de reverter os déficits de memória espacial dos camundongos LDLr^{-/-} de 6 meses de idade (Moreira et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A hipercolesterolemia é reconhecida como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Contudo, os estudos nas últimas décadas também demonstram um papel da hipercolesterolemia no desenvolvimento de neuropatologias. Inicialmente, diversos estudos clínicos apresentaram evidências da relação entre a hipercolesterolemia familiar e o desenvolvimento de prejuízos cognitivos, bem como da doença de Alzheimer esporádica, o que motivou a investigação do SNC em camundongos LDLr^{-/-}, e propiciou a caracterização deste modelo experimental de hipercolesterolemia familiar em testes comportamentais de memória e aprendizado.

Evidências clínicas também sugerem uma comorbidade entre a hipercolesterolemia e transtornos de humor, como a depressão. No entanto, existem poucos estudos pré-clínicos explorando esta associação. Contudo vale destacar que alterações relacionadas à plasticidade sináptica e proliferação celular hipocampal foram observadas previamente em camundongos LDLr^{-/-}. Considerando a estreita relação entre redução da neuroplasticidade e depressão, nós hipotizamos que existe uma associação entre a hipercolesterolemia e a depressão, que pode estar relacionada, dentre outros aspectos, a alterações na neurogênese hipocampal adulta.

Para verificar experimentalmente esta hipótese, parâmetros comportamentais e neuroquímicos relacionados à depressão e à neurogênese hipocampal adulta foram avaliados em camundongos LDLr^{-/-}. Adicionalmente, sabendo que a causa primária da hipercolesterolemia familiar é uma mutação no gene que codifica para o receptor de LDL e que, conseqüentemente, os indivíduos são expostos a níveis elevados de colesterol plasmático desde o nascimento, o efeito da toxicidade do colesterol e da deleção do receptor de LDL sobre a neurogênese adulta foi discriminado experimentalmente *in vitro*. Os resultados deste estudo irão contribuir para a compreensão dos efeitos da hipercolesterolemia sobre o SNC, particularmente sobre a neurogênese adulta, permitindo um maior entendimento da relação entre a hipercolesterolemia e doenças neuropsiquiátricas, como a depressão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar as alterações comportamentais, neuroquímicas e de neuroplasticidade que correlacionam a hipercolesterolemia à depressão, em modelos experimentais in vivo e in vitro.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento tipo-depressivo e o metabolismo dos neurotransmissores monoaminérgicos em camundongos LDLr^{-/-}, modelo experimental de hipercolesterolemia familiar;
- Avaliar a plasticidade hipocampal, refletida na neurogênese adulta e parâmetros comportamentais dependentes do hipocampo no modelo experimental de camundongos LDLr^{-/-} ;
- Caracterizar os principais aspectos relacionados à síntese e ao metabolismo do colesterol em células precursoras neuronais de camundongos C57BL/6 adultos;
- Estudar, in vitro, o efeito da toxicidade do colesterol e da deleção do receptor de LDL sobre a proliferação e diferenciação de células precursoras neuronais de camundongos C57BL/6 adultos.

4. CAPÍTULO I

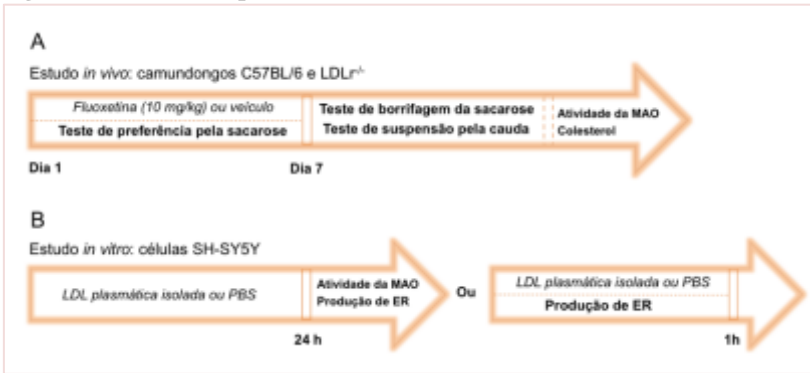
A hipercolesterolemia familiar está associada ao comportamento tipo-depressivo e alterações no metabolismo de monoaminas em camundongos?

Este capítulo apresenta os métodos e resultados relacionados ao primeiro objetivo específico desta tese e que compõem o artigo científico intitulado: “*Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr^{-/-} mouse experimental model*” publicado no periódico Behavioural Brain Research.

4.1. Materiais e métodos

4.1.1. Protocolo experimental 1

O objetivo do primeiro bloco experimental foi avaliar em camundongos modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana, se a ausência do LDLr, e consequente hipercolesterolemia, estão associadas a alterações comportamentais e bioquímicas, características de modelos animais de depressão. Para responder esta pergunta, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de 3 meses de idade machos e fêmeas foram submetidos a um tratamento repetido com o antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina, fluoxetina (10 mg/kg; v.o.) por 7 dias (período no qual foram paralelamente avaliados no paradigma de preferência pela sacarose). Após este período, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais de suspensão pela cauda, do campo aberto e de borrifagem de sacarose. Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e cetamina 100 mg/kg, i.p.) e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis de colesterol utilizando reagentes comerciais. Em seguida o córtex e o hipocampo foram dissecados para a determinação da atividade das diferentes isoformas da monoamina oxidase (MAO-A e MAO-B). Paralelamente, investigamos se a exposição por 24h à LDL humana isolada (100 e 300µg/mL) modifica a atividade da MAO e a produção de espécies reativas em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano. O esquema do primeiro bloco experimental está representado na Figura 9.

Figura 9. Protocolo experimental 1

Investigação da associação entre hipercolesterolemia familiar e comportamento tipo-depressivo e alterações no sistema monoaminérgico. ER: espécies reativas; LDL: lipoproteína de baixa densidade; MAO: monoamina oxidase.

4.1.2. *Estudo in vivo*

4.1.2.1. *Animais*

Camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}), machos e fêmeas, foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, cujos progenitores foram adquiridos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA). Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm), com condição controlada de temperatura (23 ± 1°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 7 horas às 19 horas), e com livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC), Protocolo PP00948, que segue normas internacionais de utilização de animais para pesquisa científica.

O camundongo LDLr^{-/-} é um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar humana desenvolvido e descrito por Ishibashi e colaboradores (1993). Podemos citar algumas vantagens da utilização deste modelo animal: (i) semelhança à condição humana de hipercolesterolemia familiar, causada por mutações no gene para o receptor de LDL; (ii) o perfil de lipoproteínas plasmáticas, que se

assemelha ao de humanos, estando a maior parte do colesterol confinado na fração LDL; e (iii) o grau de dislipidemia intermediário, desenvolvendo lesões menos avançadas do que outros modelos de hipercolesterolemia (Zadelaar et al., 2007).

4.1.2.2. Tratamento

A fluoxetina (Sigma, St Louis, MO, USA), foi dissolvida diariamente em água destilada e administrada uma vez ao dia, durante 7 dias, por via oral (v.o., gavagem) na dosagem de 10 mg/kg (Moretti et al., 2012), em um volume constante de 10 mL/kg de peso corporal. O grupo controle recebeu água destilada.

4.1.2.3. Testes comportamentais

4.1.2.3.1. Teste de preferência pela sacarose

A anedonia é um sintoma clássico na depressão e envolve a diminuição da libido e falta de interesse por experiências prazerosas. O consumo de sacarose é mensurado como um indicativo de alterações no comportamento hedônico. Nas 48 h que precederam o início do teste os animais foram alojados individualmente, sendo que nas últimas 24 h foram privados de água e comida. Nos 7 dias subsequentes foram expostos ao paradigma da escolha entre uma garrafa de água e outra contendo uma solução de sacarose 1% (100 mL cada). Este procedimento foi adaptado do trabalho de Luo e colaboradores (2008), e o consumo total de sacarose foi calculado pela quantia da solução de sacarose consumida em relação ao volume total de líquido consumido ($[\text{consumo de sacarose}/\text{consumo total de líquido (sacarose + água)}] * 100$).

4.1.2.3.2. Teste de borrifagem da sacarose

Este teste foi realizado como descrito por Isingrini e colaboradores (2010), e consistiu em borrifar uma solução 10% de sacarose no dorso de cada animal posicionado individualmente em uma caixa de acrílico ($9 \times 7 \times 11$ cm). Devido à viscosidade e palatabilidade da solução de sacarose, logo após a borrifagem o animal inicia um comportamento de auto-limpeza. Após a aplicação da solução o tempo de latência para a auto-limpeza e o tempo total de auto-limpeza foram

mensurados durante 5 min como um índice de auto-cuidado e comportamento motivacional, considerado um paralelo aos sintomas de apatia na depressão. O aparato foi limpo com uma solução de etanol 10% entre cada sessão a fim de remover vestígios do animal anterior.

4.1.2.3.3. Teste de suspensão pela cauda (TSC)

Este teste é baseado nas observações de que animais submetidos a curtos e inescapáveis períodos de estresse sendo suspensos pela cauda, irão adotar uma postura imóvel (Steru et al., 1985). Portanto, os camundongos foram considerados imóveis quando houve ausência de movimento ou movimentação passiva. A duração total da imobilidade induzida pela suspensão pela cauda foi registrada por observador experiente durante o período total de 6 minutos, em que os camundongos estavam suspensos a 50 centímetros do chão, presos por uma fita adesiva a 1 centímetro da base de suas caudas (Brocardo et al., 2008).

4.1.2.3.4. Teste do campo aberto (TCA)

A fim de excluir a possibilidade de que uma alteração no tempo de imobilidade seja devido a algum efeito na função locomotora, os animais foram submetidos ao TCA durante 6 minutos, como descrito por Rodrigues e colaboradores (2002). Esse teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm, com a base dividida em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados com as quatro patas é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora. A base da caixa foi limpa com álcool 10% entre os testes.

4.1.2.4. Ensaio bioquímicos

4.1.2.4.1. Quantificação de colesterol plasmático

A quantificação do colesterol total no plasma dos camundongos foi realizada utilizando reagentes comerciais (Gold Analisa, Minas Gerais), seguindo as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.1.2.4.2. Ensaio de atividade da monoamina oxidase

A atividade das isoformas A e B da enzima monoamina oxidase (MAO) foram mensuradas em isolados mitocondriais obtidos a partir de do homogenato de córtex cerebral e hipocampo e em lisados de células SH-SY5Y (descrito no estudo *in vitro*). A determinação da atividade foi avaliada por método fluorimétrico de detecção da formação do composto fluorescente 4-hidroxiquinolina (4-HQ) a partir do substrato quinuramina, como descrito por Matsumoto e colaboradores (1985). O córtex cerebral e hipocampo foram homogeneizados (1:4 m/v) em tampão PBS 0,1 M (pH 7,4) contendo 0,32 M de sacarose. As células SH-SY5Y foram coletadas neste mesmo tampão. Na sequência as amostras foram centrifugadas a 900 x g durante 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante obtido foi centrifugado a 12500 x g por 15 minutos a 4 °C e o sedimento obtido foi gentilmente dissolvido em tampão sacarose. O ensaio foi realizado em duplicata técnica em volume final de 500 µL contendo 0,5 mg de proteína de amostra e incubado por 30 minutos a 37 °C. A atividade das isoformas MAO-A e B foram discriminadas farmacologicamente pela adição de 250 nM de selegilina (inibidor seletivo da MAO-B) ou 250 nM de clorgilina (inibidor seletivo da MAO-A) ao meio de reação. A reação (contendo os preparados mitocondriais e inibidores) foi pré-incubada a 37 °C por 5 minutos e a reação enzimática iniciada pela adição de 50 µL de kinuramina (90 µM para MAO-A e 60 µM para MAO-B). Os resultados foram expressos como nmol de 4-HQ/min/mg de proteína.

4.1.3. *Estudo in vitro*

4.1.3.1. **Materiais**

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, meio Eagle modificado por Dulbecco/Mistura nutriente F12 (DMEM/F12), antibiótico-antimicótico, soro bovino fetal (SBF) adquiridos de GIBCO (Grand Islanda NY, USA), diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA) e lipoproteína de baixa densidade isolada de plasma humano por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade, como descrito a seguir.

4.1.3.2. Preparo da LDL humana

A fração LDL foi purificada a partir de plasma humano proveniente do banco de sangue do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Os procedimentos experimentais para utilização de plasma humano e isolamento da LDL foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos desta Universidade (parecer 943/10, FR 363814). O isolamento da LDL foi realizado por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade, conforme descrito por Silva e colaboradores (1998). Ao plasma foi adicionado EDTA 1 mg/mL e sacarose 0,5% para evitar a agregação de LDL. O plasma- EDTA foi ajustado a uma densidade de 1,22 g/mL com KBr 0,326 g/mL, e em seguida foi adicionado NaCl 1,006 g/mL. A ultracentrifugação foi executada a 191.000 x g por 2 horas a 4 °C em ultracentrífuga Hitachi Himac CP80WX, rotor 40ST. Após este processo, a camada contendo LDL (porção superior) foi coletada e dialisada (25 x 16 mm) durante 16 horas a 4°C em PBS 148 mM (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 136mm, pH 7,4). O teor de proteína da LDL isolada foi determinado pelo método de Lowry (1951).

4.1.3.3. Cultivo celular e tratamento

As células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ) e mantidas em DMEM/F12 suplementado com 10% de SBF, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina, mantidas em estufa com 95% de umidade, a 37 °C em 5% de CO₂.

Para os tratamentos as células foram plaqueadas em frascos (1 x 10⁶ células) em DMEM/F12 suplementado com SBF 10% por 24 h. Após este período o meio foi substituído por DMEM/F12, sem SBF, contendo LDL (100 e 300 µg/mL) ou PBS (Hui et al., 2012; Moreira et al., 2014). Após 24 h de incubação, as células foram coletadas e a atividade da MAO avaliada como descrito previamente. Em outro experimento as células foram plaqueadas em placas de 24 poços (1x10⁵ células/poço), tratadas com LDL (100 e 300 µg/mL) ou PBS por 24 h, e

após, a produção de espécies reativas (ER) foi avaliada. Além disso, também foi realizado um ensaio cinético (1 h), que avaliou a produção de ER no decorrer do tempo de exposição à LDL (2×10^5 células/poço).

4.1.3.4. Determinação da geração de espécies reativas

A produção intracelular de espécies reativas foi detectada por meio do composto que permeia a membrana celular diacetato de 2'-7'-dihidroclorofluoresceína (DCFH-DA) (Colle et al., 2016). Uma vez no espaço intracelular, o DCFH-DA é hidrolisado por esterases e forma DCFH, que fica retido intracelularmente por não possuir capacidade de permear a membrana. O DCFH reage com ER intracelulares e forma o produto fluorescente DCF. No ensaio, as células foram incubadas com DCFH-DA (10 μ M) por 30 minutos antes (para o ensaio cinético) ou depois (para o tratamento de 24 h) da exposição à LDL. No ensaio cinético também foi utilizada a sonda dihidrorodamina (DHR). A intensidade de fluorescência foi mensurada usando fluorímetro leitor de placas (excitação 488 nm e emissão 520 nm).

4.1.3.5. Determinação de proteínas

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

4.1.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se uma análise de variância (ANOVA) de duas vias (linhagem, tratamento), seguida do teste de Duncan; ou teste *t* de Student e estão também descritas nas legendas das respectivas figuras. O nível de significância adotado para todos os experimentos foi $p \leq 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média + erro padrão da média (EPM). Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica® e as figuras representativas elaboradas no programa GraphPad Prism.

4.2. Resultados

Ao mesmo tempo que estudos clínicos demonstram evidências de uma associação entre a hipercolesterolemia e transtornos de humor, como a depressão, estudos pré-clínicos reportam um comprometimento no SNC de camundongos LDLr^{-/-}, modelo experimental de HF. Neste sentido, a primeira hipótese do presente estudo foi que camundongos LDLr^{-/-} apresetam fenótipo tipo-depressivo em testes comportamentais. O comportamento foi avaliado por meio dos testes preditivos de preferência pela sacarose, do teste de borrifagem da sacarose e do teste de suspensão pela cauda, em camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-} machos e fêmeas de 3 meses de idade.

Como demonstrado na Figura 10A e os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram um comportamento anedônico evidenciado pela menor preferência pelo consumo da solução de sacarose 1% e este comportamento foi revertido ao 7º dia pelo tratamento antidepressivo repetido. A análise por ANOVA de duas vias indicou efeito do genótipo [$F(1, 16) = 16,67, p \leq 0,001$] e interação entre genótipo e tratamento [$F(1, 16) = 4,52, p < 0,05$], enquanto não houve efeito do tratamento [$F(1, 16) = 0,73, p = 0,40$]. A análise *post hoc* de Duncan indica que a diminuição no consumo de sacarose pelos camundongos LDLr^{-/-} foi revertida pelo tratamento com fluoxetina somente no dia 7 (Figura 10B, $p < 0,05$). Adicionalmente, a fim de estimar o comportamento motivacional e de auto-cuidado, os camundongos selvagens e LDLr^{-/-} foram comparados no teste de borrifagem da sacarose. Com relação ao tempo para iniciar a auto-limpeza, a análise por ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento [$F(1,31) = 5,99, p < 0,05$]. A análise pelo *post hoc* evidenciou um aumento na latência para o início da auto-limpeza nos camundongos LDLr^{-/-} quando comparados aos C57BL/6 ($p < 0,05$, Figura 10C). Para o tempo total de auto-limpeza, a ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo do tratamento [$F(1, 31) = 6,41, p < 0,05$] e interação tratamento x genótipo [$F(1, 31) = 7,50, p < 0,05$]. As comparações na análise *post hoc* demonstraram uma diminuição no tempo total de auto-limpeza quando comparados camundongos LDLr^{-/-} e C57BL/6 ($p < 0,05$, Figura 10D). O tratamento com fluoxetina foi eficaz em reverter o aumento na latência para auto-limpeza ($p < 0,05$, Figura 10C) e também a diminuição no tempo total ($p \leq 0,01$, Figura 10D).

A Figura 10E ilustra que os camundongos LDLr^{-/-} apresentam um comportamento tipo-depressivo no TSC, evidenciado por uma diminuição no tempo de imobilidade em comparação aos camundongos

selvagens. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento [$F(1,31) = 23,96, p \leq 0,001$] e interação genótipo x tratamento [$F(1, 31) = 7,76, p \leq 0,01$]. A análise *post hoc* indicou que o aumento no tempo de imobilidade no grupo LDLr^{-/-} foi revertido pelo tratamento repetido com fluoxetina ($p \leq 0,001$, Figura 10E). Ainda, a imobilidade no TSC foi independente de efeitos sobre a locomoção dos animais, como demonstrado na ANOVA de duas vias não há diferenças significativas para genótipo [$F(1, 31) = 0,19, p = 0,66$], tratamento [$F(1, 31) = 0,11, p = 0,74$] ou interação entre ambos [$F(1, 31) = 0,082, p = 0,78$; Figura 10F].

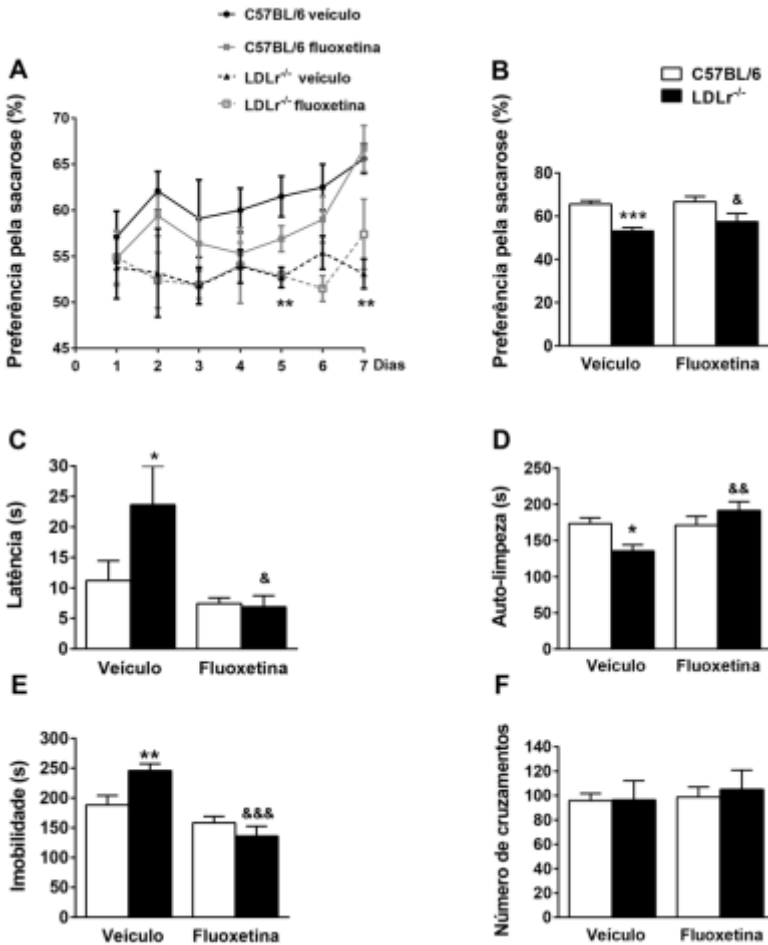
Os níveis de colesterol total dos camundongos C57BL/6 do tipo selvagens e LDLr^{-/-} estão apresentados na Tabela 1. Como esperado, os níveis plasmáticos de colesterol total foram significativamente maiores nos camundongos LDLr^{-/-} quando comparados com os camundongos selvagens. De maneira inesperada, o tratamento com fluoxetina reduziu os níveis de colesterol total nos camundongos LDLr^{-/-}. É importante mencionar, que apesar desta diminuição os níveis de colesterol total nos camundongos LDLr^{-/-} não voltaram aos padrões normais (i.e., não são comparáveis aos níveis apresentados pelos camundongos selvagens).

Tabela 1. Níveis plasmáticos de colesterol total em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}.

| Genótipo | Tratamento | Colesterol total (mg/dL) |
|---------------------|------------|--------------------------|
| C57BL/6 | Veículo | 123 ± 2,87 |
| LDLr ^{-/-} | Veículo | 234 ± 5,99 * |
| C57BL/6 | Fluoxetina | 117 ± 1,96 |
| LDLr ^{-/-} | Fluoxetina | 198 ± 5,76 # |

Os dados estão representados como média + S.E.M. (erro padrão da média) (n = 6 animais por grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. A ANOVA indicou efeito da linhagem [$F(1, 20) = 451,48, p \leq 0,001$]; do tratamento [$F(1, 20) = 22,37, p \leq 0,001$] e interação entre linhagem e tratamento [$F(1, 20) = 11,13, p \leq 0,01$]. * $p \leq 0,001$ vs. camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com água, # $p \leq 0,001$ vs. camundongos LDLr^{-/-} tratados com água.

Figura 10. Comportamento tipo-depressivo e efeito da administração da fluoxetina em camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-}

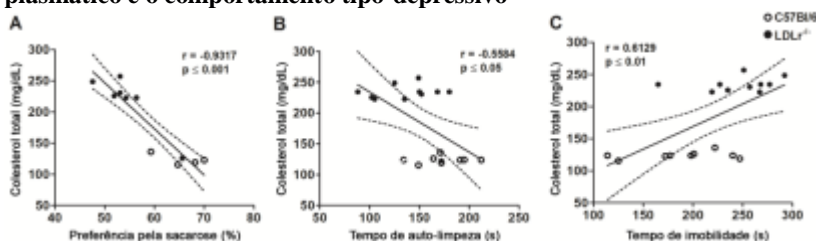


Teste de preferência pela sacarose (A e B), de borrifagem da sacarose (C e D), suspensão pela cauda (E) e campo aberto (F). Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (7-10 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ vs. camundongos C57BL/6 do tipo selvagem tratados com água, & $p < 0,05$, && $p \leq 0,01$ e &&& $p \leq 0,001$ vs. camundongos LDLr^{-/-} tratados com água.

A fim de verificar se os níveis de colesterol plasmáticos se relacionam com o comportamento tipo-depressivo, foi realizada a

análise de correlação entre estes parâmetros. De fato, os níveis de colesterol total no plasma foram negativamente correlacionados com a preferência pela sacarose ($r = -0,9317$, $p \leq 0,001$) e com o tempo total de auto-limpeza no teste de borrifagem da sacarose ($r = -0,5584$, $p \leq 0,05$) e positivamente correlacionados com o tempo de imobilidade no TSC ($r = 0,6129$, $p \leq 0,01$), sugerindo uma associação entre a hipercolesterolemia e o comportamento tipo-depressivo nos camundongos LDLr^{-/-} (Figura 11).

Figura 11. Coeficiente de correlação de Pearson entre os níveis de colesterol plasmático e o comportamento tipo-depressivo

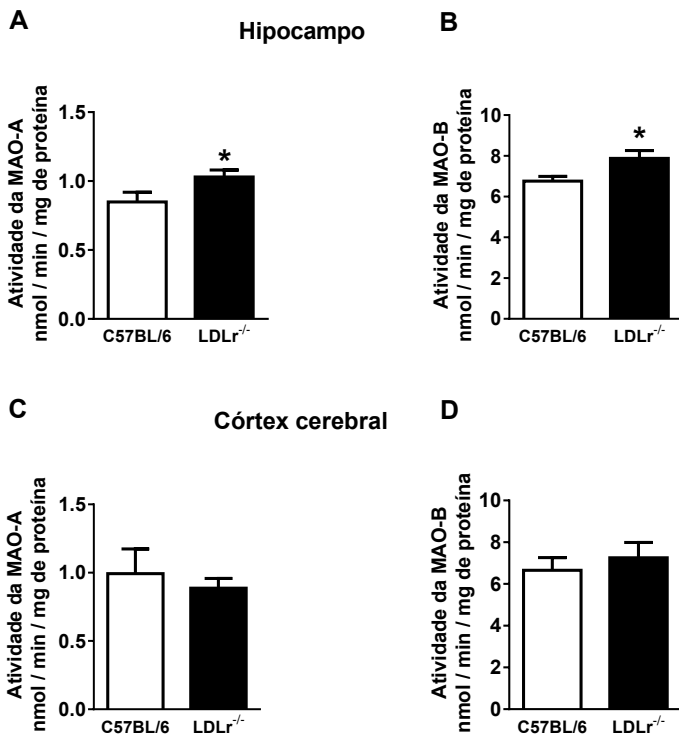


Teste de preferência pela sacarose (A) borrifagem da sacarose (B) e de suspensão pela cauda (C).

Tendo em vista a estreita relação entre a disfunção do sistema monoaminérgico e os transtornos de humor (Heninger et al., 1996), a atividade da MAO, enzima que hidrolisa e inativa os neurotransmissores monoaminérgicos regulando suas concentrações nas sinapses (Youdim e Bakhle, 2006) foi avaliada no córtex cerebral e no hipocampo dos camundongos LDLr^{-/-} e selvagens. Os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram um aumento significativo nas atividades de ambas isoformas, MAO-A e MAO-B hipocampais, em comparação aos camundongos selvagens ($t = 2,08$, $p < 0,05$ e $t = 2,50$, $p < 0,05$, respectivamente; Figura 12A e B). Por outro lado, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais na atividade de ambas as isoformas da MAO no córtex cerebral (Figura 12C e D, $p > 0,05$).

Alguns trabalhos demonstraram a presença de apoB100, apolipoproteína constituinte da LDL, no cérebro de animais hipercolesterolêmicos (Chen et al., 2010; Löffler et al., 2013). Com base no trabalho anterior do nosso grupo, podemos especular que o aumento na permeabilidade da BHE observada nos camundongos LDLr^{-/-} (de Oliveira et al., 2014) pode desencadear a entrada de partículas de LDL plasmáticas no SNC (Hui et al., 2012; Löffler et al., 2013).

Figura 12. Atividade das isoformas da monoamina oxidase em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}

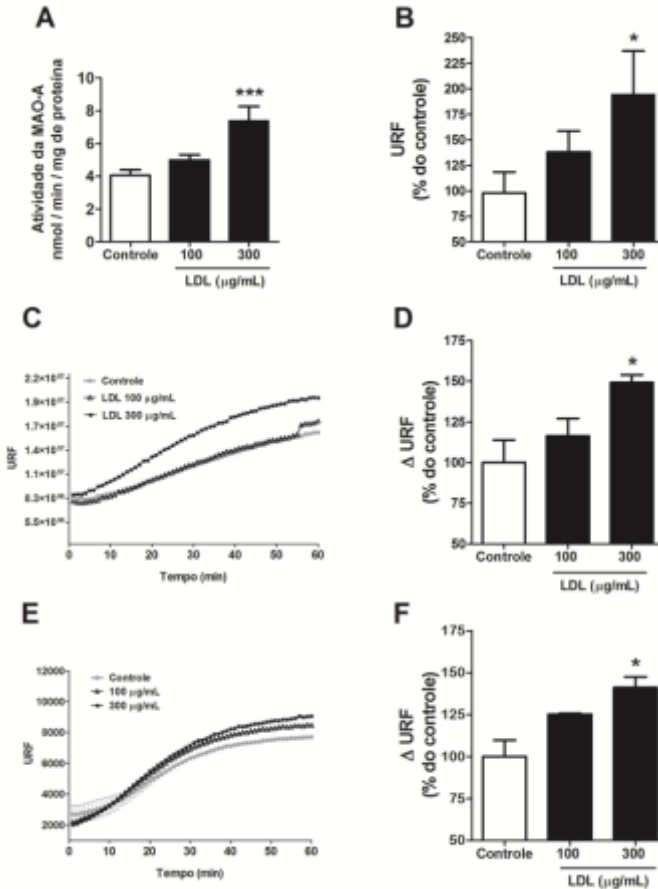


Hipocampo (A e B) e córtex cerebral (C e D). Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (6-9 animais/grupo). Os resultados obtidos foram avaliados por teste t. * $p < 0,05$ vs. camundongos C57BL/6 do tipo selvagem.

No intuito de avaliar a possível toxicidade das partículas de LDL, no que diz respeito ao processamento das monoaminas, investigamos se a exposição por 24h à LDL humana isolada (100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) modifica a atividade da MAO em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano. A análise de variância indicou efeito [$F(2,6) = 9,09$, $p < 0,05$] do tratamento com LDL na atividade da MAO-A, isoforma predominante neste tipo celular (Fitzgerald et al., 2007). O teste *post hoc* de Duncan mostrou efeito significativo da exposição à LDL (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $p \leq 0,001$) sobre o aumento da atividade da MAO-A (Figura 13A). Devido sua localização predominante na membrana mitocondrial externa, acredita-se que uma atividade excessiva da MAO pode estar relacionada com

dano mitocondrial (Hauptmann et al., 1996). Por outro lado, uma disfunção mitocondrial decorrente de estresse oxidativo também pode alterar a atividade desta enzima (Konradi et al., 1986). Portanto, utilizando as sondas DCFH e DHR avaliamos o efeito do tratamento com LDL humana isolada sobre a produção de espécies reativas após 24h de exposição (Figura 13B) e também durante a primeira hora de exposição (com medidas a cada minuto - Figura 13C e E; e a variação entre o minuto 1 e o minuto 60 - Figura 13D e F). A ANOVA de uma via indicou efeito do tratamento nos níveis de espécies reativas em 24h [$F(2,9)=10,55$, $p < 0,05$] e em 1h [$F(2,6)=5,77$, $p < 0,05$] para DCF e [$F(2, 3)=9,75$, $p < 0,05$] para DHR. A análise *post hoc* demonstrou que a exposição das células SH-SY5Y com LDL aumenta a geração de espécies nitro-oxidativas desde a primeira hora de exposição e que este efeito persiste por 24 h (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $p < 0,05$).

Figura 13. Efeito da exposição à LDL sobre a atividade da monoamina oxidase e produção de espécies reativas em células SH-SY5Y



Atividade da MAO (A). Produção de espécies reativas após 24 (B) ou 1h (C a F) da exposição à LDL 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$. Fluorescência de DCF (B a D) e de DHR (E e F). Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (n=2-4 experimentos independentes). URF- Unidades relativas de fluorescência. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste Duncan. * $p < 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ vs. o grupo controle.

4.3. Discussão

Durante as duas últimas décadas diversos estudos epidemiológicos comprovaram a relação entre a hipercolesterolemia na idade adulta e o comprometimento cognitivo em idades avançadas, destacando o papel do colesterol na patologia de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (Kivipelto et al., 2001; Solomon et al., 2009). Particularmente, indivíduos com HF, expostos a elevados níveis de colesterol desde o início da vida, apresentam elevada incidência de comprometimento cognitivo, em anos posteriores (Zambón et al., 2010). Neste sentido, a literatura também aponta para a associação deste distúrbio metabólico a transtornos de humor, como a depressão (Nakao et al., 2001b; Tyrovolas et al., 2009; Vural et al., 2007). Somando ao conjunto de evidências experimentais sobre os distúrbios cognitivos na HF (Moreira et al., 2012; Mulder et al., 2004; de Oliveira et al., 2011; Thirumangalakudi et al., 2008), o presente estudo demonstra, pela primeira vez, que os camundongos LDLr^{-/-} também apresentam um fenótipo tipo-depressivo. Estes resultados corroboram as observações clínicas de que a comorbidade entre depressão e prejuízo cognitivo leve aumenta significativamente a chance de os indivíduos desenvolverem demência, sendo que a depressão é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comumente associados à doença de Alzheimer (Modrego e Ferrández, 2004).

Neste estudo o fenótipo tipo-depressivo foi evidenciado por meio de diferentes critérios comportamentais. O paradigma da anedonia, inabilidade de sentir prazer, foi avaliado experimentalmente pelo teste de preferência da sacarose. Os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram um consumo reduzido de sacarose, caracterizando um comportamento tipo-anedônico, que parece ser um dos padrões comportamentais mais frequentemente observados em modelos animais de depressão (Vural et al., 2007).

Este comportamento tipo-anedônico dos camundongos LDLr^{-/-} também foi caracterizado no teste de borrifagem da sacarose. Este resultado indica uma redução no comportamento motivacional e de auto-cuidado, similar ao produzido por protocolos experimentais de indução de comportamento tipo-depressivo, como o estresse crônico imprevisível e a administração crônica de corticosterona (Isingrini et al., 2010), o que uma vez mais endossa a caracterização do fenótipo tipo-depressivo dos camundongos LDLr^{-/-}.

O TSC tem sido majoritariamente utilizado como ferramenta para avaliação da atividade e tipo-antidepressiva de substâncias, e é baseado

na premissa de que diversas classes de antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade de animais neste teste (Steru et al., 1985). No entanto, além de seu emprego na triagem de novos compostos antidepressivos, também é empregado como ferramenta de caracterização de comportamento tipo-depressivo em animais submetidos a modelos de depressão e camundongos transgênicos (Martín-de-Saavedra et al., 2013). Corroborando as observações no teste de preferência e borrifagem da sacarose, os camundongos LDLr^{-/-} também demonstraram comportamento tipo-depressivo no TSC. Neste sentido, Strekalova e colaboradores (2015) demonstraram que o consumo de uma dieta com alto teor de colesterol por camundongos C57BL/6J resultou em comportamento tipo-depressivo no TSC, contudo os autores não avaliaram os níveis de colesterol plasmático nestes animais.

Conjuntamente, estes resultados constituem evidências experimentais da relação entre o comportamento tipo-depressivo e a hipercolesterolemia. De fato, este estudo demonstra uma correlação significativa entre os níveis de colesterol plasmático e comportamento tipo-depressivo, nos testes de preferência pela sacarose, borrifagem de sacarose e no TSC nos camundongos LDLr^{-/-}.

A hipótese monoaminérgica, primeira teoria a propor um mecanismo etiológico para a depressão, postula que esta condição está relacionada a uma redução nos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos no cérebro (Schildkraut, 1995). Em conformidade com esta hipótese, alguns estudos sugerem que a MAO, enzima que metaboliza as monoaminas, pode estar inapropriadamente ativa em indivíduos depressivos, o que leva a redução nos níveis destas aminas biogênicas no SNC (Meyer et al., 2006). Ambas as isoformas da MAO, A e B, catalisam a desaminação oxidativa dos neurotransmissores monoaminérgicos (Bortolato et al., 2008). A ativação anormal da MAO é reportada em transtornos neuropsiquiátricos e doenças neurodegenerativas como a depressão, ansiedade, e nas doenças de Parkinson e Alzheimer (Meyer et al., 2006; Sherif et al., 1991; Takehashi et al., 2002; Youdim e Tipton, 2002).

Corroborando esta linha de evidência, o presente estudo demonstra um aumento significativo na atividade da MAO-A e da MAO-B hipocámpais nos camundongos LDLr^{-/-}. Estas alterações podem estar refletindo níveis da proteína que são influenciados, dentre outros fatores por reguladores epigenéticos (Mousseau e Baker, 2012). De fato, a expressão e a atividade da MAO podem ser modificadas por fatores extrínsecos; por exemplo, Lee e colaboradores (2010) demonstraram que uma dieta rica em gordura induziu aumento na expressão gênica da

MAO-A no hipotálamo de camundongos C57BL/6. Ademais, por estar localizada predominantemente na membrana externa da mitocôndria, uma ativação prolongada da MAO pode levar a danos mitocondriais (Hauptmann et al., 1996). Paralelamente, uma disfunção mitocondrial e consequente estresse oxidativo pode conduzir a uma ativação excessiva da MAO (Konradi et al., 1986).

Os subprodutos das reações catabólicas mediadas pela MAO incluem várias moléculas capazes de produzir outras espécies reativas induzindo, por exemplo, apoptose neuronal em condições neurodegenerativas (Bortolato et al., 2008). Por outro lado, acredita-se que os efeitos terapêuticos de muitos inibidores da MAO se devem também por resultarem em uma supressão do estresse oxidativo e desbalanço redox induzido pela atividade da MAO (Bortolato et al., 2008). Neste sentido, o aumento na atividade da MAO observado no hipocampo dos camundongos LDLr^{-/-} pode estar relacionado a estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Resultados recentes do nosso grupo embasam esta hipótese. Nestes estudos observou-se aumento da geração de espécies reativas no hipocampo, desregulação de defesas antioxidantes e prejuízo na função mitocondrial cerebral dos camundongos LDLr^{-/-} (Moreira et al., 2012; de Oliveira et al., 2011, 2014).

Outra evidência recente publicada por nosso grupo foi a observação de que os animais LDLr^{-/-} possuem a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) aumentada (de Oliveira et al., 2014). O aumento da permeabilidade da BHE pode possibilitar, por exemplo, a entrada da LDL no cérebro resultando em elevada endocitose e acúmulo de colesterol pelos neurônios (Chen et al., 2010; Hui et al., 2012). Com o objetivo de elencar mecanismos envolvidos nas alterações no metabolismo monoaminérgico, células de neuroblastoma humano foram expostas à LDL plasmática isolada. Corroborando os resultados *in vivo*, previamente mencionados, foi observado um aumento na atividade da MAO nas células SH-SY5Y após o tratamento *in vitro* com LDL, e este efeito foi combinado com o aumento na produção de espécies reativas. Com base nestes resultados é possível especular que a alteração na atividade da MAO está, pelo menos em parte, associada ao estresse oxidativo.

Em conjunto estes dados fornecem as primeiras evidências experimentais do fenótipo tipo-depressivo em camundongos LDLr^{-/-}, modelo de HF. Especificamente, quando comparados a camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, os LDLr^{-/-} demonstraram comportamento tipo-depressivo, que foi correlacionado com a hipercolesterolemia.

Além disso, este estudo também demonstrou alteração no metabolismo monoaminérgico em camundongos LDL^{r-/-} e em células neuronais expostas à LDL, e o possível envolvimento do estresse oxidativo neste processo.

5. CAPÍTULO II

Camundongos LDLr^{-/-} apresentam alterações na plasticidade hipocampal, refletidas na neurogênese e em parâmetros comportamentais dependentes do hipocampo?

Este capítulo apresenta os resultados relacionados ao segundo objetivo específico desta tese.

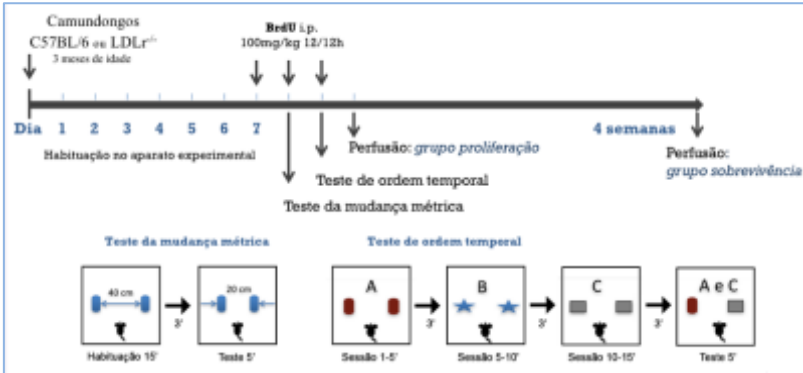
5.1. Materiais e métodos

5.1.1. Protocolo experimental

O objetivo deste bloco experimental foi avaliar se a hipercolesterolemia familiar está associada às alterações em parâmetros comportamentais dependentes do hipocampo, e na proliferação celular hipocampal no cérebro adulto. O GD hipocampal é uma das poucas regiões do cérebro de mamíferos onde ocorre neurogênese na idade adulta (Gage, 2000). Com o objetivo de caracterizar a neurogênese hipocampal adulta em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de 3 meses de idade machos receberam injeções de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (100 mg/kg, i.p. 2 vezes ao dia por 3 dias) e foram subdivididos em 2 grupos e eutanasiados 1 dia ou 28 dias após a última injeção (análise da proliferação ou sobrevivência celular, respectivamente). Para a caracterização do comportamento dependente do hipocampo, os animais foram submetidos aos testes de mudança métrica (teste que avalia a integridade funcional do GD) e 24 h depois, ao teste de ordem temporal (teste que avalia a integridade da região CA). O teste de mudança métrica foi realizado após 7 dias de habituação no aparato comportamental (Figura 14). Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados (hidrato de cloral 10%), perfundidos com solução salina seguida de paraformaldeído 4% e os encéfalos removidos da calota craniana para caracterização imunohistológica. As amostras foram imunomarcadas com anticorpos anti-BrdU, anti-Ki-67 (marcador endógeno de atividade mitótica), e NeuN (marcador nuclear de neurônios em estágio avançado de maturação) e o número de células positivas para cada marcador na região subgranular do GD hipocampal foi quantificado. Outro grupo de animais foi eutanasiado por deslocamento cervical e o córtex cerebral e o hipocampo foram

dissecados para a determinação dos níveis de RNAm de BDNF e TrkB por qRT-PCR.

Figura 14. Protocolo experimental 2



Avaliação do efeito da hipercolesterolemia familiar sobre a neurogênese hipocampal adulta e parâmetros comportamentais dependentes do hipocampo.

5.1.2. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 e nocautes para o receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$), machos, de 3 meses de idade, alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm), com condição controlada de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 7 horas às 19 horas), e com livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC), Protocolo PP00948, que segue normas internacionais de utilização de animais para pesquisa científica.

5.1.3. Tratamento

O 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), é um análogo da timidina que se incorpora ao DNA durante a fase S do ciclo celular (Cooper-Kuhn e Georg Kuhn, 2002), e foi utilizado para marcar as células em proliferação. O BrdU (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em 0,1 M PBS, pH = 7,2 e administrado duas vezes ao dia (12/12 h; 08:00 h e 20:00 h) durante 3 dias, por via intraperitoneal (i.p.) na dosagem de 100 mg/kg.

5.1.4. Testes comportamentais

5.1.4.1. Aparato experimental e ambientação

O aparato experimental para os testes da mudança métrica e da ordem temporal consistiu de uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. Cinco conjuntos de objetos foram utilizados (um conjunto para a ambientação, um para o teste da mudança métrica e três conjuntos para o teste de ordem temporal). Os objetos incluíram blocos de brinquedo do tipo LEGO®, pequenas garrafas de cerâmica, recipientes de vidro, etc. e variaram em tamanho entre 2,5 e 5 cm na base e entre 5 e 15 cm de altura (Hunsaker et al., 2009, 2010). Os objetos foram escolhidos de forma que apresentassem textura e características visuais únicas, a fim de que fossem facilmente discriminados pelos animais. Durante os intervalos entre ambientação e sessões de teste, os animais foram colocados em uma caixa limpa e vazia. O aparato experimental foi limpo com etanol 70% após cada teste para que odores não influenciassem a exploração dos objetos pelo próximo animal. Imagens de todas as sessões de teste foram adquiridas através do programa ANY-maze (Stoeling Co., Wooddale, IL, USA), por meio de uma câmera de vídeo (Logitech, Newark, CA, USA), posicionada acima do campo experimental.

Todos os animais (8-15 por grupo experimental) passaram pelo período de 7 dias de ambientação ao aparato. Nos 3 primeiros dias os animais foram manuseados pela cauda e colocados no aparato vazio por 1 minuto e retornados para suas caixas. Nos 2 dias seguintes os animais ficaram no aparato vazio por 5 minutos e então foram retornados para suas caixas. Nos 2 últimos dias os animais foram ambientados no aparato por 10 minutos na presença de 2 objetos, retornados para suas caixas. Nos dias 8 e 9 os animais foram submetidos aos testes de mudança métrica e ordem temporal, respectivamente (Dere et al., 2005).

5.1.4.2. Teste da mudança métrica

Este teste consistiu de uma sessão de habituação e uma sessão de teste. Cada camundongo foi colocado no aparato experimental contendo 2 objetos 40 cm distantes um do outro. Após 15 min de livre exploração do aparato e objetos (sessão de habituação), o animal foi removido e colocado em uma caixa limpa e vazia, por 3 min. Neste intervalo os objetos foram aproximados a 20 cm de distância entre si. O camundongo foi novamente colocado na arena experimental para um período de 5 min de re-exploração dos objetos (sessão de teste). Para o período de

habituação (15 min), o tempo total de exploração dos objetos foi dividido em 3 partes, para facilitar a comparação entre os 5 min finais da sessão de habitação e os 5 min exploração na sessão teste. Quando não houve declínio no tempo de exploração dos objetos na sessão de habituação (entre as 3 divisões de 5 min), isto foi considerado um indicativo de que o animal não se habitou aos objetos e este foi removido da análise. Uma diminuição de 10% da exploração inicial foi adotada como critério de corte.

5.1.4.3. *Teste da ordem temporal*

O teste de ordem temporal foi composto por 3 sessões de habituação e 1 sessão teste. Na primeira sessão de habituação 2 objetos idênticos (A) foram centralizados e posicionados a pelo menos 10 cm das extremidades do aparato experimental. Cada camundongo pôde explorar os objetos livremente por 5 min, quando foi removido e colocado em uma caixa limpa e vazia por 3 min. Neste intervalo os objetos foram substituídos pelo segundo par de objetos idênticos entre si (B). O procedimento anterior foi repetido, e da mesma forma com um terceiro par de objetos (C). Após a terceira sessão de habituação os camundongos foram colocados novamente por 3 minutos em uma caixa vazia, quando um objeto A da primeira sessão e um objeto C da terceira sessão foram posicionados. O camundongo foi colocado no aparato para uma nova sessão de exploração de 5 min, esta foi a sessão teste. Caso algum animal tenha apresentado uma clara preferência por um dos pares de objetos (A-C) nas sessões de habituação (tempo de exploração maior que 30 s), este foi removido das análises.

5.1.4.4. *Análise comportamental*

Uma razão de exploração para o teste da mudança métrica foi calculada para facilitar a comparação entre a sessão teste e os últimos 5 min da sessão de habituação, como descrito previamente (Goodrich-Hunsaker et al., 2005; Kannangara et al., 2015). A razão foi calculada de acordo com a seguinte equação: [(tempo de exploração durante os 5 min da sessão teste) / (tempo de exploração durante os 5 min finais da sessão de habituação)].

Todos os valores estão entre 0 e 1 e uma razão de exploração aumentada na sessão teste em relação aos 5 min finais da habituação é representada por um valor $> 0,5$.

A exploração no teste de ordem temporal também foi convertida em uma razão entre -1 e 1. Esta razão foi calculada da seguinte forma: [(exploração do objeto A- exploração do objeto C)/ (exploração do objeto A + exploração do objeto C)].

5.1.5. Análise da neurogênese hipocampal adulta

Os camundongos foram anestesiados com hidrato de cloral (40%; i.p.) e logo perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina (NaCl 0,9%), seguida por uma solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M (pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e pós-fixados na mesma solução fixadora durante 24 horas à temperatura ambiente e crioprotetidos por imersão em solução de sacarose 30 % em PBS 0,1 M a 4 °C. Após, os encéfalos foram congelados por imersão em isopentano resfriado e armazenados a -80 °C para as análises posteriores. Cortes coronais (40 µM) em série de hipocampo foram obtidos com um criostato (Leica) a -25 °C.

A fim de avaliar a proliferação celular e sobrevivência na camada subgranular do GD, uma série de cortes foi processada para a detecção do BrdU incorporado a partir das injeções e do marcador endógeno de proliferação Ki67, uma proteína nuclear expressa durante todas as fases ativas do ciclo celular (Christie e Cameron, 2006; Scholzen e Gerdes, 2000). Os cortes foram submetidos a desnaturação ácida do DNA em solução HCl 2N a 65 °C por 30 min e pré-incubação com solução de bloqueio (0,1M TBS, 0,15M NaCl, 0,1M Tris-HCl, pH 7,5; soro de cabra 5%; e Triton X-100 0,25%), e então incubados com os anticorpos primários por 48 h a 4 °C: anti-BrdU produzido em camundongo (1:60; DAKO), anti-Ki67 produzido em coelho (1:200; Vector Laboratories). Após lavagem em PBS 0,1 M, os cortes de tecido foram incubados com o anticorpo anti- camundongo Alexa fluor 488 (1:500; Jackson ImmunoResearch) e anti-coelho Alexa fluor 568 (1:500; Jackson ImmunoResearch) em 1% de soro de cabra diluído em PBS 0,1 M contendo 0,5% de Triton X-100, durante 2 horas à temperatura ambiente.

A diferenciação das células proliferativas para a linhagem neuronal foi quantificada pela dupla marcação BrdU/NeuN. Após a desnaturação do DNA e bloqueio os cortes foram incubados por 48 h a 4 °C com os anticorpos anti-BrdU produzido em rato (1:60; DAKO) e anti-NeuN produzido em camundongo (1:50; Chemicon). Após lavagem em PBS 0,1 M, os cortes foram incubados com o anticorpo anti- rato Alexa fluor 488 (1:500; Jackson ImmunoResearch) e anti-camundongo

Alexa fluor 568 (1:500; Jackson ImmunoResearch) em 1% de soro de cabra diluído em PBS 0,1 M contendo 0,5% de Triton X-100, durante 2 horas à temperatura ambiente. Por fim, os cortes foram novamente lavados com PBS 0,1 M e montados em lâminas com meio de montagem CC/mount e cobertos com lamínulas e armazenadas a 4 °C protegidas de luminosidade.

5.1.6. *Quantificação morfológica*

As contagens das células imunomarcadas foram realizadas utilizando microscópio de fluorescência (Leica DM5500 B). O número de células imunopositivas para BrdU e Ki-67 no GD hipocampal foi estimado manualmente pela contagem das células positivas localizadas entre dois a três diâmetros nucleares entre a camada de células granulares. Todos os cortes do GD (de ~1,34 mm posterior ao Bregma a 3,52 mm posterior ao Bregma) (Franklin e Paxinos, 2013) foram utilizados na análise. O resultado foi expresso como número total de células positivas no GD, obtido pela multiplicação: média de células positivas/corte de GD x o número total de cortes de 30 µm obtido por GD (cerca de 73 cortes).

5.1.7. *Análise fenotípica*

A análise dos neurônios recém-formados no GD foi realizada em uma a cada 6 séries de cortes duplamente marcados (Kempermann et al., 2003). Um total de 50 células BrdU-positivas foi randomicamente selecionada para análise de colocalização com NeuN. As imagens de microscopia confocal (Leica DMI6000 B) foram obtidas e a dupla marcação foi confirmada pela reconstrução da série z de, no mínimo, todo o núcleo ou célula em questão (Gil-Mohapel et al., 2013).

5.1.8. *Determinação da expressão gênica (qRT-PCR)*

A expressão gênica (RNAm) foi determinada através de PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR). O córtex cerebral e hipocampo dos animais foram homogeneizados em tampão de lise e o RNA total foi extraído com o kit SV Total RNA Isolation. Cerca de 300 ng de RNA total foi utilizado na síntese de cDNA, utilizando o kit Taqman Reverse Transcriptase e a enzima Transcriptase Reversa (Multiscribe II). A reação foi realizada em Termociclador (Eppendorf), de acordo com o seguinte protocolo: 25 °C por 10 min para o anelamento das sequências

iniciadoras, 48 °C durante 1 h para síntese e 95 °C por 5 min para inativação da enzima, seguindo as instruções do manual do produto. A reação qRT-PCR foi realizada em equipamento ABI PRISM série 7900 da Applied Biosystems, utilizando 10-100 ng de cDNA e o kit Power SYBR Green PCR Master Mix da Applied Biosystems, na presença de 0,5 µM de iniciadores “forward” (F) ou “reverse” (R). As sequências iniciadoras foram desenhadas utilizando o programa PrimerExpress (Applied Biosystems). A reação qRT-PCR foi seguida o seguinte protocolo: 50 °C por 2 min (incubação), 95 °C por 10 min (ativação da Taq polimerase), 40 ciclos de 95 °C por 10 s e 60 °C por 1 min. Para cada amostra, a expressão dos genes foi quantificada utilizando uma curva-padrão de cDNA de lisado celular total. Os resultados foram normalizados pela expressão de β -actina (ACTB) (Engel et al., 2013).

5.1.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se teste *t* e estão também descritas nas legendas das respectivas figuras. O nível de significância adotado para todos os experimentos foi $p < 0,05$. O teste de Grubbs foi aplicado para identificar valores fora da normalidade amostral. Todos os resultados foram expressos em média + erro padrão da média (EPM). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica® ou GraphPad Prism e as figuras representativas elaboradas no programa GraphPad Prism.

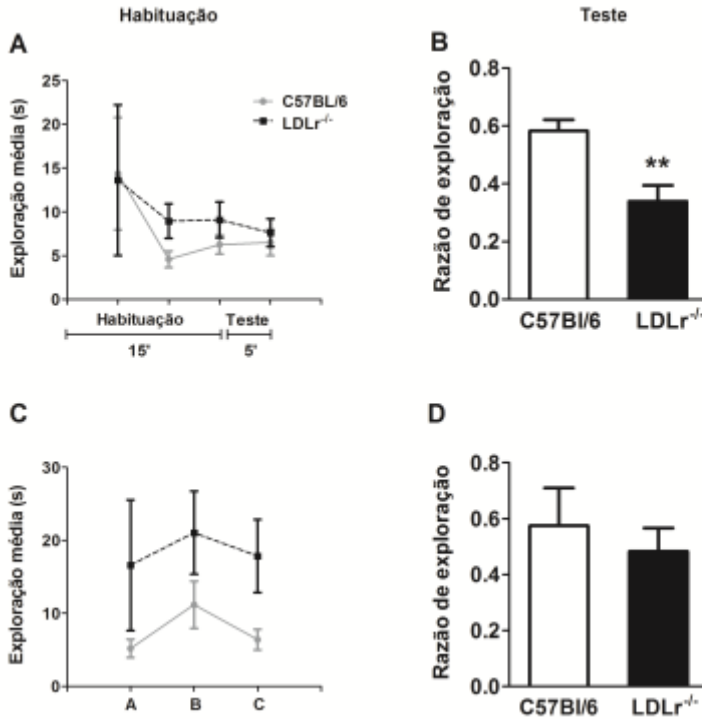
5.2. Resultados

No SNC adulto, o hipocampo é a estrutura crucial para a formação de certos tipos de memória, como a episódica e espacial (Squire, 1992). Além disso, por se conectar com outras estruturas associadas ao humor e emoções, como a amígdala, também desempenha papel essencial na regulação destes aspectos comportamentais (Sahay e Hen, 2008). A integração de novos neurônios no circuito hipocampal já existente é essencial para a modulação de repostas relacionadas à memória, humor e emoções. O objetivo deste bloco experimental foi avaliar se a hipercolesterolemia familiar está associada a alterações comportamentais dependentes do hipocampo e à neurogênese hipocampal. Primeiramente, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} de 3 meses de idade machos foram submetidos aos testes comportamentais de mudança métrica (teste que avalia a integridade funcional do GD) (Hunsaker et al., 2009) e 24 horas depois foram submetidos ao teste de ordem temporal (teste que avalia a integridade funcional da região CA) (Hunsaker et al., 2010).

Como demonstrado na Figura 15B os camundongos LDLr^{-/-} não foram capazes de perceber a mudança métrica na posição dos objetos, indicado por uma menor razão de exploração em relação aos animais selvagens ($t = 3,62, p \leq 0,01$). Este resultado indica que os camundongos LDLr^{-/-} possuem um déficit na função hipocampal dependente do GD. Por outro lado, não observamos diferença entre os grupos no teste de ordem temporal (Figura 15D), que avalia a região CA ($t = 0,61, p = 0,55$).

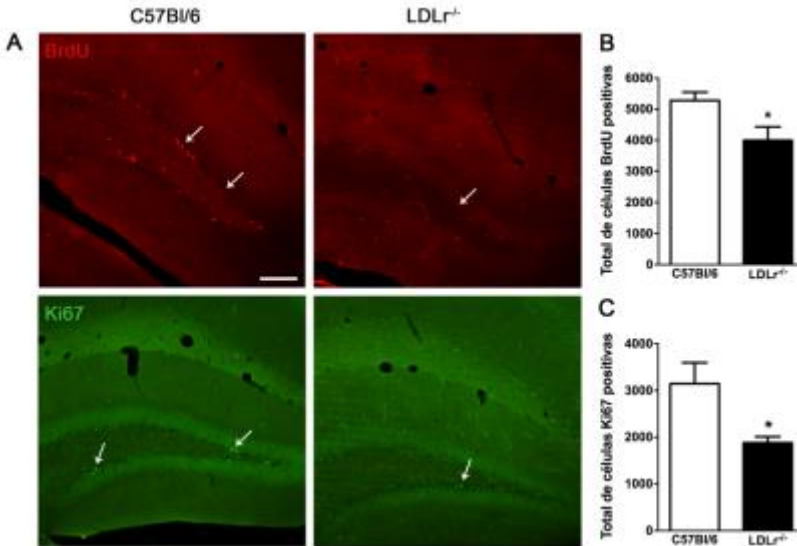
A seguir, foi investigado se o déficit funcional observado nos camundongos LDLr^{-/-} no teste de mudança métrica está associado com alguma alteração na proliferação celular hipocampal. A fim de observar as células em proliferação, os camundongos LDLr^{-/-} e selvagens receberam injeções de BrdU, e foram eutanasiados 24 h após a última injeção. Os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram redução no número de células BrdU positivas em relação aos controles selvagens (Figura 16A e B; $t = 2,51, p < 0,05$). Este resultado foi confirmado pela utilização do marcador endógeno de proliferação, Ki67 (Figura 16A e C; $t = 2,52, p < 0,05$).

Figura 15. Avaliação comportamental de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-} em tarefas hipocampo-dependentes



Teste da mudança métrica (A e B) - que avalia uma tarefa dependente do giro denteado - e da ordem temporal (C e D) dependente da sub-região *cornu ammonis* do hipocampo. A e C indicam o período de habituação aos testes. A razão em B é obtida pela seguinte equação: tempo de exploração dos objetos no teste/ (tempo de exploração dos objetos nos 5 min finais da habituação + tempo de exploração dos objetos no teste); e em D razão = (tempo de exploração do objeto A- tempo do objeto C)/ (tempo objeto A+ tempo objeto C). Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (8-15 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por teste t. ** $p \leq 0,01$ vs. camundongos C57BL/6 do tipo selvagem.

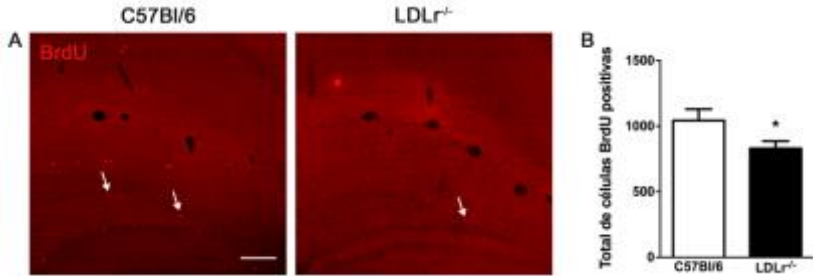
Figura 16. Análise da proliferação celular na camada de células granulares do GD em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}



(A) Imagens representativas dos grupos experimentais, barra de escala = 100 μ m. Quantificação das células BrdU (B) e Ki67 (C) positivas. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (7 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por teste t. * $p < 0,05$ vs. camundongos C57BL/6 do tipo selvagem.

Outro grupo de animais que recebeu as injeções de BrdU foi eutanasiado 28 dias após a última injeção com intuito de avaliar a taxa de maturação das células proliferativas no GD hipocampal. Neste caso o número de células BrdU positivas também foi menor nos camundongos LDLr^{-/-} em relação ao grupo controle (Figura 17A e B; $t = 2,71$, $p < 0,05$).

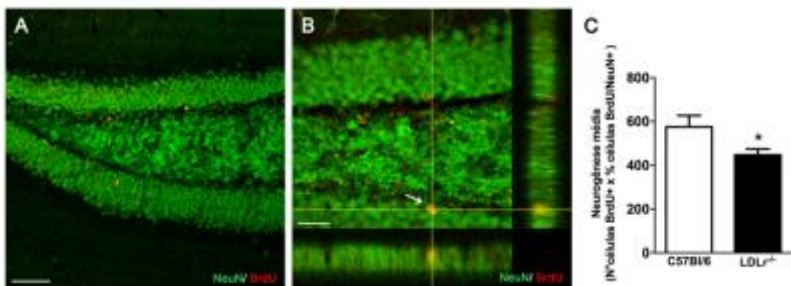
Figura 17. Maturação celular na camada de células granulares do GD em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}



(A) Imagens representativas dos grupos experimentais, barra de escala = 100 μ m. Quantificação das células BrdU positivas (B). Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (7 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por teste t. * $p < 0,05$ vs. camundongos C57BL/6 do tipo selvagem.

Com o objetivo de determinar se houve algum efeito específico na diferenciação neuronal, o antígeno nuclear neuronal NeuN foi avaliado quanto à sua colocalização com as células que incorporaram BrdU e atingiram completa maturação e diferenciação celular após 28 dias. O número de células BrdU positivas, 4 semanas após as injeções, que colocalizaram com células NeuN positivas foi menor nos camundongos LDLr^{-/-} em relação aos camundongos selvagens (Figura 18C; $t = 2,22$, $p < 0,05$).

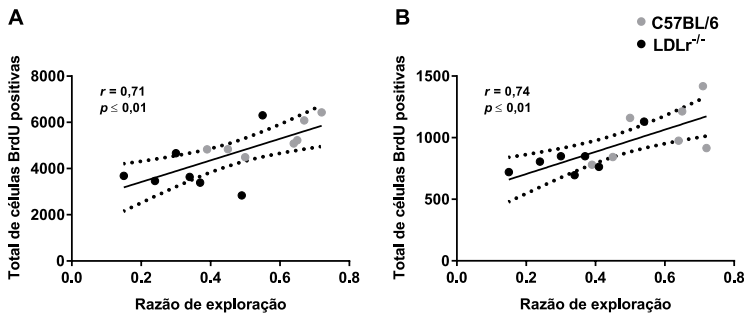
Figura 18. Diferenciação neuronal na camada de células granulares do GD em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e LDLr^{-/-}



(A e B) Imagens representativas da colocalização entre células BrdU e NeuN-positivas. (A) Barra de escala = 100 μ m e (B) Barra de escala = 20 μ m. (C) Quantificação da neurogênese média. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (6 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por teste t.

A análise de correlação de Pearson foi realizada com o objetivo de verificar uma possível correlação entre o déficit comportamental relacionado ao GD observado no teste da mudança métrica e a redução na proliferação e sobrevivência celular nesta região hipocampal. A diminuição na razão de exploração no teste da mudança métrica nos camundongos $LDLr^{-/-}$ foi correlacionada positivamente com a redução na proliferação ($r = 0,7117$, $p \leq 0,01$; Figura 19A) e na sobrevivência celular ($r = 0,7417$, $p \leq 0,01$; Figura 19B).

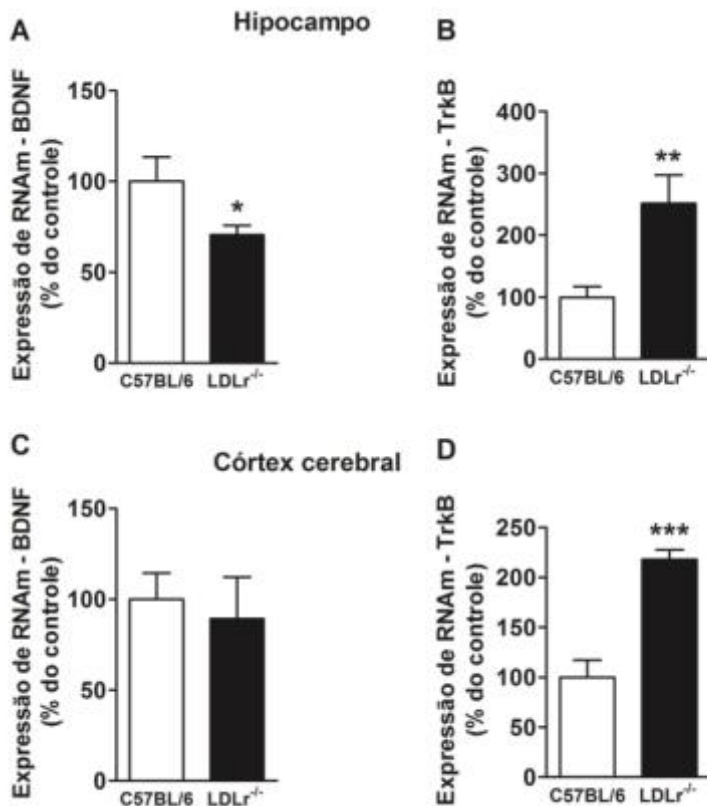
Figura 19. Correlação da razão de exploração no teste da mudança métrica e o número de células BrdU positivas



Análise de proliferação (A) e maturação (B) das células precursoras neuronais do GD.

O BDNF é uma das principais neurotrofinas envolvidas na regulação da reestruturação dendrítica, sobrevivência neuronal e neurogênese hipocampal (D'Sa e Duman, 2002) e sua expressão encontra-se alterada em indivíduos com depressão (Thompson Ray et al., 2011). Neste sentido, os níveis de RNAm de BDNF e do seu receptor TrkB foram quantificados no córtex cerebral e hipocampo dos camundongos controle e hipercolesterolêmicos. Foi observada uma redução da expressão gênica de BDNF no hipocampo de camundongos $LDLr^{-/-}$ (Figura 20A; $t = 2,04$, $p < 0,05$) sem alterações no córtex cerebral (Figura 20C; $t = 0,39$, $p = 0,35$). Por outro lado, o receptor TrkB teve sua expressão aumentada no hipocampo e no córtex cerebral de camundongos $LDLr^{-/-}$ (Figura 20B; $t = 3,11$, $p \leq 0,01$ e Figura 20D; $t = 5,98$, $p \leq 0,001$), quando comparado aos camundongos selvagens.

Figura 20. Expressão gênica de BDNF total e TrkB no córtex cerebral e hipocampo de camundongos selvagens e LDLr^{-/-}



Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (3 animais/grupo em duplicatas). Os resultados foram normalizados pelos níveis de RNAm de β -actina e comparados com o grupo controle (100%). Os resultados deste experimento foram analisados por teste t. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ vs. camundongos C57BL/6 do tipo selvagem.

5.3. Discussão

Estudos prévios já indicavam que o comprometimento cognitivo dos camundongos LDLr^{-/-}, modelo experimental de HF, poderia ter um componente significativo relacionado ao hipocampo. Particularmente, os trabalhos de Mulder e colaboradores chamam a atenção para as alterações hipocampais nestes animais. Aos 6 meses de idade os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram significativa redução na imunorreatividade para sinaptofisina (proteína associada a vesículas sinápticas) na região CA1 hipocampal, quando comparados aos camundongos selvagens (Mulder et al., 2004). De maneira interessante, aos 14 meses de idade apresentam também redução no número de botões sinápticos sinaptofisina-positivos no GD (inalterado aos 6 meses), concomitante à redução na proliferação celular na SGZ (não avaliada nos animais de 6 meses). Cabe ainda destacar, que as alterações relacionadas à plasticidade sináptica parecem se concentrar no hipocampo, visto que não foi observada redução na imunorreatividade para sinaptofisina no córtex cerebral (camadas 4 e 6) (Mulder et al., 2007).

O GD contribui para a formação das memórias espacial e episódica, atuando como um separador de padrões (Leutgeb et al., 2007), o que se traduz como a formação de diferentes representações para informações similares (Marr, 1971). Particularmente a separação de padrões é fundamental para diferenciar quais estímulos estão relacionados ao tempo e quais estão ao espaço (Kesner, 2007; Kesner et al., 2004). A nível celular, esta separação de padrões é possível devido a dispersão de aferências corticais oriundas do córtex entorrinal para as células granulares do GD, que por sua vez estabelece conexões com as células piramidais em CA3. Lesões neste circuito, particularmente no GD, resultam em prejuízos nas memórias dependentes da separação de padrões (Gilbert et al., 1998, 2001).

Kesner e colaboradores vêm desenvolvendo, ao longo das últimas décadas, diversos testes com o objetivo de caracterizar a contribuição de cada uma das três sub-regiões hipocampais em diferentes respostas comportamentais (Gilbert et al., 2001; Goodrich-Hunsaker et al., 2005; Hunsaker et al., 2008a; Kesner et al., 1987). No teste da mudança métrica a distância entre dois objetos idênticos é diminuída entre o período de habituação e o período de teste. Nos 15 minutos em que consiste o período de habituação, o animal reduz gradativamente o tempo de exploração dos objetos o que indica uma adaptação aos

objetos e ao ambiente/aparato experimental. Na sessão teste (cinco minutos seguintes, onde os objetos estão aproximados) essa exploração aumenta, indicando que o animal reconheceu uma alteração espacial na disposição dos objetos. Em 2008, o grupo de Kesner padronizou este teste, demonstrando que ratos submetidos a lesões induzidas por microinjeções de colchicina diretamente no GD, apresentaram prejuízo no reconhecimento da alteração espacial aplicada aos objetos (Hunsaker et al., 2008b). Além desta abordagem citotóxica, o mesmo comportamento também foi observado em camundongos modelo da síndrome do X frágil, doença neurodegenerativa causada por múltiplas repetições CGG ao gene FMR1 (Hunsaker et al., 2009), animais que também apresentam uma reduzida neurogênese hipocampal adulta (Guo et al., 2011). Mais recentemente, Kannangara e colaboradores (2015) demonstraram que camundongos com deleção para a subunidade GluN2A do receptor NMDA ($\text{GluN2A}^{-/-}$) também apresentam déficit cognitivo no teste da mudança métrica, associado a prejuízos de plasticidade sináptica no GD (evidenciados por meio de eletrofisiologia).

No presente estudo, os camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$ apresentaram uma redução na razão de exploração dos objetos, após a alteração na sua disposição espacial, em relação aos animais selvagens, indicando um déficit funcional relacionado ao GD. A correlação positiva entre esta reduzida razão de exploração dos objetos e o número de células BrdU positivas na SGZ, sugere que o déficit funcional no GD dos camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$ está associado com uma menor proliferação e sobrevivência celular nesta subregião. Este resultado corrobora com o estudo prévio de Mulder e colaboradores que demonstrou uma redução na proliferação celular no GD em camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$ de 14 meses de idade (Mulder et al., 2007). Ademais, nossos dados fortalecem a hipótese que o comprometimento na proliferação e sobrevivência celular deste modelo animal não é consequência do envelhecimento, já que trabalhamos com animais jovens. O prejuízo no comportamento dependente do processamento espacial observado nos camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$, também está de acordo com trabalhos anteriores de nosso e de outros grupos, os quais demonstram prejuízos na memória espacial no teste do labirinto aquático de Morris (Mulder et al., 2004) e no teste de realocação do objeto (Moreira et al., 2012; de Oliveira et al., 2014).

Por outro lado, embora uma redução no número de botões sinápticos na sub-região CA1 tenha sido observada nos camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$ aos 6 meses de idade (Mulder et al., 2004), aparentemente isto não é precedido por alterações funcionais desta região aos 3 meses de

idade, visto que no presente estudo não foram observadas diferenças na razão de exploração no teste de ordem temporal. Neste teste os animais são expostos a três conjuntos de objetos sequencialmente, durante 5 minutos (conjuntos A, B e C). Na sessão teste são expostos a um objeto do conjunto A e a um objeto do conjunto C por mais 5 minutos. Espera-se que o objeto C, exposto ao animal mais recentemente, seja menos explorado em relação ao objeto A. Portanto, uma maior razão de exploração do objeto A em relação ao C indica que o animal foi capaz de perceber o padrão temporal de apresentação dos objetos. Por exemplo, uma lesão neurotóxica, por ácido ibotênico, na região CA1 de ratos (Hunsaker et al., 2008a) resulta em redução nesta razão de exploração. Esta alteração também foi observada nos camundongos CGG-KI, modelo animal da síndrome do X frágil (Hunsaker et al., 2010).

Com relação à redução da proliferação e maturação celular observados nos camundongos LDLr^{-/-}, alguns mecanismos foram especulados anteriormente. Mulder sugere uma contribuição importante da redução na captação celular de colesterol, devido sua importância para a homeostase neuronal (Mulder et al., 2007). Entretanto, o papel do receptor de LDL nas células proliferativas do GD, seja internalizando colesterol ou atuando como receptor transdutor de sinal, não é satisfatoriamente conhecido. Apesar de os camundongos LDLr^{-/-} apresentarem um neurodesenvolvimento macroscópico normal, Parada e colaboradores (2008) reportaram que o neuroepitélio isolado de embriões apresentou 26% de redução na diferenciação a neurônios em comparação aos embriões de camundongos selvagens.

A neurogênese hipocampal adulta gera somente um tipo de neurônio: células granulares do GD. As células granulares são os principais neurônios excitatórios do GD e recebem aferências do córtex entorrinal e projetam seus axônios pelo trato de fibras musgosas para CA3, onde terminam em amplas sinapses em regiões ricas em interneurônios. Estas células são responsáveis pela neurotransmissão excitatória às células piramidais de CA3 e sua atividade é modulada por interneurônios no GD e hilo (Kempermann et al., 2015). No presente estudo, foi observado menor número de novos neurônios (células BrdU/NeuN-positivas) no GD de camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses de idade, o que pode ser um evento que precede a redução da densidade sináptica em idades mais avançadas (2004, 2007). A neurogênese está condicionada a um microambiente muito complexo, constituído por uma rede vascular; pela ação de diferentes fatores tróficos; em um ambiente eletroquímico ótimo; e pelo suporte das células gliais (Kohman e

Rhodes, 2013). A neuroinflamação vem sendo apontada como um dos possíveis fatores capazes de alterar o equilíbrio deste microambiente, levando a uma menor taxa de proliferação e sobrevivência celular. Por exemplo, a administração intracortical ou intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) de *E.coli*, capaz de induzir uma forte resposta imune, diminui a diferenciação de células precursoras a neurônios, e sua sobrevivência (Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003). A principal consequência da desregulação dos níveis de citocinas no encéfalo é a produção de moléculas inflamatórias, oxidativas e nitrosativas que podem afetar a neurogênese e a homeostase neuronal (Kubera et al., 2011). Uma desregulação metabólica, por exemplo, pode ocasionar condições inflamatórias periféricas e do SNC. Vinuesa e colaboradores (2016) demonstraram em camundongos C57BL/6 submetidos a uma dieta rica em gorduras por 5 meses, que o aumento dos níveis de colesterol plasmático foi associado a inflamação sistêmica e hipocampal. Esta desregulação metabólica foi associada ao desenvolvimento de prejuízo cognitivo, comportamento tipo-depressivo e redução na proliferação celular hipocampal e neurogênese no hipocampo dorsal. Quanto ao modelo de hipercolesterolemia familiar, o estudo de Thirumangalakudi e colaboradores (2008) demonstrou elevada neuroinflamação no cérebro dos camundongos LDLr^{-/-}, caracterizada por maior expressão de RNAm de citocinas pro-inflamatórias e ativação glial. Esta elevada ativação astrocitária nos camundongos LDLr^{-/-} também foi observada por nosso grupo recentemente (de Oliveira et al., 2014).

A neurogênese e a sobrevivência dos neurônios em desenvolvimento é fortemente regulada por BDNF, amplamente expresso no hipocampo adulto e em desenvolvimento (Lee et al., 2002; Linnarsson et al., 2000). Além disso, níveis adequados de BDNF estão positivamente correlacionados com a eficiência no processo de aprendizado e memória. O BDNF tem um papel no fenômeno da potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo, considerado o mecanismo celular implicado na formação de memória (Figurov et al., 1996). Com relação à neurogênese, o BDNF promove a diferenciação de neurônios a partir de células precursoras, bem como dá suporte a sua sobrevivência e integração sináptica. Além disso, este fator neurotrófico também induz biogênese mitocondrial nestes novos neurônios, está negativamente correlacionado com o estresse oxidativo e aumenta os níveis de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) - fundamentais para remodelagem contínua das sinapses (Jain et al., 2013; Marosi e Mattson, 2014).

Corroborando esta associação entre redução de BDNF e déficit na neurogênese hipocampal, no presente estudo os camundongos LDLr^{-/-} apresentam menores níveis de RNAm de BDNF no hipocampo, ao passo que os níveis de RNAm de seu receptor TrkB estão aumentados, não apenas no hipocampo mas também no córtex cerebral. A ligação do BDNF ao domínio extracelular do receptor TrkB induz a dimerização e ativação do domínio tirosina cinase intracelular. Isto resulta na autofosforilação dos resíduos tirosina que então atuam como sítios de interação com proteínas resultando na ativação de cascatas de sinalização intracelulares, que possuem diversos efeitos relacionados à neuroplasticidade (Duman e Voleti, 2012; Minichiello, 2009). Levando em conta que menores níveis de RNAm de BDNF e TrkB foram encontrados no cérebro *post mortem* de indivíduos depressivos (Dwivedi et al., 2003), o aumento que observamos em relação ao TrkB pode estar refletindo uma resposta compensatória à diminuição dos níveis de BDNF. Este tipo de resposta compensatória já foi observado em modelos de lesão nigro-estriatal por 6-hidroxidopamina (Hritcu e Gorgan, 2014) e de lesão da medula espinhal de ratos (Frisén et al., 1992).

Na depressão, a redução na neurogênese está associada com uma diminuição de neurotrofinas, como o BDNF (Angelucci et al., 2005). Recentemente, Molendijk e colaboradores (2011) demonstraram que esta diminuição de BDNF sérico é revertida durante as fases de remissão da doença. Ademais, redução na neurogênese e na expressão de BDNF em neurônios hipocampais são marcadores de episódios depressivos recorrentes em indivíduos não tratados (Vaidya e Duman, 2001). Alterações no genótipo de BDNF estão associadas a um maior risco para depressão resistente ao tratamento (Anttila et al., 2007). Alguns autores sugerem que a alta taxa de reincidência da depressão e também a resistência ao tratamento, pode estar associada com a característica de neuroprogressão da doença, ou seja, as progressivas alterações neuroanatômicas e de disfunção neuronal (Leonard e Maes, 2012).

Alterações volumétricas no hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal e outras regiões são frequentes em indivíduos com depressão crônica (Campbell e MacQueen, 2006). Particularmente esta redução hipocampal está associada aos déficits cognitivos observados em transtornos de humor, como na depressão tardia e na depressão associada ao comprometimento cognitivo leve (Brown et al., 2004). Por outro lado, o tratamento antidepressivo aumenta a regeneração celular e a neurogênese (Czéh et al., 2001; Dranovsky e Hen, 2006; Malberg et al., 2000), além de reestabelecer os níveis de BDNF plasmático e

cerebral em pacientes depressivos (Castrén et al., 2007; Chen et al., 2001; Dowlatshahi et al., 1998; Shimizu et al., 2003). Alguns autores sugerem que dentre outras variáveis, o efeito antidepressivo dependeria do restabelecimento dos níveis de BDNF no hipocampo e que indução da sua expressão gênica é observada em tratamentos crônicos com diferentes classes de antidepressivos, no entanto não com outros psicotrópicos (Adachi et al., 2008; Nibuya et al., 1995). Além disso, a administração de BDNF diretamente no cérebro produz efeito antidepressivo em diferentes modelos animais de depressão (Shirayama et al., 2002; Siuciak et al., 1997).

O conjunto de resultados apresentado neste capítulo caracteriza o comprometimento da neurogênese hipocampal adulta nos camundongos $LDLr^{-/-}$, modelo de HF. Especificamente, os camundongos $LDLr^{-/-}$ apresentaram reduzida proliferação, maturação e diferenciação neuronal das CPNs do GD, que foi correlacionada com prejuízo no desempenho de tarefa relacionada à esta estrutura hipocampal. Além disso, a expressão gênica da neurotrofina BDNF e seu receptor também estão alteradas no hipocampo destes animais quando comparados aos controles C57BL/6. Conforme a hipótese inicial deste estudo, esta alteração na neuroplasticidade dos camundongos $LDLr^{-/-}$ pode estar influenciando tanto os prejuízos cognitivos, tanto os aqui observados como os já descritos na literatura, como muito provavelmente é um importante fator contribuinte para o fenótipo tipo-depressivo descrito no capítulo I desta tese.

6. CAPÍTULO III

Avaliação do metabolismo do colesterol, da citotoxicidade da LDL e da deleção do LDLr em células precursoras neuronais do hipocampo adulto

Este capítulo apresenta os resultados relacionados ao terceiro e quarto objetivos específicos desta tese, que foram obtidos durante o período de estágio de doutorado sanduíche no exterior (PDSE/CAPES), no Centro de Terapias Regenerativas da Universidade Técnica de Dresden, sob supervisão do Prof. Dr. Gerd Kempermann.

6.1. Materiais e métodos

6.1.1. Protocolo experimental

A fim de investigar de que forma as características fenotípicas e metabólicas da hipercolesterolemia familiar (elevados níveis de colesterol plasmático e disfunção do LDLr) influenciam a neurogênese adulta, CPNs isoladas do GD de camundongos foram expostas à toxicidade da LDL e do 27-hidroxicolesterol (27-OH) e ao efeito do silenciamento do LDLr. Primeiramente as CPNs cultivadas em monocamada aderente foram submetidas a uma curva de tempo-resposta de diferenciação. Após plaqueadas as células foram cultivadas por 48 h em meio de cultura em condições de proliferação, ou seja, na presença de fatores tróficos (FT) NGF e FGF-2 e então parte das células foram coletadas (tempo 0). O restante das placas teve o meio de cultura substituído por meio sem FTs, para indução da diferenciação celular, e as células foram coletadas 24, 48 e 96 h após. O RNAm foi isolado para a determinação da expressão gênica de proteínas envolvidas na síntese e metabolismo do colesterol (Figura 21A).

Na sequência, as culturas em monocamada aderente de CPNs, em condições proliferativas, foram submetidas a diferentes concentrações de LDL humana isolada (25, 50, 100 or 200 µg/mL) ou ao 27-OH (1,5 e 10 e µM) ou ao silenciamento gênico do LDLr. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de metabolização de resazurina, 24 h após os tratamentos, e a proliferação celular avaliada pela incorporação de BrdU e posterior detecção imunocitoquímica, 48 h após os tratamentos. Nas células tratadas com LDL e LDLr siRNA (do inglês *small interfering RNA*), a progressão do ciclo celular também foi avaliada em 48 h, pela

incorporação de EdU e Hoechst, seguida de imunomarcção para detecção em citômetro de fluxo. Como segunda abordagem experimental de avaliação do ciclo celular foi realizado o ensaio de extinção do succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). O CFSE (10 μM) foi adicionado às culturas no momento do plaqueamento e sua fluorescência nas células foi quantificada por citometria de fluxo ao final do período dos tratamentos com LDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e siRNA (Figura 21B).

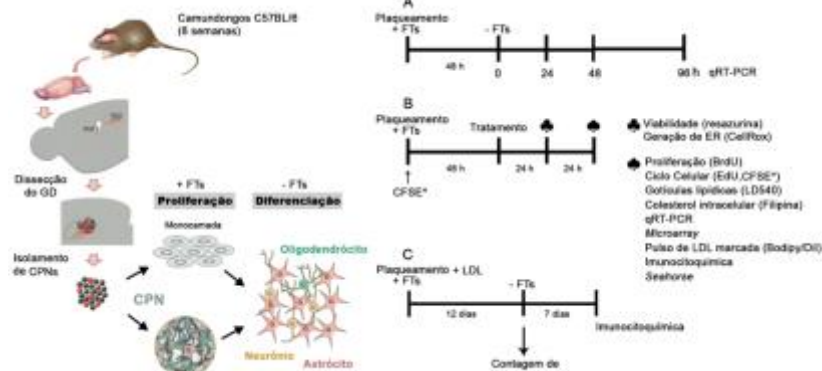
A fim de verificar se a LDL altera a diferenciação celular, as CPNs foram isoladas do GD de camundongos de 8 semanas e cultivadas na presença de LDL (25, 50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em meio de cultivo para formação de neuroesferas. Após 12 dias de incubação as neuroesferas foram mensuradas, quantificadas e plaqueadas em meio de diferenciação (sem FTs) por 7 dias. Após este período, foram fixadas e imunomarcadas para proteínas expressas pela linhagem neuronal e astrocitária, e as imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência para quantificação das novas células (Figura 21C).

Os níveis de RNAm das proteínas relacionadas ao metabolismo de colesterol foram avaliados após o silenciamento do LDLr e do tratamento com LDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Além disso estas amostras também foram submetidas à análise de microarranjos de DNA (microarray) a fim de diagnosticar, a partir de todo o transcriptoma, genes alterados pelos tratamentos e processos celulares relacionados (análise de ontologia genética).

Com o objetivo de verificar o efeito dos tratamentos sobre a internalização, transporte e armazenamento do colesterol, após os tratamentos, as células em monocamada foram marcadas com LD540 (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 15 min), uma sonda para detecção de gotas lipídicas, ou com a sonda filipina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 30 min), marcadora de colesterol. Além disso, a captação e internalização de LDL foi avaliada pela incorporação de LDLs marcadas com fluoróforos (LDL-DiI e LDL-Bodipy; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a morfologia e distribuição de organelas envolvidas no tráfego intracelular de colesterol, endossomos primários, tardios e lisossomos, foram analisadas por microscopia de fluorescência após marcação imunocitoquímica.

Por fim, as células tratadas também foram avaliadas em relação ao metabolismo energético mitocondrial e glicolítico, por meio de respirometria de alta resolução (Seahorse). Adicionalmente, a geração de ER foi avaliada nas células tratadas com LDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pela incubação com a sonda CellROX (5 μM , 30 min).

Figura 21. Protocolo experimental 3



Avaliação do efeito do tratamento in vitro com LDL, 27-OH e silenciamento gênico do LDLr sobre as células precursoras neuronais adultas (CPNs). (A) Curva tempo-resposta de diferenciação das CPNs e avaliação da expressão gênica (qRT-PCR) de genes relacionados ao metabolismo do colesterol. (B) Protocolo geral de tratamento com LDL, 27-OH, e LDLr siRNA e respectivos controles. (C) Efeito do tratamento com LDL na formação neuroesferas e diferenciação das CPNs. (A e B) Cultura em monocamada aderente, placas tratadas com PDL/laminina. (C) Células em suspensão em meio de formação de neuroesferas (12 dias). Posteriormente, as neuroesferas foram transferidas para placas tratadas com PDL/laminina (7 dias), para caracterização fenotípica.

6.1.2. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, de 8 semanas de idade, obtidos originalmente dos laboratórios Charles River (Alemanha), mantidos em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm), com condição controlada de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 7 horas às 19 horas), e com livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas nacionais e Europeias (*Tierschutzgesetz*), previamente aprovados pela autoridade local (*Landesdirektion Sachsen*).

6.1.3. Materiais

Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi). HBSS (PAA; GE Healthcare). Meio de cultivo Neurobasal (Gibco, Life Technologies). GlutaMAX, penicilina/estreptomicina (Life Technologies). Suplemento B27 (Invitrogen). Fator de crescimento de fibroblasto básico humano (bFGF ou FGF-2), fator de crescimento epidérmico (EGF; PeproTech). Filtro (Falcon; BD Biosciences). Accutase (PAA Laboratories). Poli-D-lisina (PDL) (Sigma). Laminina (Roche). Paraformaldeído (PFA; Sigma). ON-TARGETplus SMARTpool L-048572-00-0005; NON-TARGET pool (SO- 2551816G); Reagente de transfecção DharmaFECT 1 (Dharmacon). 27-OH (Santa Cruz). LDL humana isolada liofilizada, BrdU, succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína (CFSE), Filipina (Sigma). EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine; Click-iT EdU kit; Thermo Fischer Scientific) Albumina sérica bovina (BSA; GE Healthcare Life Sciences). Qiagen RNeasy kit (Qiagen). SuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo Fischer Scientific). LD540 (4,4-difluoro-2,3,5,6-bis-tetrametileno-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ünal Coskun. DiI- LDL e Bodipy-LDL (Thermo Fischer Scientific). CellROX® Deep Red Reagent (Thermo Fischer Scientific). Meio de montagem para fluorescência (DAKO-S3023).

6.1.4. *Cultura de células precursoras neuronais de hipocampo adulto*

Camundongos C57BL/6 foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados por deslocamento cervical, o encéfalo removido e o GD imediatamente microdissecado (Hagihara et al., 2009; Walker e Kempermann, 2014). O tecido foi enzimaticamente digerido utilizando *Neural Tissue Dissociation Kit* de acordo com as instruções do fabricante. Logo após uma última lavagem com tampão HBSS o sedimento foi ressuspenso em meio de cultura: Neurobasal, suplementado com 2% de B27, GlutaMAX 1X e 50 U/mL de penicilina/estreptomicina, 2 µg/ml de heparina, 20 ng/mL de FGF-2 e 20 ng/mL de EGF. A suspensão foi submetida à um filtro de 40 µm.

Preparação de neuroesferas: As células obtidas foram plaqueadas em 48 poços de uma placa de 96 poços na presença de LDL (0, 25, 50, 100 or 200 µg/mL) e incubadas a 37° em CO₂ 5% por 12 dias. No 12° dia as neuroesferas obtidas foram contadas e mensuradas.

Diferenciação de neuroesferas: cerca de 15 neuroesferas/condição foram removidas do meio e transferidas para uma placa de 24 poços contendo lamínulas tratadas com PDL/laminina e

mantidas em meio de cultura sem FTs por 7 dias a 37 °C/5% CO₂. Após este período as células foram fixadas com PFA 4% por 10 min e as placas contendo as lamínulas preenchidas com 1mL de PBS e estocadas a 4°C.

Preparação de culturas em monocamada aderente: A suspensão de células obtida da dissecação do GD foi plaqueada em uma placa de 96 poços revestido com Poli-D-lisina (PDL; 10 µg/mL) /laminina (5 µg/mL) e incubada a 37°C e CO₂ 5%. Após 24 h o meio foi substituído, e subsequentemente a cada 3-4 dias até 80% de confluência. Para a passagem foi adicionado ao poço 50 µl de Accutase a 37°C por 2-3 minutos. As células foram coletadas e centrifugadas. Para esta primeira passagem, as células foram diluídas em 1 ml e plaqueadas em um poço de uma placa de 24 poços revestido com PDL/laminina. Para as passagens subsequentes as células foram ressuspensas em 200 µl e plaqueadas 1x10⁴ cels/cm² no poço ou frasco desejado ou estocadas a -80 °C. De acordo com a padronização do laboratório as células foram estocadas na passagem 8, a partir da qual todos os experimentos de tratamento foram realizados (passagem entre 8 e 15).

6.1.5. Silenciamento gênico

A redução da expressão gênica do LDLr, foi induzida pela transfecção de uma mistura de 4 diferentes sequências de RNAs de interferência curtos (siRNA) dirigidos ao gene *LDLR* murino (LDLr siRNA). As células controle foram transfectadas com uma mistura de sequências siRNA sem gene alvo (siRNA controle). As CPNs derivadas de camundongos C57BL/6, em monocamada, foram plaqueadas e cultivadas por 48 h até a adição de 50 nM de siRNA e do agente de transfecção (DharmaFECT 1). As células foram incubadas por 24 h e o meio foi substituído por meio sem agentes de transfecção, incubadas por mais 24 h, e coletadas ou fixadas para as demais análises.

6.1.6. Preparo da LDL humana

Além da LDL obtida comercialmente (Sigma), parte dos tratamentos foi realizada com LDL purificada a partir de plasma humano proveniente de banco de sangue (DRK-Blutspendedienst Nord-Ost). O isolamento da LDL foi realizado conforme descrito no capítulo I.

6.1.7. *Imunocitoquímica*

As lamínulas contendo as neuroesferas diferenciadas foram fixadas com solução PFA 4 % em 0,1 M de PBS em temperatura ambiente por 10 min. Após lavagem em PBS, as células foram incubadas em solução de bloqueio (0,1 M PBS, soro de burro 10 %, Triton X-100 0,2%) por 60 min à temperatura ambiente. As células foram incubadas em solução de bloqueio contendo os anticorpos primários anti- β III-tubulina monoclonal (1:2000, Promega) produzido em camundongo e anti- GFAP policlonal (1:500; DAKO) produzido em coelho, por 60 min à temperatura ambiente. As células foram lavadas 3 vezes em PBS e incubadas com nova solução de bloqueio contendo os anticorpos secundários produzidos em burro Cy3 anti-camundongo (1:1000; Jackson ImmunoResearch) DyLight 488 produzido em burro anti-coelho (1:1000; Dianova), e Hoechst (1:5000; Thermo Fisher Scientific) por 30 min à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS as lâminas foram montadas usando meio de montagem para fluorescência (Aqua-Mount, Thermo Fischer Scientific) e foram analisadas em microscópio de fluorescência confocal Zeiss - Axio Observer.Z1.

As células em monocamada aderente foram cultivadas em placas de 24 poços (2 x 10⁴ células/poço) contendo lamínulas tratadas com PDL/laminina. As células foram fixadas com solução PFA 4 % em 0,1 M de PBS em temperatura ambiente por 10 min. As células que receberam BrdU foram lavadas com PBS e o DNA desnaturado com 1 N HCl por 30 min a 37 °C. Para todas as marcações, as células foram bloqueadas por 1 h em 0,1 M PBS, soro de burro 10 %, Triton X-100 0,2 %. Os anticorpos primários foram preparados em solução de bloqueio. Os anticorpos utilizados foram: monoclonal anti-BrdU produzido em rato (1:500; AbD Serotec), anti-EEA1 policlonal produzido em coelho (1:100; Abcam), Anti-Rab7 monoclonal produzido em camundongo (1:150; Abcam), Anti-LAMP1 monoclonal produzido em rato (1:100; Abcam) e secundários anti-coelho e anti-camundongo Cy3, anti-rato e anti-camundongo Cy5 (1:500 Jackson ImmunoResearch), anti-coelho e anti-rato Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific).

As células foram incubadas com o anticorpo primário anti-BrdU por 2 h ou com anticorpos anti-EEA1/Rab7/LAMP1 por 16 h e secundários por 1 h em temperatura ambiente. O núcleo foi marcado

com Hoechst e as lâminas foram montadas em Aqua-Mount e analisadas em microscópio de fluorescência confocal Zeiss - Axio Observer.Z1.

6.1.8. *Análise da viabilidade celular*

As células em monocamada aderente foram cultivadas em placas de 24 poços (2×10^4 células/poço) tratadas com PDL/laminina. Após os tratamentos as células foram incubadas com $25 \mu\text{g/mL}$ de resazurina por 2 h a 37°C . A solução não-fluorescente de resazurina é reduzida por desidrogenases celulares à resorufina, altamente fluorescente. Esta conversão ocorre somente em células viáveis, portanto a resorufina formada é proporcional ao número de células viáveis na amostra (Riss et al., 2004). A fluorescência foi mensurada em leitora de placas Infinite 200 PRO (Tecan), (Ex = 530 nm, Em = 590 nm).

6.1.9. *Análise da proliferação e do ciclo celular*

As células em monocamada aderente foram cultivadas em placas de 24 poços (2×10^4 células/poço) contendo lamínulas tratadas com PDL/laminina onde foram realizados os tratamentos. Primeiramente, a proliferação celular foi avaliada pela incorporação de BrdU. Após o período de tratamento, ao meio de cultura foi adicionado $10 \mu\text{M}$ de BrdU e as células foram incubadas por 2 h a $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 5 %, lavadas e fixadas em PFA 4%.

O EdU, análogo do BrdU, também é incorporado por células em proliferação e pode ser detectado posteriormente por reação de cicloadição alcalina catalisada por cobre (reação *Click*), sem necessidade de desnaturação do DNA.

Assim, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (9×10^4 células/poço) e após os tratamentos, as células foram incubadas com EdU ($10 \mu\text{M}$) por 2 h a $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 5 %, tratadas com Accutase, coletadas em PBS contendo BSA 1%, centrifugadas a $300 \times g$ por 3 min e fixadas com solução fixativa, fornecida pelo conjunto de reação *Click-iT*, por 15 min. Após, as células foram lavadas em PBS/BSA 1 % e centrifugadas 3 min a $300 \times g$, permeabilizadas em solução de lavagem/permeabilização a base de saponina e incubadas por 15 min a 4°C . As células foram então incubadas por 30 min à temperatura ambiente com o coquetel de reação *Click-iT* preparado de acordo com as indicações do fabricante. As células foram centrifugadas por 5 min a $300 \times g$, lavadas na solução de saponina e centrifugadas por 3 min a $300 \times g$. Após 10

min de incubação com DAPI (1:5000 em solução de saponina), as células foram centrifugadas por 3 min a 300 x g e lavadas em solução de saponina. Em seguida, foram ressuspensas no mesmo tampão e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences). A incorporação do EdU indica quais células estão na fase de replicação do material cromossômico (S), enquanto a marcação nuclear permite verificar a ploidia (fases G1/Go ou G2/M).

Com o objetivo de estimar a duração relativa do ciclo celular e confirmar os dados de proliferação, as células foram marcadas com CFSE no momento da semeadura, antes dos tratamentos. Os resíduos diacetato da sonda CFSE permitem sua livre difusão pela membrana plasmática. As esterases intracelulares clivam os grupamentos acetato tornando o composto fluorescente não permeável à membrana, prendendo o CFSE dentro da célula. Os grupamentos succinimidil éster do CFSE se ligam irreversivelmente a aminas disponíveis (normalmente lisina) de proteínas citoplasmáticas e de membrana. À medida que a célula se divide, suas proteínas marcadas são divididas igualmente entre as duas células-filhas. Cada célula-filha possui metade da fluorescência da geração anterior, que pode ser medida por citometria de fluxo.

As células foram coletadas em meio Neurobasal, contadas, centrifugadas e 1×10^6 células foram incubadas com $10 \mu\text{M}$ de CFSE em 1 mL de PBS/BSA 1% por 10 min a 37°C . A reação foi finalizada pela incubação com meio de cultura a 4°C por 5 min. Logo após, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio. Foram separadas duas alíquotas: 2×10^4 células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS, fixadas em PFA 2% 20 min à temperatura ambiente, lavadas, centrifugadas e armazenadas a 4°C (T0). O restante das células foi ressuspensão em meio e plaqueado para os tratamentos em placas de 6 poços (9×10^4 células/poço). Após o período de tratamento (total de 96 h), as células foram lavadas, tratadas com acutase, coletadas em meio, centrifugadas, ressuspensas em PBS e fixadas em PFA 2%, 20 min à temperatura ambiente. Após centrifugação foram ressuspensas em PBS e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences).

6.1.10. *Determinação da expressão gênica (qRT-PCR)*

O RNA total foi extraído utilizando o kit Qiagen RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). As culturas de células em monocamada aderente foram lavadas com PBS e coletadas em tampão de lise RLT. O lisado foi coletado e processado conforme indicações do fabricante,

incluindo o passo opcional de adição de DNase. A concentração e pureza do RNA foram analisadas em espectrofotômetro Nano Drop 1000 (Thermo Scientific). A transcrição reversa foi realizada com, 1 µg de RNA. O cDNA foi preparado usando kit SuperScript II (Invitrogen) a partir de oligo (dT) iniciadores seguindo o protocolo do fabricante. Uma reação sem enzima foi adicionada como controle de qualidade para a contaminação com DNA genômico. A reação em cadeia da transcriptase-polimerase reversa quantitativa (qRT-PCR) para os genes LRP1, LDLR, CYP27A1, CYP43A1, FDFT1 e HMGCR foi realizada usando o SYBR Green PCR Mix (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. Cada reação foi realizada com 0.1 µg de RNA total. A ciclização e detecção de fluorescência foi realizada em sistema de detecção CFX96 Real Time PCR (Bio-Rad, California, USA). A expressão foi quantificada pelo método $\Delta\Delta C_t$ após normalização pelo gene constitutivo da proteína de ligação TATA box (TBP). As sequências iniciadoras utilizadas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Sequências de iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR

| <i>Gene</i> | <i>Sequência forward/ reverse</i> |
|----------------|--|
| <i>LDLR</i> | GGAGCAGCCACATGGTATGA ATGTTCTTCAGCCGCCAGTT |
| <i>LRP1</i> | TTCTCCTGCTGCTTCTGGTG TCGGGCTCTCCACCTTCATA |
| <i>CYP27A1</i> | GGGTATCTGGCTACCTGCAC CTCCTGGATCTCTGGGCTCT |
| <i>CYP46A1</i> | GGTGGATGAGGTTGTCGGTT TCAAGGTCTCCTCCTCCAGC |
| <i>HMGCR</i> | AAGCCAGTGGTCCCACAAAT TTGCATGCTCCTTGAACACC |
| <i>FDFT1</i> | AACATGCCTGCCGTCAAAG GGAGTAGTGGCTTCGGGAGA |
| <i>TBP</i> | CCAGAACAACAGCCTTCCAC GGAGTAAGTCCTGTGCCGT |

6.1.11.

Análise de microarranjos de DNA

A tecnologia de microarrays (ou microarranjos de DNA) consiste na utilização de um *slide* (lâmina ou microarranjo) no qual as sondas, *probes* (amostras de DNA) foram imobilizadas em quantidades e posições precisamente definidas (*spots*), para se fazer a hibridização

com um *pool* de RNAm extraído de amostras biológicas (*targets*), que foram previamente marcados com fluoróforos (marcadores fluorescentes) (Chaudhuri, 2005; Walsh e Henderson, 2004).

O RNA total de cada um dos tratamentos (salina x LDL 100 µg/mL e siRNA controle x LDLr siRNA, 3 replicatas biológicas independentes), a partir de 2 poços de placas de 6 poços (9×10^4 células/poço) foi extraído com o RNeasy Mini kit (Qiagen). A quantificação e análise da integridade do RNA foi avaliada espectrofotometricamente (Nanodrop, Thermo Scientific, USA) e a qualidade das amostras verificada em bioanalisador Agilent RNA 6000 Nano kit (o número de integridade do RNA foi maior que 9 em todas as amostras). A síntese do cDNA, cRNA e marcação do cRNA foi realizada com *Agilent One-Colour Microarray-Based Gene Expression Analysis 6.5 (Low Input Quick Amp Labeling)*, de acordo com as instruções do fabricante (Agilent Technologies, Böblingen, Alemanha). O cRNA foi marcado com o fluorocromo cianina 3 (Cy3) e foi hibridizado com os as lâminas de *microarray* (SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray Kit) no equipamento *DNA Microarrays Hybridisation Oven* (Agilent Technologies) e as lâminas foram escaneadas com *Agilent DNA Microarray Scanner* (Agilent Technologies), de acordo com as indicações do fabricante.

Análise dos dados: A intensidade de fluorescência de cada *spot* das lâminas foi extraída usando o programa *Agilent Feature Extraction*. Após a remoção do *background*, os dados brutos da fluorescência de Cy3 dos tratamentos e os respectivos controles foram submetidos às análises descritivas por agrupamento hierárquico, análise de componente principal (PCA, *principal component analysis*) e normalizados pelo método Loess cíclico no programa *R/bioconductor* (pacote de análises *limma*). As diferenças nos níveis de expressão gênica (FC, *fold change*) foram calculadas usando a média dos valores para cada tratamento e a média dos respectivos controles. Genes com expressão significativamente diferente foram identificados por teste t modificado e FDR 10% (*false discovery rate*) e separados em regulados positivamente ou regulados negativamente (aumento ou diminuição de 1,5 vezes na expressão, respectivamente; $|\log_{2}FC| \geq 0,58496$). Os dados completos desta análise serão submetidos à plataforma colaborativa *Gene Expression Omnibus (GEO)*.

Genes com valores de ($|\log_{2}FC| \geq 0,58496$) foram considerados na análise de enriquecimento gênico e associação biológica, realizada na

plataforma *Gene Ontology Enrichment Analysis and visualization tool* (cbl-gorilla.cs.technion.ac.il).

6.1.12. *Análise de gotículas lipídicas e colesterol intracelular*

A fim de visualizar o armazenamento de colesterol em gotículas lipídicas (*lipid droplets*) as células em monocamada aderente foram cultivadas em placas de 24 poços (2×10^4 células/poço) contendo lamínulas tratadas com PDL/laminina onde foram realizados os tratamentos. As células foram fixadas com PFA 4 % em temperatura ambiente por 10 min, lavadas com PBS e incubadas com uma solução de LD540 0,1 $\mu\text{g/mL}$ por 15 min à temperatura ambiente (Spandl et al., 2009). Em seguida o núcleo foi marcado com Hoechst e as lamínulas lavadas com PBS e montadas em meio livre de glicerol (DAKO). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de fluorescência Zeiss - Axio Observer.Z1 (Ex = 530 nm).

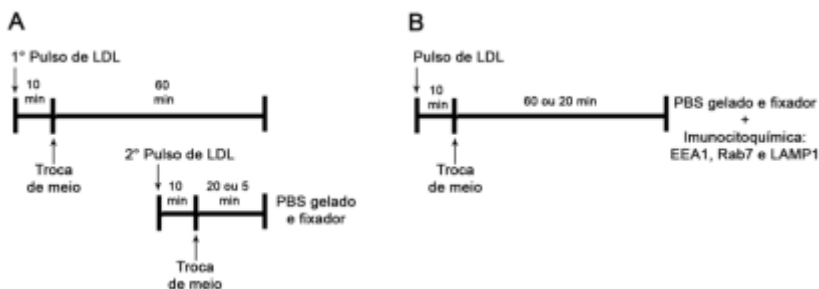
Além disso, o colesterol intracelular foi quantificado pela marcação com a sonda de colesterol filipina (Muller et al., 1984). Após os tratamentos as células foram lavadas e incubadas com filipina 50 $\mu\text{g/mL}$ por 30 min a 37 °C. As células foram lavadas, as lâminas montadas e as imagens adquiridas em microscópio confocal de fluorescência Zeiss - Axio Observer.Z1 (Ex = 350 nm). A quantificação da fluorescência total corrigida de cada célula foi realizada utilizando o *software* Image J.

6.1.13. *Captação e transporte intracelular de LDL*

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, (2×10^4 células/poço), contendo lamínulas previamente tratadas com PDL/laminina. Após os tratamentos as células foram lavadas 2 vezes com meio neurobasal a 37 °C e incubadas por 45 min a 37 °C/CO₂ 5 %. O primeiro pulso (60 min antes da fixação das células) foi de LDL marcada com o fluoróforo Bodipy (10 $\mu\text{g/mL}$). A LDL-Bodipy foi adicionada a cada poço, e após 10 min os poços foram lavados 2 vezes com meio e incubados a 37 °C/CO₂ 5 % até o segundo pulso de LDL marcada. A LDL marcada com o fluoróforo Dil (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) foi adicionada (10 $\mu\text{g/mL}$) aos poços e após 10 min os poços foram lavados 2 vezes com meio e incubados a 37 °C/CO₂ 5 % até o fim do tempo requerido (20 ou 5 min antes da fixação). No minuto 0 as células foram lavadas com PBS

gelado e fixadas em PFA 4 % por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida o núcleo foi marcado com Hoechst (Figura 22A) ou procedeu-se imunocitoquímica para marcadores dos compartimentos intracelulares envolvidos no transporte da LDL (EEA1, Rab7 e LAMP1; Figura 22B). Em seguida, as laminulas foram montadas em meio livre de glicerol (DAKO). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de fluorescência Zeiss - Axio Observer.Z1.

Figura 22. Protocolo experimental dos pulsos de LDL marcada com fluoróforos



(A) Pulso com dois fluoróforos (um 60 min e outro 20 min antes da fixação ou 60 min e 5 min antes da fixação) para avaliação de colocalização. (B) Único pulso (60 ou 20 min antes da fixação), para avaliação da distribuição da LDL nos compartimentos celulares de transporte.

6.1.14. *Respirometria de alta resolução*

As células foram plaqueadas em microplacas Seahorse XF96 de 96 poços (5×10^3 células/poço), previamente tratadas com PDL/laminina, onde os tratamentos foram realizados. A fim de analisar o efeito dos tratamentos sobre a bioenergética celular: fosforilação oxidativa e glicólise, foram realizados dois ensaios com os kits analíticos *XP Cell Mito Stress Test* e *XP Glycolysis Stress Test* respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. OCR (taxa de consumo de oxigênio) e ECAR (taxa de acidificação do meio extracelular, indicativo do fluxo de prótons durante a glicólise) foram mensuradas em analisador de fluxo extracelular Seahorse XF96 (Seahorse, Bioscience). Os dados foram normalizados pelo número total de células/poço (coloração com Hoechst) e analisados usando *Wave2.0 software* (Seahorse Bioscience). Cada tratamento representa 8 poços em cada experimento, que foi realizado em duas replicatas (passagens celulares diferentes).

Teste de estresse mitocondrial: Ao final dos tratamentos, 1 h antes dos testes, o meio de cultura foi substituído pelo meio de ensaio, XF Base Medium (Seahorse Bioscience), suplementado com 1 mM de piruvato, 2 mM de glutamina, e 10 mM de glicose e as células foram ambientadas por 1h em incubadora sem CO₂ a 37 °C. Este teste consistiu na modulação de alvos da cadeia transportadora de elétrons (CTE) mitocondrial para a observação de parâmetros metabólicos (Figura 23). Os compostos oligomicina, FCCP (carbonil cianeto trifluoro-metoxi fenilhidrazona), e uma mistura de antimicina A e rotenona foram sucessivamente injetados para medir a produção de ATP, respiração máxima, e respiração não mitocondrial, respectivamente. O vazamento de prótons (próton *leak*) e a capacidade respiratória de reserva foram calculados a partir destes parâmetros e da respiração basal. A oligomicina inibe a ATP sintase (complexo V), portanto uma diminuição na OCR após a injeção de oligomicina se correlaciona à respiração mitocondrial associada à produção de ATP. O FCCP é um agente desacoplador que colapsa o gradiente de prótons e desfaz potencial de membrana mitocondrial. Como resultado o fluxo de elétrons pela CTE é desinibido e o oxigênio é maximamente consumido pelo complexo V. A OCR estimulada pela injeção de FCCP é um indicativo da capacidade respiratória máxima, traduzida pela diferença entre esta respiração máxima e a respiração basal. A capacidade respiratória de reserva é a medida da habilidade da célula em responder a uma demanda energética aumentada. A terceira injeção, rotenona + antimicina A, inibe o complexo I e III, respectivamente. Esta combinação anula a respiração mitocondrial e permite a estimativa da respiração não mitocondrial. As concentrações dos compostos nos poços foram: 1 µM de oligomicina, 1 µM de FCCP e 0,5 µM de rotenona + 1 µM de antimicina A, em 175 µL de volume inicial de reação.

Teste de estresse glicolítico: Ao final dos tratamentos, 1 h antes dos testes, o meio de cultura foi substituído pelo meio de ensaio, XF Base Medium (Seahorse Bioscience), suplementado com 2 mM de glutamina (sem glicose e sem piruvato) e as células foram ambientadas por 1h em incubadora sem CO₂ a 37 °C. Primeiramente a ECAR foi mensurada com as células neste meio sem glicose e piruvato. A primeira injeção consistiu em uma concentração saturada de glicose. As células catabolizam esta glicose a piruvato, ATP, NADH, água e prótons, pela via glicolítica (Figura 23). A saída destes prótons causa um rápido aumento da ECAR. Esta resposta induzida pela injeção de glicose é a

6.1.15. *Determinação da geração de espécies reativas*

A produção intracelular de ER foi detectada pela incubação com a sonda CellROX®. Esta sonda não é fluorescente no estado reduzido, no entanto, quando oxidada por ER sua fluorescência pode ser mensurada (Abs/Em: 644/665 nm). As células foram plaqueadas em placas de 6 poços (9×10^4 células/poço), previamente tratadas com PDL/laminina. Após os tratamentos as células foram incubadas com CellROX® (5 μ M, em meio de cultura) por 30 min. Após a incubação as células foram lavadas com PBS, tratadas com Accutase e centrifugadas, ressuspensas em PBS e sua fluorescência mensurada em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences).

6.1.16. *Análise estatística*

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se uma análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey; ou teste *t* de Student e estão também descritas nas legendas das respectivas figuras. O nível de significância adotado para todos os experimentos foi $p < 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica® ou RStudio e as figuras representativas elaboradas no programa GraphPad Prism. As análises estatísticas referentes aos dados da análise *microarray* foram descritas anteriormente. O programa Imaje J foi utilizado nas contagens de células relativas à marcação por Hoechst.

6.2. Resultados

Este é o primeiro estudo que avalia aspectos relacionados ao metabolismo do colesterol em CPNs do hipocampo de camundongos adultos. Portanto, a primeira análise *in vitro* teve como objetivo identificar se as CPNs obtidas do GD de camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade, de fato, expressam o RNAm de algumas proteínas-chave da síntese, captação ou metabolização do colesterol. Foi mensurada a expressão do RNAm dos seguintes genes codificadores das respectivas proteínas: HMGCR, que se traduz na enzima HMG-CoA redutase; FDFT1, esqualeno sintase; LDLR, receptor de LDL, LRP1, receptor LRP1; CYP46A1, colesterol 24-hidroxilase; e CYP27A1, esterol 27-hidroxilase.

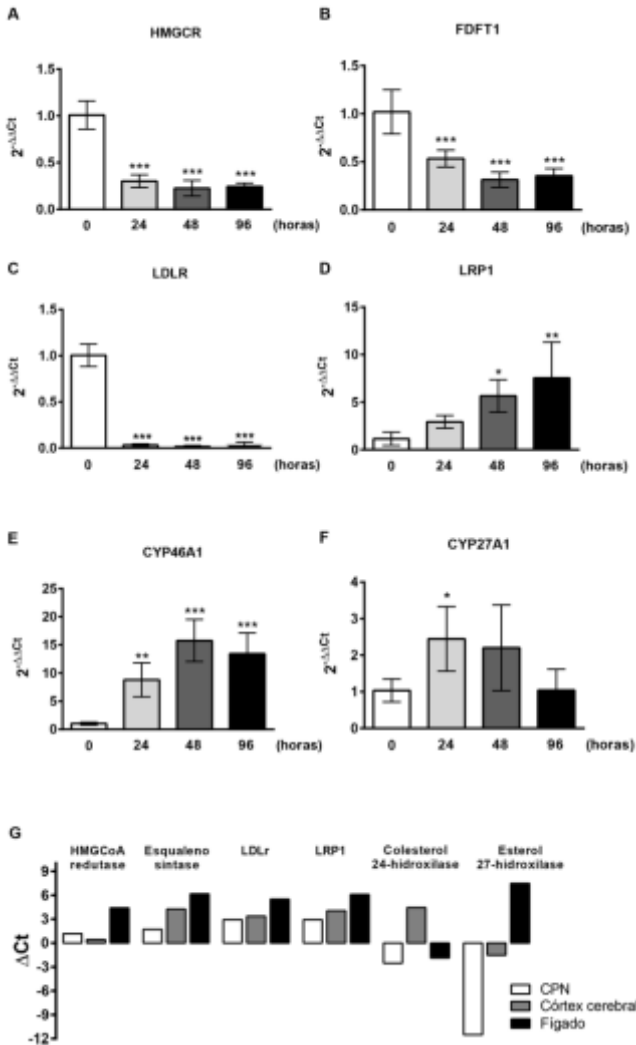
Como demonstrado na Figura 24A e B houve uma redução na expressão gênica das enzimas de síntese de colesterol, HMG-CoA redutase e esqualeno sintase, a partir da indução da diferenciação celular [$F(3, 16) = 79,51, p \leq 0,001$] e [$F(3, 16) = 29,06, p \leq 0,001$] a análise *post hoc* revelou diferença significativa na expressão já 24 h após a depleção de FTs, em relação às células em condições proliferativas ($p \leq 0,001$). Da mesma forma, o receptor de LDL foi significativamente mais expresso durante a fase proliferativa [$F(3, 16) = 302,3, p \leq 0,001$] sendo que sua expressão gênica sofreu uma redução de mais de 90 % em 24 h de diferenciação ($p \leq 0,001$; Figura 24C). Por outro lado, os níveis de RNAm do receptor LRP1 aumentaram com a diferenciação celular [$F(3, 16) = 8,88, p \leq 0,01$], e uma diferença significativa em relação à fase proliferativa foi observada em 48 h após a depleção de FTs ($p < 0,05$; Figura 24D). Os níveis de RNAm das enzimas colesterol 24-hidroxilase e esterol 27-hidroxilase aumentaram com a diferenciação celular [$F(3, 16) = 22,87, p \leq 0,001$ e $F(3, 16) = 4,34, p < 0,05$]. Uma diferença significativa pôde ser observada em 24 h de diferenciação ($p \leq 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente; Figura 24E e F). A Figura 24G exibe um comparativo entre a expressão absoluta de RNAm em células proliferativas *vs.* amostras de tecido cerebral e hepático de camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade. Como esperado, a expressão das enzimas de síntese, e dos receptores de captação, de colesterol foi maior no tecido hepático. E, enquanto a expressão gênica da enzima colesterol 24-hidroxilase predomina no tecido cerebral, a de esterol 27-hidroxilase foi detectada em maior quantidade em amostra de tecido hepático. Não

foram realizados testes estatísticos ($n = 2$).

Considerando que as CPNs expressam o LDLr e possuem minimamente uma maquinaria de metabolismo do colesterol; o próximo passo foi investigar o efeito dos dois principais fenótipos moleculares e bioquímicos da HF, a ineficiência do LDLr e a exposição a níveis elevados de colesterol, sobre a proliferação e sobrevivência das CPNs in vitro (Figura 25). Após 24 h de exposição à LDL plasmática humana isolada, não foi observada redução significativa na viabilidade das células proliferativas [$F(4, 10) = 2,27, p = 0,13$]. No entanto, após 48 h de tratamento, o ensaio de incorporação de BrdU revelou uma redução na proliferação celular [$F(4, 10) = 29,94, p \leq 0,001$], evidenciada por um número significativamente menor de células BrdU positivas a partir da concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, quando comparadas às células controle tratadas com veículo ($p \leq 0,01$, *post hoc* de Duncan; Figura 25B e C). Por outro lado, o 27-hidroxicolesterol não afetou a capacidade proliferativa das células [$F(3, 4) = 1,89, p = 0,27$], mas foi citotóxico no ensaio da resazurina [$F(3, 8) = 14,19, p \leq 0,01$], diminuindo a viabilidade celular a partir da concentração de 5 μM ($p < 0,05$; Figura 25D-F).

A fim de mimetizar a ineficiência na função do LDLr observada em portadores de HF e no modelo de camundongos LDLr^{-/-}, a expressão do gene *LDLR* foi reduzida pela transfecção de um siRNA. Após 48 h de transfecção houve uma redução significativa de cerca de 70% nos níveis de RNA do LDLr ($t = 20,79, df = 4, p \leq 0,001$; Figura 25G). A diminuição da expressão gênica do LDLr não afetou a viabilidade celular das células proliferativas [$F(2, 6) = 1,03, p = 0,41$]. No entanto, houve um efeito significativo na capacidade proliferativa, ($t = 17,29, df = 4, p \leq 0,001$; Figura 25I e J).

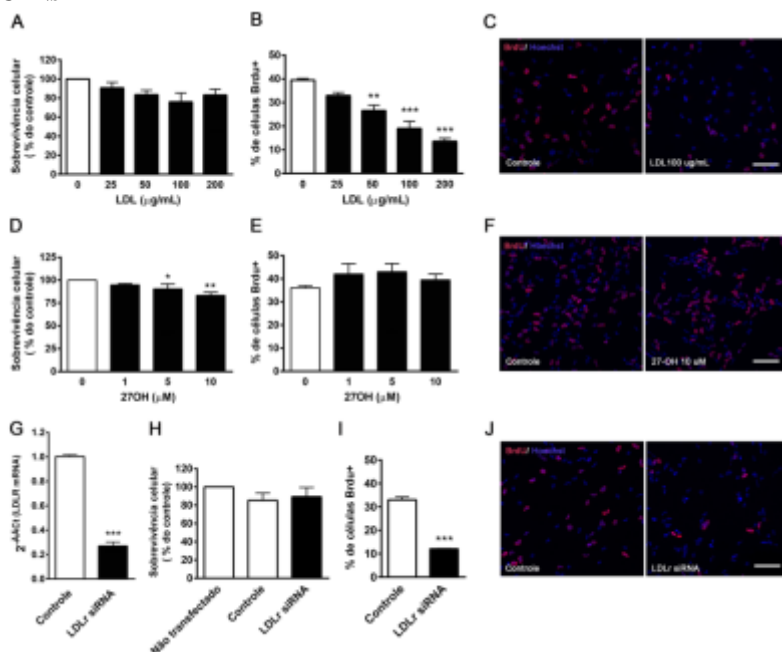
Figura 24. Expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo do colesterol



Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média ($n=5$ para A-F e $n=2$ para G). Os resultados foram normalizados pelos níveis de RNAm de TBP e estão expressos como expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ou expressão absoluta ΔCt . Os resultados deste experimento (A-F) foram analisados por ANOVA de uma via

seguido de análise post hoc de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ vs. células em condições proliferativas, tempo = 0 h.

Figura 25. Efeito do tratamento in vitro com LDL, 27-OH e do silenciamento da expressão do LDLr sobre a viabilidade e proliferação de CPNs



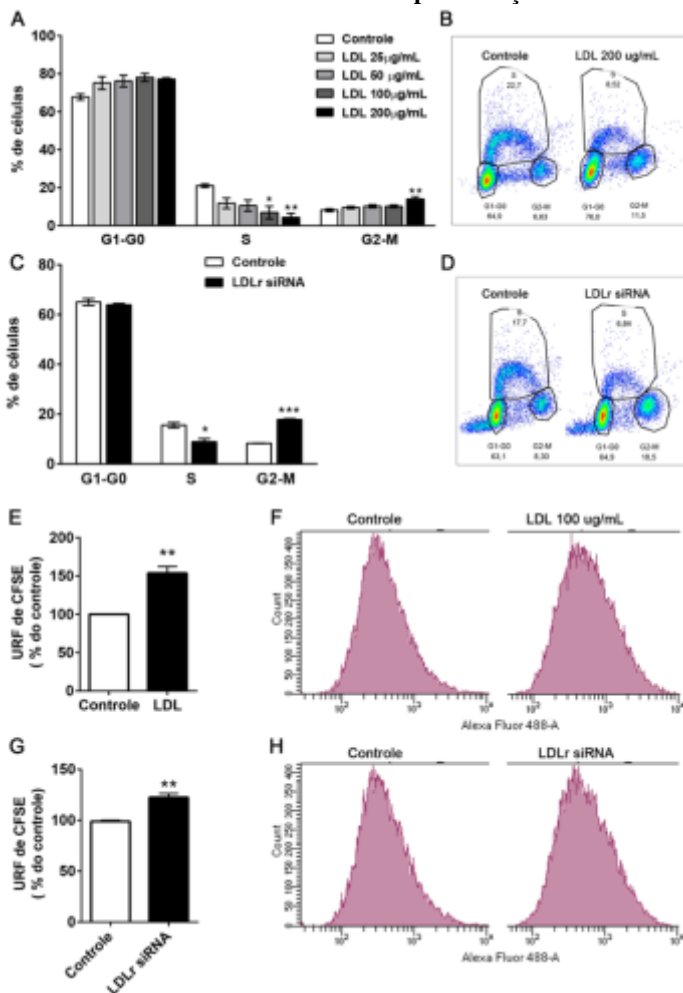
(A, D e H) Viabilidade celular, ensaio da resazurina 24 h após os tratamentos. (B, E e I) quantificação das células BrdU positivas, incorporação 48h após os tratamentos. (C, F e J) Imagens representativas da imunomarcagem de BrdU (vermelho) e marcação nuclear por Hoechst (azul), barra de escala 50 μ m. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (n = 2-4). Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido de análise *post hoc* de Tukey ou teste t. * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ vs. células controle.

Visto que o tratamento com LDL e o silenciamento gênico do LDLr reduziram a proliferação celular, em seguida foi avaliado se estas abordagens alteram as fases do ciclo celular e sua duração. Para o ensaio de incorporação do EdU após o tratamento com LDL, a análise de ANOVA de uma via não revelou alteração significativa na proporção de células na fase G_1/G_0 [F (4, 10) = 3,08, $p = 0,07$]. No entanto, a LDL induziu uma redução na proporção de células nas fases S e G_2/M do

ciclo celular [$F(4, 10) = 6,30, p \leq 0,01$] e [$F(4, 10) = 6,44, p \leq 0,01$], respectivamente. A análise *post hoc* mostrou que a LDL na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu significativamente a porcentagem de células em divisão, enquanto apenas na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ foi observado um aumento em G_2/M ($p < 0,05$ e $p \leq 0,01$; Figura 26A). O ensaio de extinção do CFSE confirmou o efeito da LDL em reduzir a proliferação celular, visto que as células mantiveram uma maior fluorescência ao final do período de tratamento, ou seja, foi gerado um menor número de células-filhas ($t = 6,14, df=4, p \leq 0,01$; Figura 26E). O silenciamento do LDLr também reduziu a proporção de células na fase S e aumentou na fase G_2/M ($t = 4,12, df=4, p < 0,05$ e $t = 27,94, df=4, p \leq 0,001$; Figura 26C), sem alterar a proporção de células em G_1/G_0 ($t = 0,74, df=4, p = 0,5$). Corroborando este resultado, a extinção da fluorescência de CFSE também foi menor nas células tratadas com LDLr siRNA ($t = 5,98, df=4, p \leq 0,01$; Figura 26G).

Na sequência, as células isoladas do GD de camundongos foram cultivadas na presença de LDL (25- 200 $\mu\text{g/mL}$), em meio de cultivo para formação de neuroesferas. Assim como nas células em monocamada aderente, a capacidade proliferativa das CPNs foi alterada pelo tratamento com LDL, resultando em um menor número de neuroesferas [$F(4, 15) = 6,44, p \leq 0,01$]. Após 12 dias de incubação o número de neuroesferas foi significativamente menor na presença de LDL ($p \leq 0,01$; Figura 27A). Após quantificadas, as neuroesferas foram cultivadas por 7 sete dias adicionais em condições de indução de diferenciação celular, ou seja, sem a presença de FTs. A marcação imunocitoquímica mostrou que a LDL reduziu a diferenciação das CPNs para a linhagem neuronal, conforme evidenciado pelo menor número de células positivas para o marcador neuronal β III- tubulina (Figura 27C; análise de regressão linear $t = -3.57, df = 8, p \leq 0,01, r = -0,78$). Além disso, é possível observar uma alteração na morfologia das células GFAP-positivas com o aumento da concentração de LDL.

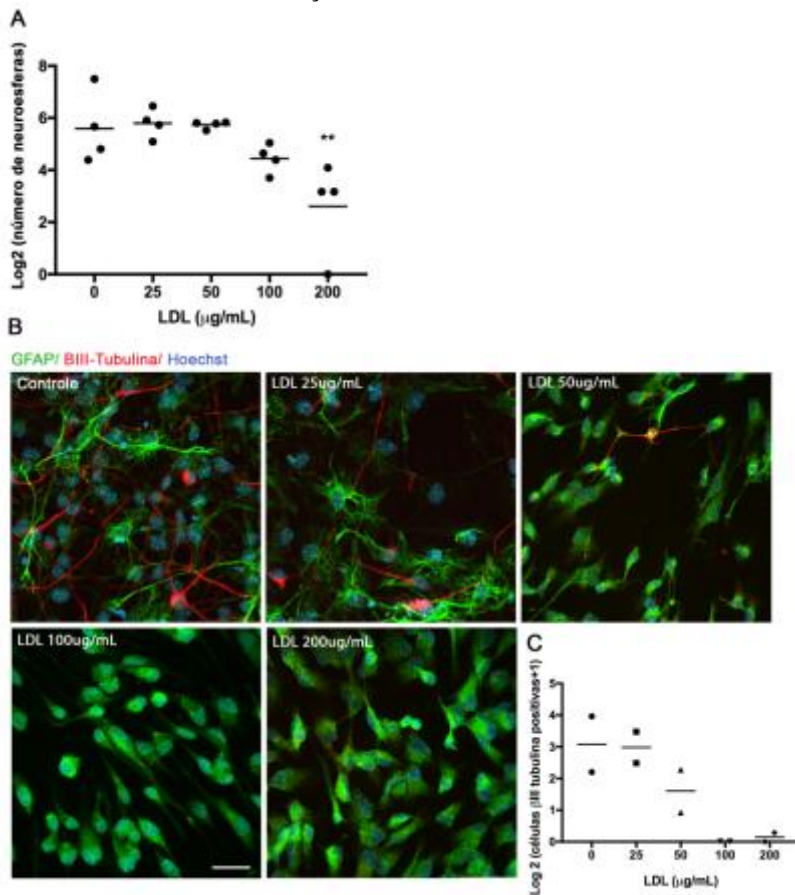
Figura 26. Efeito do tratamento in vitro com LDL e do silenciamento da expressão do LDLr sobre o ciclo celular e a proliferação de CPNs



(A-D) Ensaio de incorporação do EdU 48h após os tratamentos com LDL (25, 50, 100 e 200 µg/mL) e LDLr siRNA. (E-H) Ensaio de extinção da fluorescência de CFSE (LDL 100 µg/mL e LDLr siRNA). (B e D) Imagens representativas da separação das células de acordo com as fases do ciclo celular em citômetro de fluxo. (F e H) Imagens representativas da quantificação de fluorescência de CFSE por citometria de fluxo. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (n = 3). Os resultados foram analisados por

ANOVA de uma via seguido de análise *post hoc* de Tukey ou teste t. $*p < 0,05$, $**p \leq 0,01$ e $***p \leq 0,001$ vs. células controle.

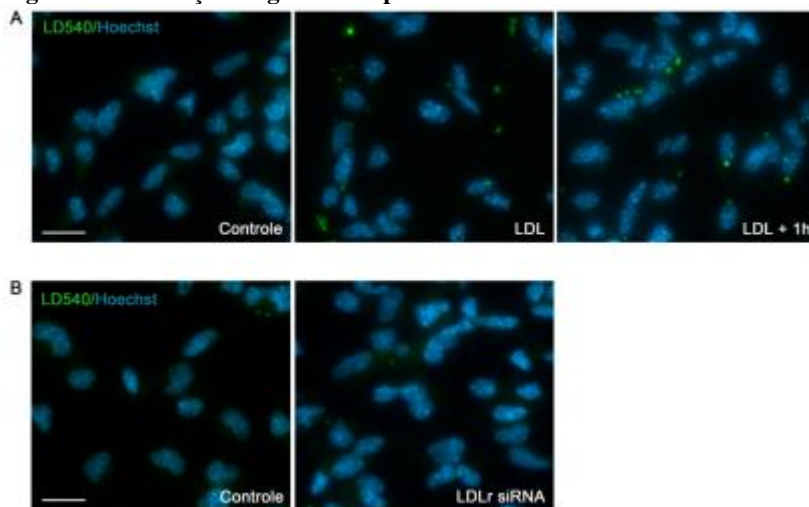
Figura 27. Efeito da incubação de CPNs com LDL na formação de neuroesferas e sua diferenciação



(A) Quantificação do número de neuroesferas após 12 dias de incubação com LDL, em condições proliferativas. (B) Imagens representativas da imunomarcagem para β III-tubulina (vermelho), GFAP (verde) e Hoeschst (azul) após 7 dias de incubação das neuroesferas em condições de diferenciação, barra de escala 20 μ m. (C) Quantificação do número de células positivas para β III-tubulina em relação ao número total de células marcadas com Hoeschst. $n = 2-4$. (A) Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido de análise *post hoc* de Tukey e (C) regressão linear. $**p \leq 0,01$ e vs. células controle tratadas com salina. Os valores foram transformados para fins de normalização dos dados.

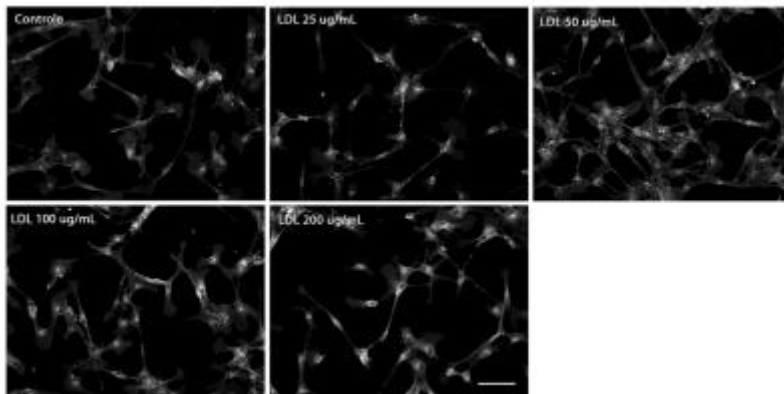
Com o objetivo de elucidar os mecanismos relacionados aos efeitos do tratamento com LDL e LDLr siRNA, as CPNs em monocamada foram incubadas com LD540, sonda que marca gotículas lipídicas, principal componente celular de armazenamento de colesterol intracelular. Neste ensaio, a presença de gotículas lipídicas somente pode ser observada nas células tratadas com LDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estas gotículas lipídicas foram observadas mesmo quando as células foram fixadas 1 h após a remoção do meio contendo a LDL, sugerindo o colesterol não está armazenado em vesículas transitórias, como endossomos e lisossomos (Figura 28A). A incubação com a sonda filipina confirma o aumento de colesterol intracelular nas células tratadas com LDL (25-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Figura 29). Nas células transfectadas com LDLr siRNA ou com a sequência controle, não foram observadas gotículas lipídicas (Figura 28B).

Figura 28. Marcação de gotículas lipídicas com a sonda fluorescente LD540



(A) Células tratadas com salina (controle) e LDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fixadas imediatamente (Controle e LDL) ou 1 h após a retirada do tratamento (LDL + 1 h). (B) Células tratadas com siRNA controle ou LDLr siRNA. Barra de escala 20 μm .

Figura 29. Detecção de colesterol intracelular com a sonda fluorescente filipina



(A) Imagens representativas das células tratadas com salina (controle) e LDL (25-100 µg/mL) fixadas e incubadas com filipina. Barra de escala 50 µm.

Sabendo da regulação exercida pelo colesterol sobre a expressão das proteínas relacionadas ao seu metabolismo, após os tratamentos com LDL (100 µg/mL) e LDLr siRNA, foram mensurados os níveis de RNAm de *HMGR*, *FDTF1*, *LDLR*, *LRP1*, *CYP46A1* e *CYP27A1* nas CPNs em monocamada. Como pode ser observado na Figura 30, a expressão gênica da HMG-CoA redutase foi reduzida pelo tratamento com LDL (100 µg/mL) ($t = 9,38$, $df = 4$, $p \leq 0,01$), e pelo silenciamento do *LDLR* ($t = 4,72$, $df = 4$, $p \leq 0,01$), da mesma forma, os tratamentos também reduziram os níveis de RNAm da esqualeno sintase ($t = 17,43$, $df = 4$, $p \leq 0,001$; $t = 8,10$, $df = 4$, $p \leq 0,01$). Como esperado, a expressão do *LDLR* foi reduzida pelo LDLr siRNA ($t = 7,45$, $df = 4$, $p \leq 0,01$), mas também sofreu redução pelo tratamento com LDL ($t = 11,80$, $df = 4$, $p \leq 0,001$); enquanto o RNAm do LRP1 foi reduzido pelo LDLr siRNA ($t = 4,50$, $df = 4$, $p > 0,05$), não houve alteração pelo tratamento com LDL ($t = 0,60$, $df = 4$, $p = 0,58$). Os níveis de RNAm da enzima colesterol 24-hidroxilase não foram alterados pelo tratamento com LDL ($t = 0,72$, $df = 4$, $p = 0,51$) ou LDLr siRNA ($t = 2,26$, $df = 4$, $p = 0,09$). Da mesma forma não houve diferenças significativas na expressão gênica da enzima esterol 27-hidroxilase ($t = 1,83$, $df = 4$, $p = 0,14$; $t = 0,18$, $df = 4$, $p = 0,87$).

Além da expressão de genes relacionados ao metabolismo do colesterol, uma análise global do transcriptoma foi realizada por

microarray. Após os tratamentos com LDL ou LDLr siRNA foi avaliada a expressão gênica diferencial em relação aos tratamentos controle, das CPNs, a partir de lâminas contendo 60000 sequências do genoma murino.

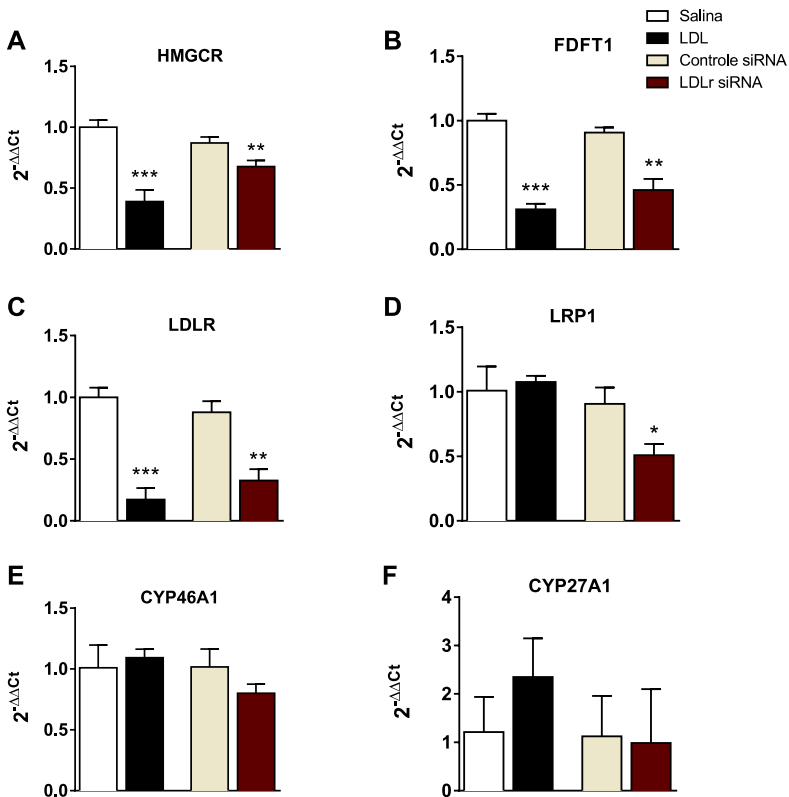
O tratamento com LDL 100 µg/mL resultou na expressão diferencial de 31 genes, sendo que, com base em um valor de $|\log_{2}FC| \geq 0$, 58496 como *cut-off*, 8 genes tiveram sua expressão aumentada (Apêndice C) e 23 foram reduzidos (Apêndice A). O silenciamento do *LDLR* alterou a expressão de 1975 genes, dos quais 414 foram considerados aumentados (Apêndice G) e 739 reduzidos (Apêndice E), em relação ao grupo transfectado com siRNA controle.

A análise de enriquecimento gênico e associação biológica foi realizada separadamente para genes que foram aumentados ou reduzidos por cada tratamento. Os genes que tiveram expressão aumentada após o tratamento com LDL estão associados a apenas um termo (Apêndice B), porém sem significância estatística. Os genes que foram regulados negativamente foram associados a 79 termos (Apêndice D), dos quais destacam-se: “biossíntese de colesterol”, “metabolismo de esteróis” e “regulação do metabolismo de esteróis”.

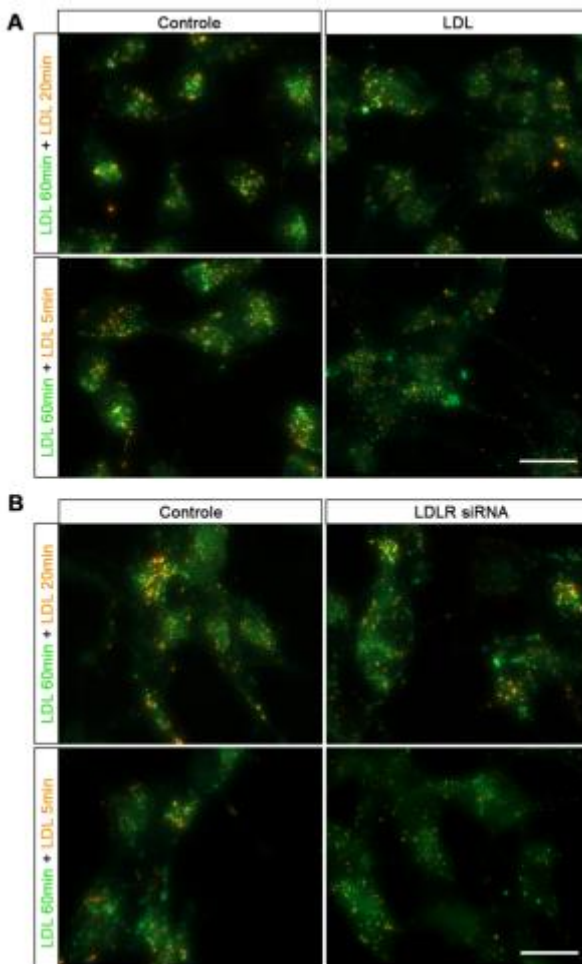
Os genes com expressão significativamente aumentada pelo silenciamento gênico do LDLr foram associados a 31 termos, mas sem valor estatístico significativo (Apêndice F). Os genes regulados negativamente foram associados a 103 termos significativos (Apêndice H), por exemplo “transporte”, “regulação de sinalização”, “regulação de transporte”.

A capacidade das CPNs de internalizar e transportar LDL após os tratamentos (LDL 100 µg/mL e LDLr siRNA), foi avaliada qualitativamente por meio da internalização de partículas de LDL marcadas com fluoróforos. Após os tratamentos as células receberam um pulso de LDL marcada com a sonda fluorescente Bodipy e cerca de 30 ou 45 min após, outro pulso com LDL marcada com a sonda Dil (60 min, para LDL-Bodipy, e 20 ou 5 min, para LDL-Dil, antes da fixação das células). A Figura 31 demonstra que os tratamentos não alteraram a captação e internalização da LDL marcada e não houve colocalização entre as sondas, indicando sua localização em diferentes compartimentos celulares.

Figura 30. Expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo do colesterol após o tratamento com LDL e do silenciamento gênico do LDLr



Os valores estão expressos em média + erro padrão da média ($n = 3$). Os resultados foram normalizados pelos níveis de RNAm de TBP e estão expressos como expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os resultados deste experimento foram analisados por teste t. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ vs. células controle tratadas com salina ou siRNA controle.

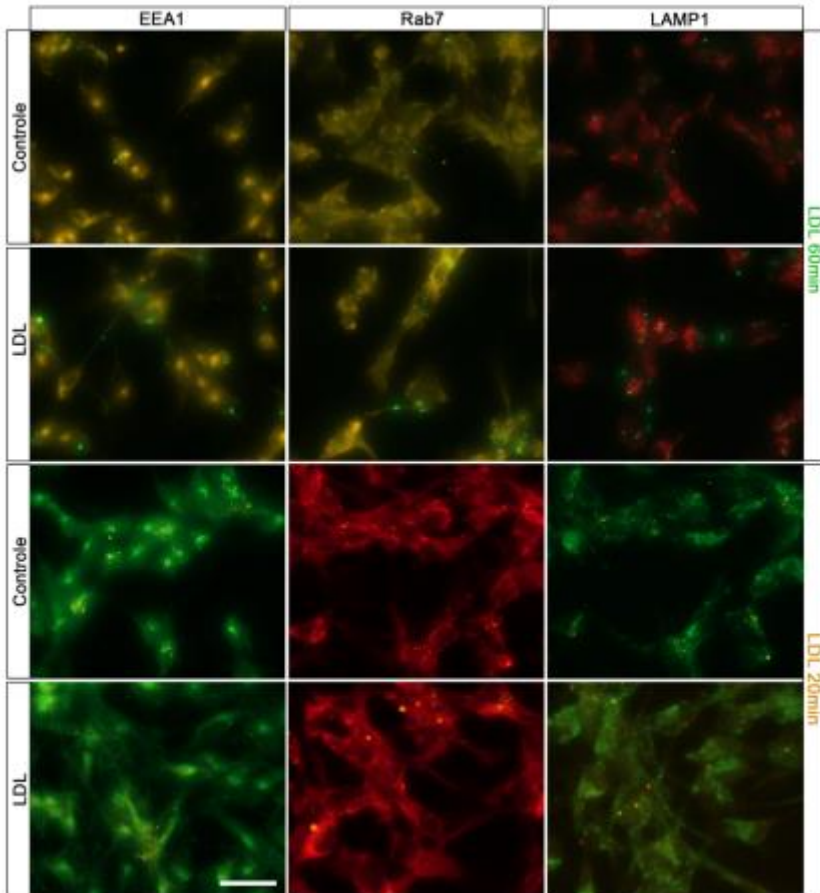
Figura 31. Internalização de LDL marcada com fluoróforos

(A) Células tratadas com salina ou LDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) receberam um primeiro pulso de LDL-Bodipy (verde) 60 min antes da fixação, e um segundo pulso, de LDL-Dil (laranja), 20 ou 5 min antes da fixação. (B) Células tratadas com siRNA controle ou LDLr siRNA receberam os mesmos pulsos de LDL marcada. Barra de escala 20 μm .

A distribuição da LDL marcada, entre os compartimentos intracelulares e a morfologia destas organelas, foi avaliada pela imunomarcagem das proteínas EAA1, Rab7 e LAMP1, que correspondem a endossomos primários, secundários e lisossomos,

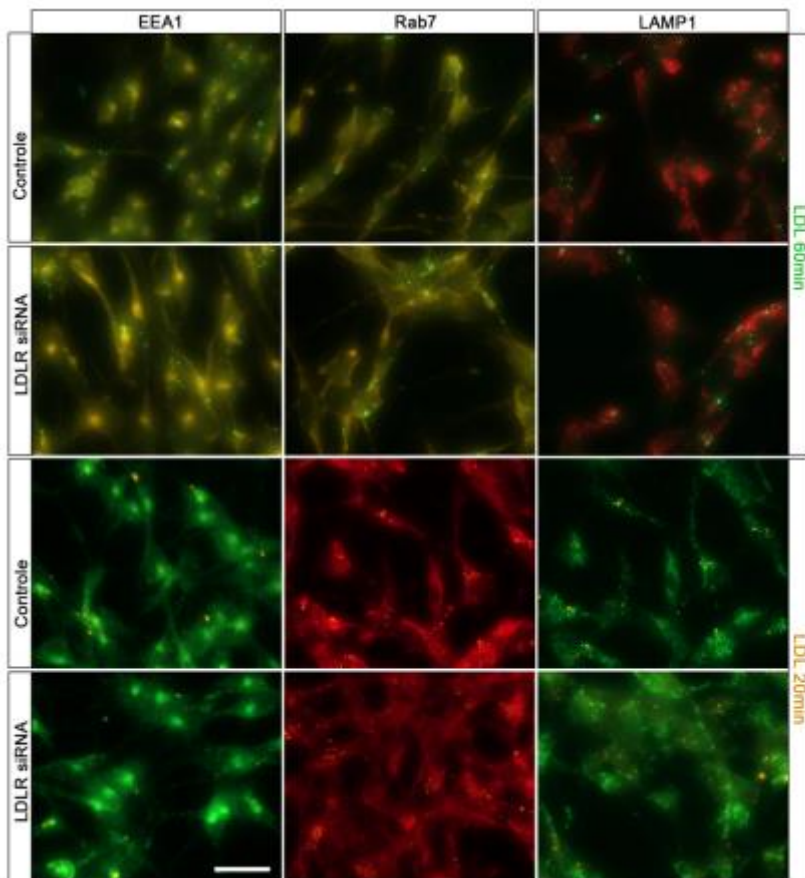
respectivamente. Após os tratamentos (LDL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e LDLr siRNA), não houve alteração evidente na organização intracelular dos compartimentos de transporte ou da dinâmica de distribuição de LDL marcada (pulsos de 60 ou 20 min) (Figura 32 e 33).

Figura 32. Efeito do tratamento com LDL na internalização e transporte intracelular de LDL



Imunomarcacão de compartimentos de transporte intracelular associado a pulsos de LDL marcada (60 ou 20 min) após o tratamento com LDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). EEA1- endossomos primários; Rab7 - endossomos secundários; LAMP1 - lisossomos. Barra de escala 20 μm .

Figura 33. Efeito do silenciamento do LDLr na internalização e transporte intracelular de LDL



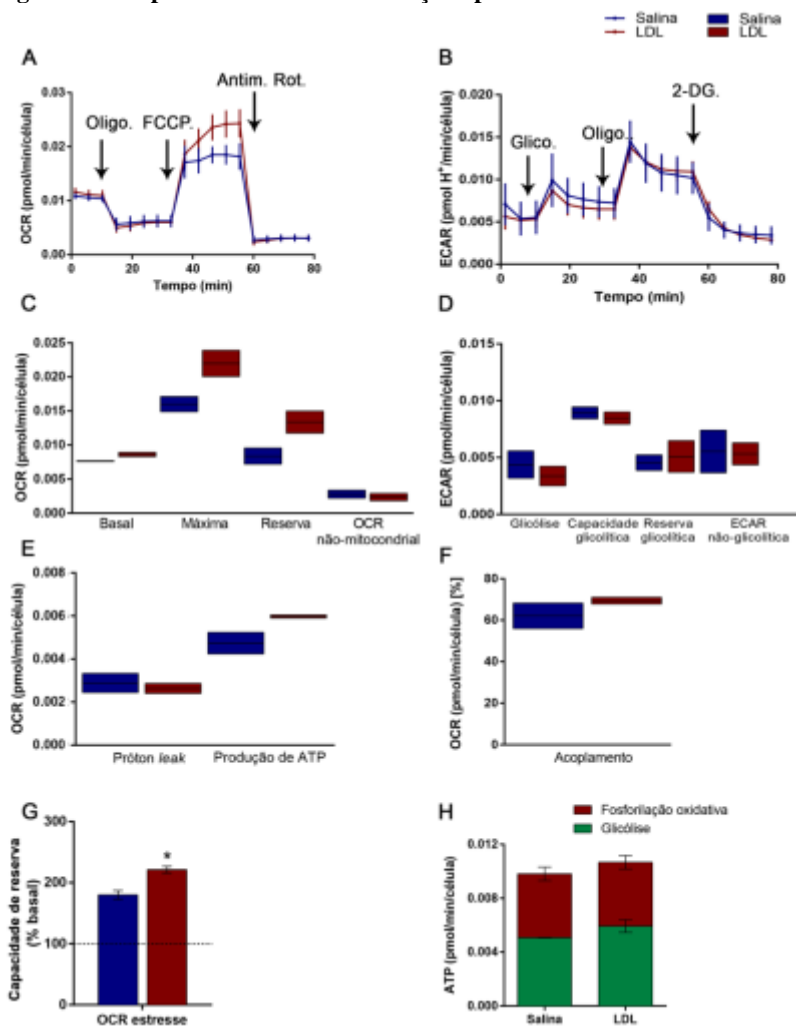
Imunomarcação para compartimentos de transporte intracelular associado a pulsos de LDL marcada (60 ou 20 min) após o tratamento com LDLr siRNA. EEA1- endossomos primários; Rab7 - endossomos secundários; LAMP1 – lisossomos. Barra de escala 20 μ m.

O metabolismo energético das CPNs também foi avaliado após os tratamentos com LDL e LDLr siRNA. Após 48 h na presença de LDL (100 μ g/mL), as células foram submetidas ao teste de estresse mitocondrial e teste de estresse glicolítico, que avaliam a taxa de

consumo de oxigênio (OCR) relacionada à fosforilação oxidativa, e a taxa de acidificação do meio extracelular (ECAR) relacionada à glicólise (Figura 34). O tratamento com LDL, quando comparado às células tratadas com salina, não alterou significativamente os valores absolutos de OCR basal, máxima, de reserva, não mitocondrial, próton *leak*, produção de ATP e acoplamento da CTE ($t = 3,2, p = 0,08$; $t = 2,7, p = 0,11$; $t = 2,5, p = 0,13$; $t = 0,54, p = 0,64$; $t = 0,50, p = 0,66$; $t = 2,45, p = 0,13$; $t = 1,16, p = 0,36$; $df = 2$, respectivamente; Figura 34C, D e E). No teste de estresse glicolítico também não houve alteração na ECAR relacionada à glicólise, à capacidade glicolítica, de reserva ou não glicolítica ($t = 0,68, p = 0,56$; $t = 0,62, p = 0,60$; $t = 0,35, p = 0,75$; $t = 0,10, p = 0,93$; $df = 2$, respectivamente; Figura 34F). No entanto, quando se calcula a capacidade de reserva relativa, ou seja, a porcentagem de aumento da OCR máxima em relação a OCR basal em resposta ao estresse induzido pela injeção de FCCP [(OCR máxima/OCR basal) *100], observou-se que a LDL induziu um aumento ($t = 4,56, p < 0,05, df = 2$; Figura 33G). A produção de ATP, vinculada a fosforilação oxidativa e à glicólise não foi alterada ($t = 0,61, p = 0,61$; $t = 1,84, p = 0,21$; $df = 2$; Figura 34H).

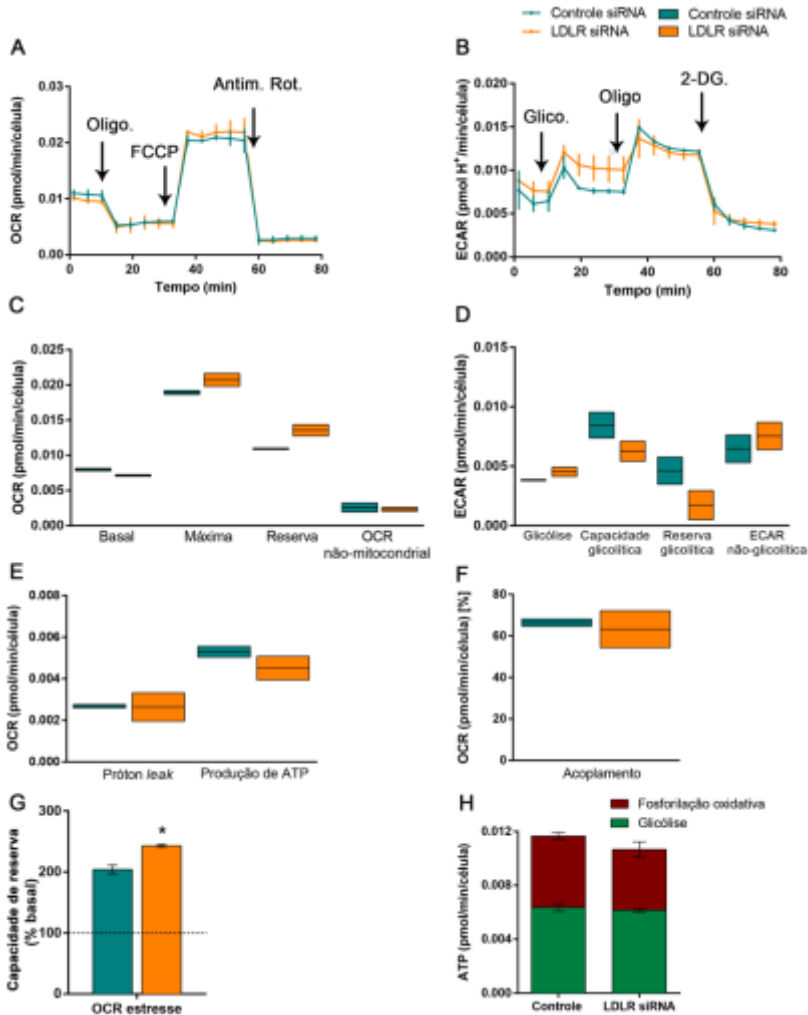
A resposta ao silenciamento gênico do LDLr ao teste de estresse mitocondrial e ao teste de estresse glicolítico está representada na Figura 34. O tratamento com siRNA, quando comparado às células transfectadas com siRNA controle, não alterou significativamente os valores absolutos de OCR basal, máxima, de reserva, não mitocondrial, próton *leak*, produção de ATP e acoplamento da CTE ($t = 3,82, p = 0,06$; $t = 1,87, p = 0,20$; $t = 3,24, p = 0,08$; $t = 0,38, p = 0,73$; $t = 0,05, p = 0,96$; $t = 1,26, p = 0,33$; $t = 1,16, p = 0,36$; $df = 2$; respectivamente; Figura 35C, D e E). No entanto o tratamento com LDLr siRNA induziu um aumento na OCR relacionada a capacidade de reserva relativa ($t = 5,05, p < 0,05, df = 2$; Figura 35G). No teste de estresse glicolítico também não houve alteração na ECAR relacionada à glicólise, à capacidade glicolítica, de reserva ou não glicolítica ($t = 1,81, p = 0,21$; $t = 1,60, p = 0,25$; $t = 1,73, p = 0,22$; $t = 0,66, p = 0,58$; $df = 2$; respectivamente; Figura 35F). A produção de ATP, vinculada à fosforilação oxidativa e à glicólise não foi alterada ($t = 1,26, p = 0,33$; $t = 0,61, p = 0,61$; $df = 2$; Figura 35H).

Figura 34. Respirometria de alta resolução após o tratamento com LDL



(A, C, E, F e G) Teste de estresse mitocondrial. (B e D) Teste de estresse glicolítico. (H) Produção de ATP associada a cada uma das vias metabólicas. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (n = 2). Os resultados deste experimento foram analisados por teste t. * $p < 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ vs. células controle tratadas com salina.

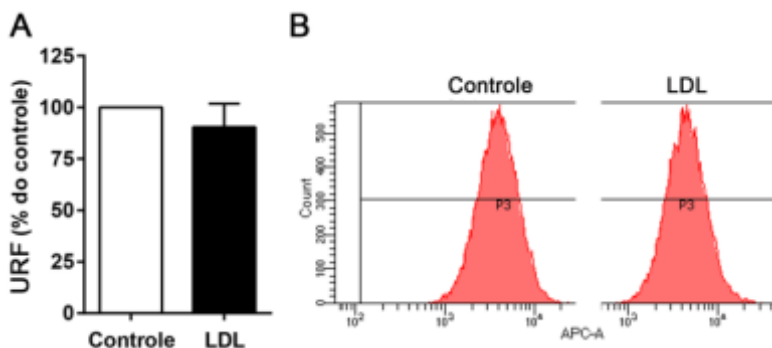
Figura 35. Respirometria de alta resolução após o tratamento com LDLr siRNA



(A, C, E, F e G) Teste de estresse mitocondrial. (B e D) Teste de estresse glicolítico. (H) Produção de ATP associada a cada uma das vias metabólicas. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 2$). Os resultados deste experimento foram analisados teste t. * $p < 0,05$ vs. células controle tratadas com siRNA controle.

A produção de ER foi mensurada nas células tratadas com LDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No entanto, não foi observada diferença nos níveis de ER após 48h de exposição à LDL ($t = 1,47$, $p = 0,22$, $df = 4$; Figura 36).

Figura 36. Análise da geração de espécies reativas após o tratamento com LDL



(A) Unidades relativas de fluorescência (URF) de *Cell Rox* (% em relação ao controle, células tratadas com salina). (B) Representação da área sob a curva da fluorescência de *Cell Rox* mensurada em citômetro de fluxo. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 3$). Os resultados deste experimento foram analisados por teste t.

6.3. Discussão

O nicho de células precursoras da SGZ do GD, presente no hipocampo da maioria dos mamíferos adultos, produz neurônios e astrócitos durante toda a vida adulta destes indivíduos. Os estágios de proliferação e diferenciação destas células podem ser regulados por diversos fatores extrínsecos e intrínsecos (Kempermann et al., 2004; Overall et al., 2012). Como apresentado no capítulo II desta tese, os camundongos LDLr^{-/-}, modelo murino de hipercolesterolemia familiar, apresentaram redução na proliferação e diferenciação neuronal das CPNs do GD aos 3 meses de idade.

Previamente, Mulder e colaboradores (2007) sugeriram que, nos camundongos LDLr^{-/-}, uma redução na captação de colesterol por neurônios e a modulação de vias de sinalização celulares reguladas pelo LDLr podem ser fatores determinantes na perda sináptica e redução da proliferação de CPNs destes animais. Outro fator, a hipercolesterolemia, também pode ter um efeito sobre este processo, visto que os nichos neurogênicos no cérebro adulto são regiões altamente vascularizadas (Palmer et al., 2000). Nosso grupo demonstrou recentemente que os camundongos LDLr^{-/-} apresentam permeabilidade aumentada da BHE (de Oliveira et al., 2014), o que pode implicar na entrada de partículas de LDL plasmáticas no SNC (Hui et al., 2012; Löffler et al., 2013). Desta forma este capítulo foi desenhado experimentalmente com o objetivo de dissecar, por meio de um estudo in vitro, a contribuição destes fatores: LDLr e LDL plasmática, além do metabólito do colesterol 27-OH; sobre a proliferação e diferenciação de células proliferativas do GD isoladas de camundongos C57BL/6 adultos.

Primeiramente, foi caracterizado o perfil de expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo do colesterol nas fases de proliferação e diferenciação das CPNs. De maneira geral, esta análise revelou que as enzimas de síntese de colesterol, HMG-CoA redutase e esqualeno sintase estavam presentes na fase de célula progenitora e sua expressão foi reduzida no decorrer da diferenciação. O mesmo ocorreu com o LDLr, cuja expressão foi drasticamente reduzida com a diferenciação celular. Por outro lado, o receptor LRP1 teve maiores níveis de RNAm a partir da diferenciação, assim como as enzimas que degradam o colesterol. Conjuntamente, estes dados sugerem que a demanda de colesterol, seja pela síntese endógena ou captação extracelular, assim como a demanda do LDLr, parecem ser maiores na fase proliferativa destas células.

Confirmando a importância do LDLr no potencial de auto-renovação das CPNs, a estratégia de silenciamento da expressão gênica do LDLr, resultou na redução da capacidade proliferativa das CPNs em monocamada. Como evidenciado pelo ensaio da resazurina esta redução não está associada à morte de células progenitoras. A análise do ciclo celular mostrou uma menor proporção de células na fase S, e aumento do número de células em G2/M. Nas células eucariotas a fase S é o período de replicação do DNA. G2 é um período intermediário entre a fase S e a mitose (M); onde a célula continua a aumentar em tamanho e sintetizar proteínas. Ao final de G2 há um ponto de checagem que determina se as células irão prosseguir para M e dividir (Taupin, 2006; Vermeulen et al., 2003). Esta progressão do ciclo celular é finamente dirigida por proteínas ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (Cdks) (Satyanarayana and Kaldis, 2009). Excluída a hipótese de morte celular, a menor proporção de células na fase S observada após a transfecção com siRNA, pode significar: i) menor número de divisões e diminuição da reserva de células progenitoras; ii) progressão antecipada para a saída do ciclo celular e diferenciação (G0) ou ainda, iii) regressão para estado de quiescência (G1), no caso do GD, células tipo 1 ou glia radial (Overall et al., 2016). No ensaio do EdU não houve alteração da proporção de células em G1/G0 e a análise da extinção de CFSE, demonstrou que as células tratadas com siRNA sofrem um menor número de divisões gerando menor número de células filhas, portanto retendo uma maior fluorescência da sonda. Este resultado, associado à observação de que a expressão gênica do LDLr é predominante na fase de proliferação celular, sugere que o LDLr pode estar relacionado com a manutenção da reserva de células progenitoras. Corroborando esta hipótese, previamente nosso grupo demonstrou que o exercício físico, que modula a fase de expansão celular, principalmente células tipo 2 (Van Praag et al., 1999), reverteu déficits de memória espacial hipocampo-dependente nos camundongos LDLr^{-/-}. Por outro lado, o enriquecimento ambiental, que aumenta a sobrevivência de novos neurônios sem afetar a proliferação (Döbrössy et al., 2003; Gould et al., 1999b), não foi eficiente em melhorar o desempenho cognitivo neste animais (Moreira et al., 2013).

Alguns estudos demonstram o papel de receptores da família do LDLr em nichos neurogênicos adultos. A supressão do LRP2 no nicho neurogênico dos ventrículos laterais de camundongos, através de manipulação genética, resulta na diminuição da capacidade proliferativa das CPNs (Gajera et al., 2010). Outro estudo demonstrou o envolvimento do LRP1 na diferenciação destes progenitores em

oligodendrócitos (Hennen et al., 2013). Além disso, Gan e colaboradores, demonstraram que estas CPNs secretam apoE; e que o receptor de apoE medeia a ativação de vias de sobrevivência nestas células e também sua diferenciação em oligodendrócitos (Gan et al., 2011). Por outro lado, o LRP6 foi identificado recentemente como regulador negativo da proliferação de CPNs isoladas da SGZ hipocampal de camundongos (Kannan et al., 2016).

Comparados a outras regiões do cérebro, os nichos neurogênicos são caracterizados por uma alta densidade vascular, e frequentemente, interação com o fluido cérebro espinhal (Palmer et al., 2000; Stolp and Molnár, 2015). Desta forma, ainda existem muitas especulações sobre quão significativa é a regulação exercida por moléculas periféricas sobre as propriedades proliferativas destes nichos. O estudo de Fryer e colaboradores (2005) observou níveis de apoE 50% maiores no fluido cérebro espinhal e no tecido cortical cerebral de camundongos LDLr^{-/-}, em comparação aos controles LDLr^{+/+}. Até o momento, nenhum estudo avaliou a presença da apoB100, apolipoproteína constituinte da LDL plasmática, no cérebro de camundongos LDLr^{-/-}, no entanto sua presença foi evidenciada no cérebro de outros modelos animais de hipercolesterolemia (Chen et al., 2010; Löffler et al., 2013). A permeabilidade aumentada da BHE nos camundongos LDLr^{-/-} (de Oliveira et al., 2014) favorece a hipótese de que, além do LDLr, a entrada de LDL no SNC pode ser um dos fatores influenciadores da neurogênese adulta nestes animais.

O tratamento com LDL isolada do plasma humano reduziu a proliferação celular das células em monocamada após 48 h de tratamento, e este efeito não foi associado a uma redução na viabilidade das células progenitoras. A redução na proliferação foi caracterizada por uma menor proporção de células na fase S e aumento da proporção de células em G2/M. Embora a análise de variância não tenha evidenciado uma diferença estatística em G1/G0, quando comparadas somente as células controle com células tratadas com LDL 100 µg/mL (teste t), por exemplo, observa-se um aumento em G1/G0. Portanto, é possível que além da diminuição da reserva de progenitores, a LDL tenha induzido a transição destas células para o estado de quiescência ou mesmo, tenha impedido a saída de células do estado quiescente. Quando estimuladas, células quiescentes podem voltar para as fases ativas do ciclo celular (células tipo 2) (Encinas et al., 2011).

Diferentemente da LDL, os oxisteróis derivados do metabolismo do colesterol produzidos tanto periféricamente quanto no SNC, são capazes de atravessar a BHE (Björkhem, 2002; Dietschy and Turley,

2001). O 27-OH, particularmente, cujos níveis séricos estão aumentados em indivíduos com hipercolesterolemia (Babiker et al., 2005), é apontado como potencial oxisterol neurotóxico (Prasanthi et al., 2009; Wang et al., 2016a) e está associado com o desenvolvimento de comprometimento cognitivo e doença de Alzheimer (Liu et al., 2016; Wang et al., 2016b). No presente estudo, o 27-OH foi avaliado como potencial molécula envolvida no efeito da HF na neurogênese hipocampal adulta. No entanto, apesar de ter induzido citotoxicidade, reduzindo a viabilidade celular após 24 h, o 27-OH não alterou a proliferação celular de CPNs em 48 h de tratamento.

Corroborando o resultado observado com células em monocamada, a LDL reduziu a expansão proliferativa das células precursoras, quando cultivadas em condições de formação de neuroesferas. Enquanto as células em monocamada representam uma população homogênea com maior controle das respostas celulares, as neuroesferas compreendem uma população mais heterogênea de células precursoras, visto que pode ocorrer certo grau de diferenciação celular no interior das esferas, o que permite preservar parcialmente as influências parácrinas de diferentes tipos celulares presentes no nicho neurogênico *in vivo* (Babu et al., 2007). Além da redução na expansão clonal das esferas, o tratamento com LDL alterou seu potencial neurogênico (menor número de células diferenciadas em β III-tubulina-positivas). Este é o primeiro estudo que avalia o efeito da LDL sobre progenitores neuronais *in vitro*. No entanto, seu efeito em cultivo primário de neurônios corticais foi avaliado por Hui e colaboradores (2012) que demonstraram que o tratamento com LDL plasmática desencadeou um acúmulo de colesterol em endo e lisossomos, o que modificou o pH endossomal levando a uma maior internalização e degradação da proteína sináptica sinaptofisina.

O sistema endocítico das células eucariotas compreende uma complexa rede de compartimentos membranares, onde cada um desempenha uma função específica na seleção, distribuição e catabolismo de moléculas internalizadas (Conner e Schmid, 2003). Após internalizado em endossomos primários o LDLr por exemplo, é reciclado, retornando à membrana em endossomos de reciclagem, enquanto a LDL, que é destinada à degradação, é transferida aos endossomos secundários e então aos lisossomos (Rink et al., 2005). Nos endossomos secundários os ésteres de colesterol são liberados e desesterificados. Este colesterol livre é exportado ao RE ou outros compartimentos celulares (Brown e Goldstein, 2009). No RE o

colesterol pode ser esterificado novamente e estocado com triacilgliceróis em gotículas lipídicas (Pol et al., 2014).

No presente estudo, o tratamento com LDL aumentou o armazenamento do colesterol, nas CPNs em monocamada. Após 48 h de tratamento, foi observada a presença de inúmeras gotículas lipídicas, que não estavam presentes nas células tratadas com salina. Além disso, foi descartada a possibilidade destas gotículas estarem em um estado transitório, como por exemplo, endossomos de reciclagem, visto que mesmo após uma hora em meio sem LDL as células ainda apresentaram estas gotículas. O acúmulo de gotículas lipídicas em células gliais, foi recentemente apontado como processo inicial e transitório no desenvolvimento de neurodegeneração (Liu et al., 2015). Outro recente estudo caracterizou a presença destes compartimentos lipídicos em processos neuroinflamatórios associados com o envelhecimento em diferentes áreas cerebrais de camundongos (Shimabukuro et al., 2016). As gotículas lipídicas já foram inclusive descritas no GD, não em quantidade tão significativa quanto no nicho neurogênico dos ventrículos laterais, mas isto pode significar um fator determinante nos modelos animais de hipercolesterolemia com disfunção da barreira hematoencefálica.

Não se pode comprovar que o colesterol das gotículas lipídicas é, de fato, proveniente do tratamento com LDL, mas considerando que o tratamento reduziu os níveis do RNAm das proteínas de síntese de colesterol, é pouco provável que este conteúdo seja proveniente de síntese de novo. Aliás, tanto a redução na expressão destas enzimas quanto do RNAm do LDLr observada após o tratamento com LDL são certamente consequência da regulação pelo fator de transcrição SREBP1 (ou SREBF1), que conforme a análise de *microarray* demonstrou, teve sua expressão relativa reduzida. Além da regulação transcricional do metabolismo do colesterol, o SREBP1 parece ter relação com a progressão do ciclo celular. Um estudo prévio, utilizando diferentes tipos celulares, reportou que este fator está hiperfosforilado durante a mitose, induzindo a expressão de diversos dos seus genes alvo (Bengoechea-Alonso et al., 2005). Posteriormente, o mesmo grupo propôs uma ligação entre o metabolismo de colesterol e a proliferação celular, quando demonstrou o envolvimento da Cdk1 nas modificações destes resíduos durante a mitose (Bengoechea-Alonso e Ericsson, 2006) e que a inativação de SREBP1 resulta em defeitos na divisão celular (Bengoechea-Alonso e Ericsson, 2016). Vale ressaltar que no presente estudo, dos 23 genes que foram significativamente inibidos pelo tratamento com LDL, 22 estão relacionados ao metabolismo do

colesterol, respondendo em sua maioria a este fator de transcrição (Brown e Goldstein, 1997). Por outro lado, o LRP1 cuja expressão não sofre regulação pelo SREBP1 (Gaëta et al., 1994; Kütt et al., 1989), não foi alterado pelo tratamento com LDL.

Já o LDLr siRNA, além de reduzir a expressão gênica das enzimas de síntese de colesterol, curiosamente também reduziu os níveis de RNAm do LRP1. Podemos especular que a diminuição na expressão de ambos os receptores ligantes da apoE no SNC, LDLr e LRP1, pode resultar na ineficiência da sinalização desempenhada por esta lipoproteína na plasticidade neuronal. Dentre alguns estudos que suportam esta idéia, vale ressaltar a recente publicação de Safina e colaboradores (2016), a qual reportou que células progenitoras neuronais embrionárias que tiveram a expressão do LRP1 silenciada apresentaram redução na proliferação e diferenciação a neurônios. Além disso, enquanto células controle estimuladas com apoE aumentaram sua diferenciação, as células LRP1^{-/-} não responderam ao estímulo. Ainda, este efeito da apoE foi mediado por sinalização via MAPK/Akt que foi independente da captação de colesterol. Particularmente com relação às células progenitoras do GD, o estudo de Yang e colaboradores descreveu a expressão de apoE especificamente nas células tipo I do GD em camundongos C57BL/6, e que esta expressão aumenta a partir do desenvolvimento pós-natal até a idade adulta. Ainda, os autores observaram que camundongos apoE^{-/-} adultos apresentam menor número de células proliferativas quando comparados aos controles selvagens, sugerindo, portanto, que a apoE, ou seus receptores alvo, medeia a manutenção da reserva de células progenitoras do GD na idade adulta (Yang et al., 2011). Além deste papel na proliferação de células precursoras embrionárias e adultas, a apoE apresenta notório efeito sobre a plasticidade de neurônios hipocâmpais, especificamente por aumentar o número de dendritos neuronais (Nakato et al., 2015).

Apesar da recorrência dos termos ontológicos relacionados ao tráfego intracelular de LDL ou transporte endossomal, resultantes da análise de *microarray* para o tratamento com LDLr siRNA, a capacidade de internalização de LDL não foi afetada, visto que não houve alteração na internalização da LDL marcada com fluoróforos. Além disso, a dinâmica de distribuição desta LDL para os diferentes compartimentos intracelulares também parece inalterada, uma vez que os dois pulsos de LDL, separados temporalmente, apresentaram diferente localização nas imagens de microscopia de fluorescência. No estudo de Hui e colaboradores (2012) o tratamento de cultivos primários de neurônios corticais com LDL alterou a distribuição celular de

endossomos, e aumentou a colocalização destes com a proteína sinaptofisina. No presente estudo, tanto o tratamento com LDL, quanto o silenciamento gênico do LDLr, não alteraram a organização celular de endossomos primários, secundários ou lisossomos.

Estudos prévios demonstraram que o tratamento *in vitro* com LDL, particularmente suas formas modificadas como a LDL oxidada e glicada, induzem disfunção mitocondrial e comprometem a bioenergética de células endoteliais de aorta (Hort et al., 2014; Roy Chowdhury et al., 2010). No referido estudo, a disfunção mitocondrial foi associada a exacerbada produção espécies reativas pela exposição à LDLox. De fato, células endoteliais são constantemente expostas a agentes oxidantes vasculares e por conseguinte apresentam alta capacidade respiratória (Hort et al., 2014). No presente estudo, a exposição à LDL não alterou a produção de espécies reativas, no entanto, levou a um aumento na capacidade de reserva, isto é, um aumento no consumo de oxigênio máximo em relação ao basal. Esta resposta pode ser consequência de um aumento nos níveis de ER logo nas primeiras horas de tratamento, normalizado posteriormente, mas suficiente para ativar respostas mitocondriais relacionadas a esta adaptação metabólica.

O aumento na capacidade de reserva no teste de estresse mitocondrial foi induzido também pelo silenciamento do LDLr. Este efeito também pode ser consequência de uma resposta adaptativa, visto que o silenciamento foi iniciado 48 h antes. Até o momento não foi descrita função para o LDLr relacionada à mitocôndria, diferentemente de outros receptores desta família. Por exemplo, o LRP1 parece mediar a internalização do peptídeo β -amilóide por mitocôndrias, endo e lisossomos no cérebro de camundongos e em células neuronais *in vitro* (Ma et al., 2016; Yang et al., 2015).

Os resultados obtidos neste estudo *in vitro*, confirmam as observações descritas no capítulo II desta tese, da redução da neurogênese adulta nos camundongos LDLr^{-/-}, modelo animal de HF. Pôde-se caracterizar que tanto o silenciamento do LDLr quanto o tratamento com LDL afetam a capacidade proliferativas das CPNs, afetando particularmente a expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo do colesterol, e modulando a fase S do ciclo celular. Estes dados contribuem sobremaneira para o entendimento do efeito da HF sobre processos de neuroplasticidade, e consequentemente desenvolvimento de neuropatologias. Adicionalmente, estudos subsequentes poderão obter maiores detalhes quanto aos mecanismos celulares implicados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Motivado por: i) evidências clínicas de uma comorbidade entre a hipercolesterolemia e a depressão (Davison e Kaplan, 2012; Nakao et al., 2001a; Tyrovolas et al., 2009; Vural et al., 2007) e ii) observações experimentais de comprometimento do SNC do modelo animal de HF (camundongos LDLr^{-/-}), particularmente a redução na plasticidade sináptica e proliferação celular hipocampal, (Moreira et al., 2012; Mulder et al., 2007; de Oliveira et al., 2014; Thirumangalakudi et al., 2008), o presente estudo hipotetizou que existe uma **associação entre a hipercolesterolemia e a depressão, que pode estar relacionada, dentre outros aspectos, a alterações na neurogênese hipocampal adulta.**

Como resultado, este estudo descreve um fenótipo tipo-depressivo e prejuízo na neurogênese no GD em um modelo animal de hipercolesterolemia familiar. A redução na neurogênese hipocampal adulta, não só contribui para a manifestação do fenótipo tipo-depressivo dos camundongos LDLr^{-/-}, visto o envolvimento deste processo na fisiopatologia da depressão (David et al., 2009; Duman, 2002; Duman e Monteggia, 2006; Kempermann e Kronenberg, 2003); como também pode colaborar para os prejuízos cognitivos, previamente descritos nestes animais (Moreira et al., 2012; Mulder et al., 2004; Thirumangalakudi et al., 2008), visto a contribuição dos novos neurônios também no estabelecimento da cognição e memória hipocampo-dependente (Aimone et al., 2009; Clelland et al., 2009; Gilbert et al., 1998; Hunsaker e Kesner, 2008). Adicionalmente, o conjunto de resultados dos ensaios in vitro fornece evidências de que tanto os elevados níveis de LDL, quanto a disfunção do LDLr, que são condições presentes na hipercolesterolemia familiar desde o nascimento dos indivíduos, contribuem para a redução da proliferação das células precursoras neuronais do hipocampo adulto.

Em conclusão, estas evidências experimentais somam às informações já disponíveis na literatura acerca dos camundongos LDLr^{-/-} e alterações no SNC, contribuindo para o melhor entendimento da comorbidade entre a hipercolesterolemia familiar e neuropatologias. Mas principalmente, este estudo apresenta pela primeira vez evidências pré-clínicas comportamentais e neuroquímicas de uma associação entre a hipercolesterolemia familiar e a depressão.

8. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados podemos concluir que:

- ✓ Camundongos LDLr^{-/-} apresentaram comportamento tipo-depressivo (correlacionado à hipercolesterolemia) e maior atividade das enzimas MAO-A e B, no hipocampo, em relação aos animais selvagens C57BL/6;
- ✓ A exposição *in vitro* à LDL humana isolada induziu aumento na atividade da MAO em células da linhagem SH-SY5Y e nos níveis de espécies reativas;
- ✓ Camundongos LDLr^{-/-} apresentaram déficit cognitivo associado ao GD, que foi correlacionado com a redução na proliferação e maturação de CPNs nesta sub-região;
- ✓ Camundongos LDLr^{-/-} apresentaram redução no número de novos neurônios (neurogênese adulta) no GD;
- ✓ Camundongos LDLr^{-/-} apresentaram diminuição nos níveis de RNAm de BDNF no hipocampo, e aumento de RNAm de TrkB no córtex cerebral e hipocampo;
- ✓ A expressão gênica das enzimas HMG-CoA redutase e esqueleno sintase e do receptor de LDL foi reduzida com a diferenciação, *in vitro*, das CPNs isoladas do GD de camundongos C57BL/6 adultos, enquanto a do receptor LRP1 e das enzimas colesterol 24-hidroxilase e esterol 27-hidroxilase aumentou;
- ✓ A exposição à LDL humana isolada e o silenciamento gênico do LDLr reduziram a proliferação das CPNs, enquanto o 27-hidroxicolesterol não afetou a proliferação, porém reduziu a viabilidade celular;
- ✓ A exposição à LDL humana isolada reduziu a diferenciação de CPNs para a linhagem neuronal;
- ✓ Os tratamentos com LDL e LDLr siRNA reduziram a expressão gênica das enzimas HMG-CoA redutase e esqualeno sintase e do LDLr, enquanto o LDLr siRNA também reduziu a expressão gênica do receptor LRP1;
- ✓ Tanto o tratamento com LDL quanto o silenciamento gênico do LDLr não alteraram a internalização e transporte endossomal de LDL. Porém, o tratamento com LDL aumentou a formação de gotículas lipídicas;

- ✓ Ambos os tratamentos, LDL e LDLr siRNA, aumentaram a capacidade de reserva em resposta ao teste de estresse mitocondrial.

9. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho surgiram novas perguntas. Portanto, propomos como perspectivas:

- ✓ Avaliar, em CPNs isoladas do GD de camundongos C57BL/6 adultos, o perfil lipidômico após o tratamento in vitro com LDL e do silenciamento gênico do LDLr;
- ✓ Investigar, in vitro, a capacidade proliferativa e de diferenciação celular de CPNs isoladas do GD de camundongos LDLr^{-/-} adultos;
- ✓ Avaliar o efeito de uma estratégia indutora de neurogênese hipocampal adulta (enriquecimento ambiental ou tratamento antidepressivo crônico) sobre os prejuízos comportamentais e sobre a proliferação e diferenciação das CPNs hipocampais, observados nos camundongos LDLr^{-/-};

REFERÊNCIAS

- Adachi, M., Barrot, M., Autry, A.E., Theobald, D., and Monteggia, L.M. Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy. **Biol. Psychiatry** 63, 642–649, 2008.
- Aimone, J.B., Wiles, J., and Gage, F.H. Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. **Neuron** 61, 187–202, 2009.
- Alexopoulos, G.S. The vascular depression hypothesis: 10 years later. **Biol. Psychiatry** 60, 1304–1305, 2006.
- Alexopoulos, G.S., Meyers, B.S., Young, R.C., Kakuma, T., Silbersweig, D., and Charlson, M. Clinically defined vascular depression. **Am. J. Psychiatry** 154, 562–565, 1997b.
- Alexopoulos, G.S., Meyers, B.S., Young, R.C., Campbell, S., Silbersweig, D., and Charlson, M. “Vascular depression” hypothesis. **Arch. Gen. Psychiatry** 54, 915–922, 1997a.
- Altar, C.A. Neurotrophins and depression. **Trends Pharmacol. Sci.** 20, 59–61, 1999.
- Altman, J., and Das, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J. Comp. Neurol.** 124, 319–335, 1965.
- Andersson, M., Elmberger, P.G., Edlund, C., Kristensson, K., and Dallner, G. Rates of cholesterol, ubiquinone, dolichol and dolichyl-P biosynthesis in rat brain slices. **FEBS Lett.** 269, 15–18, 1990.
- Angelucci, F., Brenè, S., and Mathé, A.A. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. **Mol. Psychiatry** 10, 345–352, 2005.
- Anttila, S., Huuhka, K., Huuhka, M., Rontu, R., Hurme, M., Leinonen, E., and Lehtimäki, T. Interaction between 5-HT1A and BDNF genotypes increases the risk of treatment-resistant depression. **J. Neural Transm.** 114, 1065–1068, 2007.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Arlington: 2013.
- Babiker, A., Dzeletovic, S., Wiklund, B., Pettersson, N., Salonen, J., Nyssönen, K., Eriksson, M., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. Patients with atherosclerosis may have increased circulating levels of 27-hydroxycholesterol and cholestenic acid. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** 65, 365–375, 2005.

- Babu, H., Cheung, G., Kettenmann, H., Palmer, T.D., and Kempermann, G. Enriched Monolayer Precursor Cell Cultures from Micro-Dissected Adult Mouse Dentate Gyrus Yield Functional Granule Cell-Like Neurons. **PLoS ONE** 2, e388, 2007.
- Beaven, S.W., and Tontonoz, P. Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia. **Annu. Rev. Med.** 57, 313–329, 2006.
- Bengochea-Alonso, M.T., and Ericsson, J. Cdk1/cyclin B-mediated phosphorylation stabilizes SREBP1 during mitosis. **Cell Cycle.** 5, 1708–1718, 2006.
- Bengochea-Alonso, M.T., and Ericsson, J. The phosphorylation-dependent regulation of nuclear SREBP1 during mitosis links lipid metabolism and cell growth. **Cell Cycle.** 15, 2753–2765, 2016.
- Bengochea-Alonso, M.T., Punga, T., and Ericsson, J. Hyperphosphorylation regulates the activity of SREBP1 during mitosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 102, 11681–11686, 2005.
- Berton, O., and Nestler, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat. Rev. Neurosci.** 7, 137–151, 2006.
- Bien, C.M., and Espenshade, P.J. Sterol Regulatory Element Binding Proteins in Fungi: Hypoxic Transcription Factors Linked to Pathogenesis. **Eukaryot. Cell** 9, 352–359, 2010.
- Björkhem, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? **J. Clin. Invest.** 110, 725–730, 2002.
- Björkhem, I. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. **J. Intern. Med.** 260, 493–508, 2006.
- Bloch, K. The biological synthesis of cholesterol. **Science** 150, 19–28, 1965.
- Bloch, K. Summing up. **Annu. Rev. Biochem.** 56, 1–19, 1987.
- Bloch, K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. **Steroids** 57, 378–383, 1992.
- Borghini, I., Barja, F., Pometta, D., and James, R.W. Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. **Biochim. Biophys. Acta** 1255, 192–200, 1995.
- Bortolato, M., Chen, K., and Shih, J.C. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 60, 1527–1533, 2008.

- Boyles, J.K., Pitas, R.E., Wilson, E., Mahley, R.W., and Taylor, J.M. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. **J. Clin. Invest.** 76, 1501–1513, 1985.
- Brocardo, P.S., Budni, J., Kaster, M.P., Santos, A.R.S., and Rodrigues, A.L.S. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Neuropharmacology** 54, 464–473, 2008.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. **Science** 191, 150–154, 1976.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 76, 3330–3337, 1979.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science** 232, 34–47, 1986.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell** 89, 331–340, 1997.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. **J. Lipid Res.** 50 Suppl, S15-27, 2009.
- Brown, E.S., J Woolston, D., Frol, A., Bobadilla, L., Khan, D.A., Hanczyc, M., Rush, A.J., Fleckenstein, J., Babcock, E., and Cullum, C.M. Hippocampal volume, spectroscopy, cognition, and mood in patients receiving corticosteroid therapy. **Biol. Psychiatry** 55, 538–545, 2004.
- Campbell, S., and MacQueen, G. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. **Curr. Opin. Psychiatry** 19, 25–33, 2006.
- Castrén, E. Is mood chemistry? **Nat. Rev. Neurosci.** 6, 241–246, 2005.
- Castrén, E., Võikar, V., and Rantamäki, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Curr. Opin. Pharmacol.** 7, 18–21, 2007.
- Chaudhuri, J.D. Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays. **Med. Sci. Monit.** 11, RA52-62, 2005.
- de Chaves, E.I., Rusiñol, A.E., Vance, D.E., Campenot, R.B., and Vance, J.E. Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. **J. Biol. Chem.** 272, 30766–30773, 1997.
- Chen, A.C., Shirayama, Y., Shin, K.H., Neve, R.L., and Duman, R.S. Expression of the cAMP response element binding protein

- (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. **Biol. Psychiatry** 49, 753–762, 2001.
- Chen, X., Wagener, J.F., Morgan, D.H., Hui, L., Ghribi, O., and Geiger, J.D. Endolysosome mechanisms associated with Alzheimer's disease-like pathology in rabbits ingesting cholesterol-enriched diet. **J. Alzheimers Dis.** 22, 1289–1303, 2010.
- Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Fulcher, J., O'Connell, R., Voysey, M., Emberson, J., Blackwell, L., Mihaylova, B., Simes, J., Collins, R., Kirby, A., et al. Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials. **Lancet.** 385, 1397–1405, 2015.
- Christie, B.R., and Cameron, H.A. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Hippocampus** 16, 199–207, 2006.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., et al. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. **Science** 325, 210–213, 2009.
- Colle, D., Santos, D.B., Hartwig, J.M., Godoi, M., Engel, D.F., de Bem, A.F., Braga, A.L., and Farina, M. Succinobucol, a Lipid-Lowering Drug, Protects Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells via Upregulation of Glutathione Levels and Glutamate Cysteine Ligase Activity. **Mol. Neurobiol.** 53, 1280–1295, 2016.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature** 422, 37–44, 2003.
- Cooper-Kuhn, C.M., and Georg Kuhn, H. Is it all DNA repair? **Dev. Brain Res.** 134, 13–21, 2002.
- Cotman, C.W., and Nieto-Sampedro, M. Cell biology of synaptic plasticity. **Science** 225, 1287–1294, 1984.
- Cuchel, M., Bruckert, E., Ginsberg, H.N., Raal, F.J., Santos, R.D., Hegele, R.A., Kuivenhoven, J.A., Nordestgaard, B.G., Descamps, O.S., Steinhagen-Thiessen, E., et al. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. **Eur. Heart J.** 35, 2146–2157, 2014.
- Czéh, B., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., de Biurrun, G., van Kampen, M., Bartolomucci, A., and Fuchs, E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell

- proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 98, 12796–12801, 2001.
- David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.-W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.-P., et al. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. **Neuron** 62, 479–493, 2009.
- Davis, C.G., Goldstein, J.L., Südhof, T.C., Anderson, R.G., Russell, D.W., and Brown, M.S. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. **Nature** 326, 760–765, 1987.
- Davison, K.M., and Kaplan, B.J. Food intake and blood cholesterol levels of community-based adults with mood disorders. **BMC Psychiatry** 12, 10, 2012.
- Dere, E., Huston, J.P., and De Souza Silva, M.A. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Res. Brain Res. Protoc.** 16, 10–19, 2005.
- Dietschy, J.M. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. **Biol. Chem.** 390, 287–293, 2009.
- Dietschy, J.M., and Turley, S.D. Cholesterol metabolism in the brain. **Curr. Opin. Lipidol.** 12, 105–112, 2001.
- Döbrössy, M.D., Drapeau, E., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., and Abrous, D.N. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. **Mol. Psychiatry** 8, 974–982, 2003.
- Dowlatshahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.F., and Young, L.T. Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. **Lancet Lond. Engl.** 352, 1754–1755, 1998.
- Dranovsky, A., and Hen, R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. **Biol. Psychiatry** 59, 1136–1143, 2006.
- D'Sa, C., and Duman, R.S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disord.** 4, 183–194, 2002.
- Duman, R.S. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. **Eur. Psychiatry.** 17 Suppl 3, 306–310, 2002.
- Duman, R.S. Neural plasticity: consequences of stress and actions of antidepressant treatment. **Dialogues Clin. Neurosci.** 6, 157–169,

- 2004a.
- Duman, R.S. Depression: a case of neuronal life and death? **Biol. Psychiatry** 56, 140–145, 2004b.
- Duman, R.S., and Monteggia, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol. Psychiatry** 59, 1116–1127, 2006.
- Duman, R.S., and Voleti, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends Neurosci.** 35, 47–56, 2012.
- Duman, R.S., Malberg, J., Nakagawa, S., and D'Sa, C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biol. Psychiatry** 48, 732–739, 2000.
- Duman, R.S., Malberg, J., and Nakagawa, S. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 299, 401–407, 2001.
- Dwivedi, Y., Rizavi, H.S., Conley, R.R., Roberts, R.C., Tamminga, C.A., and Pandey, G.N. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. **Arch. Gen. Psychiatry** 60, 804–815, 2003.
- Ekdahl, C.T., Claassen, J.-H., Bonde, S., Kokaia, Z., and Lindvall, O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 100, 13632–13637, 2003.
- Encinas, J.M., Michurina, T.V., Peunova, N., Park, J.-H., Tordo, J., Peterson, D.A., Fishell, G., Koulakov, A., and Enikolopov, G. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. **Cell Stem Cell** 8, 566–579, 2011.
- Endo, A., Tsujita, Y., Kuroda, M., and Tanzawa, K. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **Eur. J. Biochem.** 77, 31–36, 1977.
- Engel, D., Zomkowski, A.D.E., Lieberknecht, V., Rodrigues, A.L., and Gabilan, N.H. Chronic administration of duloxetine and mirtazapine downregulates proapoptotic proteins and upregulates neurotrophin gene expression in the hippocampus and cerebral cortex of mice. **J. Psychiatr. Res.** 47, 802–808, 2013.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat. Med.** 4, 1313–1317, 1998.
- Fernández, C., Martín, M., Gómez-Coronado, D., and Lasunción, M.A. Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell

- proliferation and cell cycle progression. **J. Lipid Res.** 46, 920–929, 2005.
- Ferrari, A.J., Charlson, F.J., Norman, R.E., Patten, S.B., Freedman, G., Murray, C.J.L., Vos, T., and Whiteford, H.A. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. **PLoS Med.** 10, e1001547, 2013.
- Figurov, A., Pozzo-Miller, L.D., Olafsson, P., Wang, T., and Lu, B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. **Nature** 381, 706–709, 1996.
- Fitzgerald, J.C., Ufer, C., De Girolamo, L.A., Kuhn, H., and Billett, E.E. Monoamine oxidase-A modulates apoptotic cell death induced by staurosporine in human neuroblastoma cells. **J. Neurochem.** 103, 2189–2199, 2007.
- Franklin, K.B.J., and Paxinos, G. Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates (Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier).
- Frisén, J., Verge, V.M., Cullheim, S., Persson, H., Fried, K., Middlemas, D.S., Hunter, T., Hökfelt, T., and Risling, M. Increased levels of trkB mRNA and trkB protein-like immunoreactivity in the injured rat and cat spinal cord. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 89, 11282–11286, 1992.
- Frodl, T., Meisenzahl, E.M., Zetzsche, T., Born, C., Groll, C., Jäger, M., Leinsinger, G., Bottlender, R., Hahn, K., and Möller, H.-J. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. **Am. J. Psychiatry** 159, 1112–1118, 2002.
- Fryer, J.D., DeMattos, R.B., McCormick, L.M., O'Dell, M.A., Spinner, M.L., Bales, K.R., Paul, S.M., Sullivan, P.M., Parsadanian, M., Bu, G., et al. The Low Density Lipoprotein Receptor Regulates the Level of Central Nervous System Human and Murine Apolipoprotein E but Does Not Modify Amyloid Plaque Pathology in PDAPP Mice. **J. Biol. Chem.** 280, 25754–25759, 2005.
- Gaëta, B.A., Borthwick, I., and Stanley, K.K. The 5'-flanking region of the alpha 2MR/LRP gene contains an enhancer-like cluster of Sp1 binding sites. **Biochim. Biophys. Acta** 1219, 307–313, 1994.
- Gage, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science** 287, 1433–1438, 2000.
- Gage, F.H. Neurogenesis in the adult brain. **J. Neurosci.** 22, 612–613, 2002.

- Gajera, C.R., Emich, H., Liubinski, O., Christ, A., Beckervordersandforth-Bonk, R., Yoshikawa, K., Bachmann, S., Christensen, E.I., Götz, M., Kempermann, G., et al. LRP2 in ependymal cells regulates BMP signaling in the adult neurogenic niche. **J. Cell Sci.** 123, 1922–1930, 2010.
- Gan, H.T., Tham, M., Hariharan, S., Ramasamy, S., Yu, Y.H., and Ahmed, S. Identification of ApoE as an autocrine/paracrine factor that stimulates neural stem cell survival via MAPK/ERK signaling pathway. **J. Neurochem.** 117, 565–578, 2011.
- Gidding, S.S., Champagne, M.A., de Ferranti, S.D., Defesche, J., Ito, M.K., Knowles, J.W., McCrindle, B., Raal, F., Rader, D., Santos, R.D., et al. The Agenda for Familial Hypercholesterolemia: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation** 132, 2167–2192, 2015.
- Gilbert, P.E., Kesner, R.P., and DeCoteau, W.E. Memory for spatial location: role of the hippocampus in mediating spatial pattern separation. **J. Neurosci.** 18, 804–810, 1998.
- Gilbert, P.E., Kesner, R.P., and Lee, I. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. **Hippocampus** 11, 626–636, 2001.
- Gil-Mohapel, J., Brocardo, P.S., Choquette, W., Gothard, R., Simpson, J.M., and Christie, B.R. Hippocampal Neurogenesis Levels Predict WATERMAZE Search Strategies in the Aging Brain. **PLoS ONE** 8, e75125, 2013.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. **J. Biol. Chem.** 249, 5153–5162, 1974.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature** 343, 425–430, 1990.
- Goodrich-Hunsaker, N.J., Hunsaker, M.R., and Kesner, R.P. Dissociating the role of the parietal cortex and dorsal hippocampus for spatial information processing. **Behav. Neurosci.** 119, 1307–1315, 2005.
- Goritz, C., Mauch, D.H., and Pfrieder, F.W. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. **Mol. Cell. Neurosci.** 29, 190–201, 2005.
- Göthe, F., Enache, D., Wahlund, L.O., Winblad, B., Crisby, M., Lökk, J., and Aarsland, D. Cerebrovascular diseases and depression: epidemiology, mechanisms and treatment. **Panminerva Med.** 54,

- 161–170, 2012.
- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A., and Fuchs, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **J. Neurosci.** 17, 2492–2498, 1997.
- Gould, E., Reeves, A.J., Graziano, M.S., and Gross, C.G. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. **Science** 286, 548–552, 1999a.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., and Shors, T.J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nat. Neurosci.** 2, 260–265, 1999b.
- Guo, W., Allan, A.M., Zong, R., Zhang, L., Johnson, E.B., Schaller, E.G., Murthy, A.C., Goggin, S.L., Eisch, A.J., Oostra, B.A., et al. Ablation of *Fmrp* in adult neural stem cells disrupts hippocampus-dependent learning. **Nat. Med.** 17, 559–565, 2011.
- Hagihara, H., Toyama, K., Yamasaki, N., and Miyakawa, T. Dissection of hippocampal dentate gyrus from adult mouse. **J. Vis. Exp.** 2009.
- Hajar, R. Statins: past and present. **Heart Views.** 12, 121–127, 2011.
- Hauptmann, N., Grimsby, J., Shih, J.C., and Cadenas, E. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. **Arch. Biochem. Biophys.** 335, 295–304, 1996.
- Heninger, G.R., Delgado, P.L., and Charney, D.S. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. **Pharmacopsychiatry** 29, 2–11, 1996.
- Hennen, E., Safina, D., Haussmann, U., Wörsdörfer, P., Edenhofer, F., Poetsch, A., and Faissner, A. A LewisX glycoprotein screen identifies the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) as a modulator of oligodendrogenesis in mice. **J. Biol. Chem.** 288, 16538–16545, 2013.
- Hobbs, H.H., Russell, D.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. **Annu. Rev. Genet.** 24, 133–170, 1990.
- Hort, M.A., Straliootto, M.R., de Oliveira, J., Amoêdo, N.D., da Rocha, J.B.T., Galina, A., Ribeiro-do-Valle, R.M., and de Bem, A.F. Diphenyl diselenide protects endothelial cells against oxidized low density lipoprotein-induced injury: Involvement of mitochondrial function. **Biochimie** 105, 172–181, 2014.
- Hritcu, L., and Gorgan, L.D. Intranigral lipopolysaccharide induced

- anxiety and depression by altered BDNF mRNA expression in rat hippocampus. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry** 51, 126–132, 2014.
- Hui, L., Chen, X., and Geiger, J.D. Endolysosome involvement in LDL cholesterol-induced Alzheimer's disease-like pathology in primary cultured neurons. **Life Sci.** 91, 1159–1168, 2012.
- Hunsaker, M.R., and Kesner, R.P. Evaluating the differential roles of the dorsal dentate gyrus, dorsal CA3, and dorsal CA1 during a temporal ordering for spatial locations task. **Hippocampus** 18, 955–964, 2008.
- Hunsaker, M.R., Fieldsted, P.M., Rosenberg, J.S., and Kesner, R.P. Dissociating the roles of dorsal and ventral CA1 for the temporal processing of spatial locations, visual objects, and odors. **Behav. Neurosci.** 122, 643–650, 2008a.
- Hunsaker, M.R., Rosenberg, J.S., and Kesner, R.P. The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. **Hippocampus** 18, 1064–1073, 2008b.
- Hunsaker, M.R., Wenzel, H.J., Willemsen, R., and Berman, R.F. Progressive spatial processing deficits in a mouse model of the fragile X premutation. **Behav. Neurosci.** 123, 1315–1324, 2009.
- Hunsaker, M.R., Goodrich-Hunsaker, N.J., Willemsen, R., and Berman, R.F. Temporal ordering deficits in female CGG KI mice heterozygous for the fragile X premutation. **Behav. Brain Res.** 213, 263–268, 2010.
- Hussain, M.M., Strickland, D.K., and Bakillah, A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. **Annu. Rev. Nutr.** 19, 141–172, 1999.
- Hüttmann, K., Sadgrove, M., Wallraff, A., Hinterkeuser, S., Kirchhoff, F., Steinhäuser, C., and Gray, W.P. Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. **Eur. J. Neurosci.** 18, 2769–2778, 2003.
- Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 9, 125–138, 2008.
- Iosifescu, D.V., Clementi-Craven, N., Fraguas, R., Papakostas, G.I., Petersen, T., Alpert, J.E., Nierenberg, A.A., and Fava, M. Cardiovascular risk factors may moderate pharmacological treatment effects in major depressive disorder. **Psychosom. Med.** 67, 703–706, 2005.
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., and Herz, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein

- receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J. Clin. Invest.** 92, 883–893, 1993.
- Isingrini, E., Camus, V., Le Guisquet, A.-M., Pingaud, M., Devers, S., and Belzung, C. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS One** 5, e10404, 2010.
- Jacobs, B.L. Adult brain neurogenesis and depression. **Brain. Behav. Immun.** 16, 602–609, 2002.
- Jacobs, B.L., van Praag, H., and Gage, F.H. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. **Mol. Psychiatry** 5, 262–269, 2000.
- Jain, S., Banerjee, B.D., Ahmed, R.S., Arora, V.K., and Mediratta, P.K. Possible role of oxidative stress and brain derived neurotrophic factor in triazophos induced cognitive impairment in rats. **Neurochem. Res.** 38, 2136–2147, 2013.
- Janowski, B.A., Grogan, M.J., Jones, S.A., Wisely, G.B., Kliewer, S.A., Corey, E.J., and Mangelsdorf, D.J. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 96, 266–271, 1999.
- Kannan, S., Nicola, Z., Overall, R.W., Ichwan, M., Ramírez-Rodríguez, G., N. Grzyb, A., Patone, G., Saar, K., Hübner, N., and Kempermann, G. Systems Genetics Analysis of a Recombinant Inbred Mouse Cell Culture Panel Reveals Wnt Pathway Member Lrp6 as a Regulator of Adult Hippocampal Precursor Cell Proliferation: Lrp6 Regulates Hippocampal Neurogenesis. **STEM CELLS** 34, 674–684, 2016.
- Kannangara, T.S., Eadie, B.D., Bostrom, C.A., Morch, K., Brocardo, P.S., and Christie, B.R. GluN2A ^{-/-} Mice Lack Bidirectional Synaptic Plasticity in the Dentate Gyrus and Perform Poorly on Spatial Pattern Separation Tasks. **Cereb. Cortex** 25, 2102–2113, 2015.
- Kaplan, M.S., and Hinds, J.W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. **Science** 197, 1092–1094, 1977.
- Kempermann, G., and Kronenberg, G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. **Biol. Psychiatry** 54, 499–503, 2003.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature** 386, 493–495, 1997.

- Kempermann, G., Gast, D., and Gage, F.H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. **Ann. Neurol.** 52, 135–143, 2002.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., and Gage, F.H. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. **Dev. Camb. Engl.** 130, 391–399, 2003.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., and Kronenberg, G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. **Trends Neurosci.** 27, 447–452, 2004.
- Kempermann, G., Krebs, J., and Fabel, K. The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. **Curr. Opin. Psychiatry** 21, 290–295, 2008.
- Kempermann, G., Song, H., and Gage, F.H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** 7, a018812, 2015.
- Kendler, K.S., Karkowski, L.M., and Prescott, C.A. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. **Am. J. Psychiatry** 156, 837–841, 1999.
- Kesner, R.P. A behavioral analysis of dentate gyrus function. **Prog. Brain Res.** 163, 567–576, 2007.
- Kesner, R.P., Evans, R.B., and Hunt, M.A. Further evidence in support of the neurobiological bases of an attribute model of memory: role of the hippocampus. **Int. J. Neurol.** 21–22, 184–196, 1987.
- Kesner, R.P., Lee, I., and Gilbert, P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. **Rev. Neurosci.** 15, 333–351, 2004.
- Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M.P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., and Nissinen, A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. **BMJ** 322, 1447–1451, 2001.
- Koch, S., Donarski, N., Goetze, K., Kreckel, M., Stuerenburg, H.J., Buhmann, C., and Beisiegel, U. Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. **J. Lipid Res.** 42, 1143–1151, 2001.
- Kohman, R.A., and Rhodes, J.S. Neurogenesis, inflammation and behavior. **Brain. Behav. Immun.** 27, 22–32, 2013.
- Konradi, C., Riederer, P., and Youdim, M.B. Hydrogen peroxide enhances the activity of monoamine oxidase type-B but not of

- type-A: a pilot study. **J. Neural Transm. Suppl.** 22, 61–73, 1986.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Annu. Rev. Neurosci.** 32, 149–184, 2009.
- Krishnan, K.R., and McDonald, W.M. Arteriosclerotic depression. **Med. Hypotheses** 44, 111–115, 1995.
- Krishnan, K.R., Hays, J.C., and Blazer, D.G. MRI-defined vascular depression. **Am. J. Psychiatry** 154, 497–501, 1997.
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M.D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., and Kempermann, G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. **J. Comp. Neurol.** 467, 455–463, 2003.
- Kubera, M., Obuchowicz, E., Goehler, L., Brzeszcz, J., and Maes, M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry** 35, 744–759, 2011.
- Kütt, H., Herz, J., and Stanley, K.K. Structure of the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) promoter. **Biochim. Biophys. Acta** 1009, 229–236, 1989.
- Lamprecht, R., and LeDoux, J. Structural plasticity and memory. **Nat. Rev. Neurosci.** 5, 45–54, 2004.
- Lee, A.K., Mojtahed-Jaberi, M., Kyriakou, T., Astarloa, E.A.-O., Arno, M., Marshall, N.J., Brain, S.D., and O’Dell, S.D. Effect of high-fat feeding on expression of genes controlling availability of dopamine in mouse hypothalamus. **Nutrition.** 26, 411–422, 2010.
- Lee, J., Duan, W., and Mattson, M.P. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. **J. Neurochem.** 82, 1367–1375, 2002.
- Leigh, S.E.A., Foster, A.H., Whittall, R.A., Hubbart, C.S., and Humphries, S.E. Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. **Ann. Hum. Genet.** 72, 485–498, 2008.
- Leonard, B., and Maes, M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in

- the pathophysiology of unipolar depression. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 36, 764–785, 2012.
- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., and Moser, E.I. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. **Science** 315, 961–966, 2007.
- Linetti, A., Fratangeli, A., Taverna, E., Valnegri, P., Francolini, M., Cappello, V., Matteoli, M., Passafaro, M., and Rosa, P. Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. **J. Cell Sci.** 123, 595–605, 2010.
- Linnarsson, S., Willson, C.A., and Ernfors, P. Cell death in regenerating populations of neurons in BDNF mutant mice. **Brain Res. Mol. Brain Res.** 75, 61–69, 2000.
- Liu, L., Zhang, K., Sandoval, H., Yamamoto, S., Jaiswal, M., Sanz, E., Li, Z., Hui, J., Graham, B.H., Quintana, A., et al. Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. **Cell** 160, 177–190, 2015.
- Liu, Q., Trotter, J., Zhang, J., Peters, M.M., Cheng, H., Bao, J., Han, X., Weeber, E.J., and Bu, G. Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. **J. Neurosci.** 30, 17068–17078, 2010.
- Liu, Q., An, Y., Yu, H., Lu, Y., Feng, L., Wang, C., and Xiao, R. Relationship between oxysterols and mild cognitive impairment in the elderly: a case-control study. **Lipids Health Dis.** 15, 177, 2016.
- Löffler, T., Flunkert, S., Havas, D., Sántha, M., Hutter-Paier, B., Steyrer, E., and Windisch, M. Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPPsl mice. **Neurobiol. Aging** 34, 2379–2388, 2013.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265–275, 1951.
- Luiz da Silva, E., Tsushida, T., and Terao, J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. **Arch. Biochem. Biophys.** 349, 313–320, 1998.
- Luo, D.D., An, S.C., and Zhang, X. Involvement of hippocampal serotonin and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress. **Brain Res. Bull.** 77, 8–12, 2008.
- Ma, K.-G., Lv, J., Hu, X.-D., Shi, L.-L., Chang, K.-W., Chen, X.-L., Qian, Y.-H., Yang, W.-N., and Qu, Q.-M. The p38 mitogen-

- activated protein kinase signaling pathway is involved in regulating low-density lipoprotein receptor-related protein 1-mediated β -amyloid protein internalization in mouse brain. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 76, 75–86, 2016.
- Maes, M., Yirmiya, R., Noraberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G., Kubera, M., Bob, P., Lerer, B., and Maj, M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metab. Brain Dis.** 24, 27–53, 2009.
- Maes, M., Fišar, Z., Medina, M., Scapagnini, G., Nowak, G., and Berk, M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates—Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. **Inflammopharmacology** 20, 127–150, 2012.
- Makar, R.S., Lipsky, P.E., and Cuthbert, J.A. Sterol-independent, sterol response element-dependent, regulation of low density lipoprotein receptor gene expression. **J. Lipid Res.** 39, 1647–1654, 1998.
- Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., and Duman, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J. Neurosci.** 20, 9104–9110, 2000.
- Marosi, K., and Mattson, M.P. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. **Trends Endocrinol. Metab.** 25, 89–98, 2014.
- Marr, D. Simple memory: a theory for archicortex. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 262, 23–81, 1971.
- Martin, C.R., Preedy, V.R., and Abbatecola, A.M. Diet and nutrition in dementia and cognitive decline.
- Martín-de-Saavedra, M.D., Budni, J., Cunha, M.P., Gómez-Rangel, V., Llorio, S., del Barrio, L., Lastres-Becker, I., Parada, E., Tordera, R.M., Rodrigues, A.L.S., et al. Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. **Psychoneuroendocrinology** 38, 2010–2022, 2013.
- Matsumoto, T., Suzuki, O., Furuta, T., Asai, M., Kurokawa, Y., Nimura, Y., Katsumata, Y., and Takahashi, I. A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. **Clin. Biochem.** 18, 126–129, 1985.
- Maxfield, F.R., and Wüstner, D. Intracellular cholesterol transport. **J. Clin. Invest.** 110, 891–898, 2002.
- McEwen, B.S. Stress and hippocampal plasticity. **Annu. Rev. Neurosci.**

- 22, 105–122, 1999.
- McKenney, J.M. Understanding PCSK9 and anti-PCSK9 therapies. **J. Clin. Lipidol.** 9, 170–186, 2015.
- Meyer, J.H., Ginovart, N., Boovariwala, A., Sagrati, S., Hussey, D., Garcia, A., Young, T., Praschak-Rieder, N., Wilson, A.A., and Houle, S. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. **Arch. Gen. Psychiatry** 63, 1209–1216, 2006.
- Ming, G., and Song, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. **Neuron** 70, 687–702, 2011.
- Minichiello, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nat. Rev. Neurosci.** 10, 850–860, 2009.
- Modrego, P.J., and Ferrández, J. Depression in patients with mild cognitive impairment increases the risk of developing dementia of Alzheimer type: a prospective cohort study. **Arch. Neurol.** 61, 1290–1293, 2004.
- Molendijk, M.L., Bus, B. a. A., Spinhoven, P., Penninx, B.W.J.H., Kenis, G., Prickaerts, J., Voshaar, R.C.O., and Elzinga, B.M. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. **Mol. Psychiatry** 16, 1088–1095, 2011.
- Monje, M.L., Toda, H., and Palmer, T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science** 302, 1760–1765, 2003.
- Moreira, E.L.G., de Oliveira, J., Nunes, J.C., Santos, D.B., Nunes, F.C., Vieira, D.S.C., Ribeiro-do-Valle, R.M., Pamplona, F.A., de Bem, A.F., Farina, M., et al. Age-related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}): evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **J. Alzheimers Dis. JAD** 32, 495–511, 2012.
- Moreira, E.L.G., Aguiar, A.S., de Carvalho, C.R., Santos, D.B., de Oliveira, J., de Bem, A.F., Xikota, J.C., Walz, R., Farina, M., and Prediger, R.D. Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia. **Neurosci. Lett.** 541, 193–198, 2013.
- Moreira, E.L.G., de Oliveira, J., Engel, D.F., Walz, R., de Bem, A.F., Farina, M., and Prediger, R.D.S. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of

- acetylcholinesterase activity as an early and causal event? **J. Neural Transm.** 121, 415–426, 2014.
- Moreira, E.L., de Oliveira J, Prediger RD, Farina M, de Bem AF. Hypercholesterolemia as a risk factor for Alzheimer's disease: a review. In: Martin CR e Preedy VR (Ed.). *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*. Taramani: Elsevier, 2015.
- Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., dos Santos, D.B., Budni, J., de Freitas, A.E., Farina, M., and Severo Rodrigues, A.L. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J. Psychiatr. Res.** 46, 331–340, 2012.
- Mousseau, D.D., and Baker, G.B. Recent developments in the regulation of monoamine oxidase form and function: is the current model restricting our understanding of the breadth of contribution of monoamine oxidase to brain [dys]function? **Curr. Top. Med. Chem.** 12, 2163–2176, 2012.
- Mukherjee, S., Zha, X., Tabas, I., and Maxfield, F.R. Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. **Biophys. J.** 75, 1915–1925, 1998.
- Mulder, M., Jansen, P.J., Janssen, B.J.A., van de Berg, W.D.J., van der Boom, H., Havekes, L.M., de Kloet, R.E., Ramaekers, F.C.S., and Blokland, A. Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. **Neurobiol. Dis.** 16, 212–219, 2004.
- Mulder, M., Koopmans, G., Wassink, G., Al Mansouri, G., Simard, M.-L., Havekes, L.M., Prickaerts, J., and Blokland, A. LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. **Neurosci. Res.** 59, 251–256, 2007.
- Muller, C.P., Stephany, D.A., Winkler, D.F., Hoeg, J.M., Demosky, S.J., and Wunderlich, J.R. Filipin as a flow microfluorometry probe for cellular cholesterol. **Cytometry** 5, 42–54, 1984.
- Munhoz, T.N., Nunes, B.P., Wehrmeister, F.C., Santos, I.S., and Matijasevich, A. A nationwide population-based study of depression in Brazil. **J. Affect. Disord.** 192, 226–233, 2016.
- Nakao, M., Ando, K., Nomura, S., Kuboki, T., Uehara, Y., Toyooka, T., and Fujita, T. Depressive mood accompanies hypercholesterolemia in young Japanese adults. **Jpn. Heart J.** 42,

- 739–748, 2001a.
- Nakao, M., Ando, K., Nomura, S., Kuboki, T., Uehara, Y., Toyooka, T., and Fujita, T. Depressive mood accompanies hypercholesterolemia in young Japanese adults. **Jpn. Heart J.** 42, 739–748, 2001b.
- Nakato, M., Matsuo, M., Kono, N., Arita, M., Arai, H., Ogawa, J., Kioka, N., and Ueda, K. Neurite outgrowth stimulation by n-3 and n-6 PUFAs of phospholipids in apoE-containing lipoproteins secreted from glial cells. **J. Lipid Res.** 56, 1880–1890, 2015.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., Cuchillo, C., and Lehninger, A.L. *Lehninger principios de bioquímica* (Barcelona: Omega).
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., and Monteggia, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron** 34, 13–25, 2002a.
- Nestler, E.J., Gould, E., Manji, H., Buncan, M., Duman, R.S., Greshenfeld, H.K., Hen, R., Koester, S., Lederhendler, I., Meaney, M., et al. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biol. Psychiatry** 52, 503–528, 2002b.
- Nibuya, M., Morinobu, S., and Duman, R.S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. **J. Neurosci.** 15, 7539–7547, 1995.
- Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., and Eriksson, P.S. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. **J. Neurobiol.** 39, 569–578, 1999.
- Nordestgaard, B.G., Chapman, M.J., Humphries, S.E., Ginsberg, H.N., Masana, L., Descamps, O.S., Wiklund, O., Hegele, R.A., Raal, F.J., Defesche, J.C., et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. **Eur. Heart J.** 34, 3478–3490a, 2013.
- Nottebohm, F. From bird song to neurogenesis. **Sci. Am.** 260, 74–79, 1989.
- de Oliveira, J., Hort, M.A., Moreira, E.L.G., Glaser, V., Ribeiro-do-Valle, R.M., Prediger, R.D., Farina, M., Latini, A., and de Bem, A.F. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience** 197, 99–106, 2011.

- de Oliveira, J., Moreira, E.L.G., dos Santos, D.B., Piermartiri, T.C., Dutra, R.C., Pinton, S., Tasca, C.I., Farina, M., Prediger, R.D.S., and de Bem, A.F. Increased susceptibility to amyloid- β -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **J. Alzheimers Dis.** 41, 43–60, 2014.
- Overall, R.W., Paszkowski-Rogacz, M., and Kempermann, G. The mammalian adult neurogenesis gene ontology (MANGO) provides a structural framework for published information on genes regulating adult hippocampal neurogenesis. **PLoS One** 7, e48527, 2012.
- Overall, R.W., Walker, T.L., Fischer, T.J., Brandt, M.D., and Kempermann, G. Different Mechanisms Must Be Considered to Explain the Increase in Hippocampal Neural Precursor Cell Proliferation by Physical Activity. **Front. Neurosci.** 10, 2016.
- Pak, Y.K., Kanuck, M.P., Berrios, D., Briggs, M.R., Cooper, A.D., and Ellsworth, J.L. Activation of LDL receptor gene expression in HepG2 cells by hepatocyte growth factor. **J. Lipid Res.** 37, 985–998, 1996.
- Palmer, T.D., Takahashi, J., and Gage, F.H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. **Mol. Cell. Neurosci.** 8, 389–404, 1997.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R., and Gage, F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **J. Comp. Neurol.** 425, 479–494, 2000.
- Papakostas, G.I., Petersen, T., Sonawalla, S.B., Merens, W., Iosifescu, D.V., Alpert, J.E., Fava, M., and Nierenberg, A.A. Serum cholesterol in treatment-resistant depression. **Neuropsychobiology** 47, 146–151, 2003.
- Parada, C., Escolà-Gil, J.C., and Bueno, D. Low-density lipoproteins from embryonic cerebrospinal fluid are required for neural differentiation. **J. Neurosci. Res.** 86, 2674–2684, 2008.
- Paykel, E.S. Stress and affective disorders in humans. **Semin. Clin. Neuropsychiatry** 6, 4–11, 2001.
- Persons, J.E. and Fiedorowicz, J.G. Depression and serum low-density lipoprotein: A systematic review and meta-analysis. **J Affect Disord** 206, 55–67, 2016.
- Petrov, A.M., Kasimov, M.R., and Zefirov, A.L. Brain Cholesterol Metabolism and Its Defects: Linkage to Neurodegenerative Diseases and Synaptic Dysfunction. **Acta Naturae** 8, 58–73, 2016.
- Pfenninger, K.H. Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean

- task. **Nat. Rev. Neurosci.** 10, 251–261, 2009.
- Pfrieger, F.W. Outsourcing in the brain: Do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? **BioEssays** 25, 72–78, 2003.
- Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Hui, D., and Weisgraber, K.H. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. **J. Biol. Chem.** 262, 14352–14360, 1987.
- Pittenger, C., and Duman, R.S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacol.** 33, 88–109, 2008.
- Pol, A., Gross, S.P., and Parton, R.G. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. **J. Cell Biol.** 204, 635–646, 2014.
- van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat. Neurosci.** 2, 266–270, 1999a.
- van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., and Gage, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 96, 13427–13431, 1999b.
- van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat. Rev. Neurosci.** 1, 191–198, 2000.
- Prasanthi, J.R., Huls, A., Thomasson, S., Thompson, A., Schommer, E., and Ghribi, O. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Mol. Neurodegener.** 4, 1, 2009.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes. **Cell** 122, 735–749, 2005.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., and Minor, L. Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, N.P. Coussens, H. Nelson, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, P.W. Iversen, et al., eds. (Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences), p.
- Rodrigues, A.L.S., da Silva, G.L., Mateussi, A.S., Fernandes, E.S., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., and Santos, A.R.S. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like

- effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.** 70, 1347–1358, 2002.
- Roy Chowdhury, S.K., Sangle, G.V., Xie, X., Stelmack, G.L., Halayko, A.J., and Shen, G.X. Effects of extensively oxidized low-density lipoprotein on mitochondrial function and reactive oxygen species in porcine aortic endothelial cells. **AJP Endocrinol. Metab.** 298, E89–E98, 2010.
- Rudling, M., Olivecrona, H., Eggertsen, G., and Angelin, B. Regulation of rat hepatic low density lipoprotein receptors. In vivo stimulation by growth hormone is not mediated by insulin-like growth factor I. **J. Clin. Invest.** 97, 292–299, 1996.
- Russell, D.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. **J. Biol. Chem.** 264, 21682–21688, 1989.
- Safina, D., Schlitt, F., Romeo, R., Pflanzner, T., Pietrzik, C.U., Narayanaswami, V., Edenhofer, F., and Faissner, A. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a novel modulator of radial glia stem cell proliferation, survival, and differentiation. **Glia** 64, 1363–1380, 2016.
- Sahay, A., and Hen, R. Hippocampal neurogenesis and depression. **Novartis Found. Symp.** 289, 152-160-164, 193–195, 2008.
- Saito, K., Dubreuil, V., Arai, Y., Wilsch-Bräuninger, M., Schwudke, D., Saher, G., Miyata, T., Breier, G., Thiele, C., Shevchenko, A., et al. Ablation of cholesterol biosynthesis in neural stem cells increases their VEGF expression and angiogenesis but causes neuron apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 106, 8350–8355, 2009.
- Sakakura, Y., Shimano, H., Sone, H., Takahashi, A., Inoue, N., Toyoshima, H., Suzuki, S., Yamada, N., and Inoue, K. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 286, 176–183, 2001.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science** 301, 805–809, 2003.
- Santos, R.D., and Maranhao, R.C. What is new in familial hypercholesterolemia? **Curr. Opin. Lipidol.** 25, 183–188, 2014.
- Satyanarayana, A., and Kaldis, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory

- mechanisms. **Oncogene** 28, 2925–2939, 2009.
- Schildkraut, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. 1965. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.** 7, 524–533–524, 1995.
- Scholzen, T., and Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J. Cell. Physiol.** 182, 311–322, 2000.
- Seri, B., García-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., and Alvarez-Buylla, A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. **J. Neurosci.** 21, 7153–7160, 2001.
- Sharpe, L.J., and Brown, A.J. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). **J. Biol. Chem.** 288, 18707–18715, 2013.
- Sheline, Y.I. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. **Biol. Psychiatry** 48, 791–800, 2000.
- Sherif, F., Marcusson, J., and Orelund, L. Brain gamma-aminobutyrate transaminase and monoamine oxidase activities in suicide victims. **Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.** 241, 139–144, 1991.
- Shimabukuro, M.K., Langhi, L.G.P., Cordeiro, I., Brito, J.M., Batista, C.M. de C., Mattson, M.P., and Mello Coelho, V. de Lipid-laden cells differentially distributed in the aging brain are functionally active and correspond to distinct phenotypes. **Sci. Rep.** 6, 23795, 2016.
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S., et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biol. Psychiatry** 54, 70–75, 2003.
- Shirayama, Y., Chen, A.C.-H., Nakagawa, S., Russell, D.S., and Duman, R.S. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J. Neurosci.** 22, 3251–3261, 2002.
- Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., and Gould, E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. **Nature** 410, 372–376, 2001.
- Silva, M.T., Galvao, T.F., Martins, S.S., and Pereira, M.G. Prevalence of depression morbidity among Brazilian adults: a systematic review and meta-analysis. **Rev. Bras. Psiquiatr.** 36, 262–270, 2014.
- Siuciak, J.A., Lewis, D.R., Wiegand, S.J., and Lindsay, R.M.

- Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Pharmacol. Biochem. Behav.** 56, 131–137, 1997.
- Sneed, J.R., and Culang-Reinlieb, M.E. The vascular depression hypothesis: an update. **Am. J. Geriatr. Psychiatry.** 19, 99–103, 2011.
- Soccio, R.E., and Breslow, J.L. Intracellular cholesterol transport. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 24, 1150–1160, 2004.
- Soeda, S., Terao, T., Iwata, N., Abe, H., Uchida, K., and Nakamura, J. Mental effect of cholesterol in males: protective effect? **J. Affect. Disord.** 91, 139–144, 2006.
- Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J., and Whitmer, R.A. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. **Dement. Geriatr. Cogn. Disord.** 28, 75–80, 2009.
- Sonawalla, S.B., Papakostas, G.I., Petersen, T.J., Yeung, A.S., Smith, M.M., Sickinger, A.H., Gordon, J., Israel, J.A., Tedlow, J.R., Lamon-Fava, S., et al. Elevated cholesterol levels associated with nonresponse to fluoxetine treatment in major depressive disorder. **Psychosomatics** 43, 310–316, 2002.
- Soufi, M., Sattler, A.M., Maisch, B., and Schaefer, J.R. Molecular mechanisms involved in atherosclerosis. **Herz** 27, 637–648, 2002.
- Soufi, M., Kurt, B., Schweer, H., Sattler, A.M., Klaus, G., Zschocke, J., and Schaefer, J.R. Genetics and kinetics of familial hypercholesterolemia, with the special focus on FH-(Marburg) p.W556R. **Atheroscler. Suppl.** 10, 5–11, 2009.
- Soutar, A.K., and Naoumova, R.P. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. **Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.** 4, 214–225, 2007.
- Spandl, J., White, D.J., Peychl, J., and Thiele, C. Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540. **Traffic Cph. Den.** 10, 1579–1584, 2009.
- Sparks, D.L., Sabbagh, M.N., Connor, D.J., Lopez, J., Launer, L.J., Petanceska, S., Browne, P., Wassar, D., Johnson-Traver, S., Lochhead, J., et al. Atorvastatin therapy lowers circulating cholesterol but not free radical activity in advance of identifiable clinical benefit in the treatment of mild-to-moderate AD. **Curr. Alzheimer Res.** 2, 343–353, 2005.
- Sposito A.C., Caramelli, B., Fonseca, F.A., Bertolami, M.C., Afíune Neto, A., Souza, A.D., Lottenberg, A.M., Chacra, A.P., Faludi, A. A., Loures-Vale, A. A., et al. [IV Brazilian Guideline for

- Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. **Arq Bras Cardiol.** 88 Suppl 1, 2-19, 2007.
- Squire, L.R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychol. Rev.** 99, 195–231, 1992.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., and Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology.** 85, 367–370, 1985.
- Stolp, H.B., and Molnár, Z. Neurogenic niches in the brain: help and hindrance of the barrier systems. **Front. Neurosci.** 9, 2015.
- Strekalova, T., Evans, M., Costa-Nunes, J., Bachurin, S., Yeritsyan, N., Couch, Y., Steinbusch, H.M.W., Eleonore Köhler, S., Lesch, K.-P., and Anthony, D.C. Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. **Brain. Behav. Immun.** 48, 42–47, 2015.
- Takehashi, M., Tanaka, S., Masliah, E., and Ueda, K. Association of monoamine oxidase A gene polymorphism with Alzheimer's disease and Lewy body variant. **Neurosci. Lett.** 327, 79–82, 2002.
- Taupin, P. Adult neurogenesis and neural stem cells in mammals (New York: Nova Biomedical Books).
- Thirumangalakudi, L., Prakasam, A., Zhang, R., Bimonte-Nelson, H., Sambamurti, K., Kindy, M.S., and Bhat, N.R. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **J. Neurochem.** 106, 475–485, 2008.
- Thompson Ray, M., Weickert, C.S., Wyatt, E., and Webster, M.J. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. **J. Psychiatry Neurosci.** 36, 195–203, 2011.
- Tiemeier, H., van Dijck, W., Hofman, A., Witteman, J.C.M., Stijnen, T., and Breteler, M.M.B. Relationship between atherosclerosis and late-life depression: the Rotterdam Study. **Arch. Gen. Psychiatry** 61, 369–376, 2004.
- Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D.J. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. **Mol. Endocrinol.** 17, 985–993, 2003.
- Tozawa, R., Ishibashi, S., Osuga, J., Yamamoto, K., Yagyu, H., Ohashi, K., Tamura, Y., Yahagi, N., Iizuka, Y., Okazaki, H., et al. Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the major

- receptor subunit. Its obligate requirement for the stable expression of oligomeric receptor. **J. Biol. Chem.** 276, 12624–12628, 2001.
- Tyrovolas, S., Lionis, C., Zeimbekis, A., Bountziouka, V., Micheli, M., Katsarou, A., Papairakleous, N., Metallinos, G., Makri, K., Polychronopoulos, E., et al. Increased body mass and depressive symptomatology are associated with hypercholesterolemia, among elderly individuals; results from the MEDIS study. **Lipids Health Dis.** 8, 10, 2009.
- Vaidya, V.A., and Duman, R.S. Depression--emerging insights from neurobiology. **Br. Med. Bull.** 57, 61–79, 2001.
- Van der Kooy, K., van Hout, H., Marwijk, H., Marten, H., Stehouwer, C., and Beekman, A. Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta analysis. **Int. J. Geriatr. Psychiatry** 22, 613–626, 2007.
- Van Praag, H., Kempermann, G. and Gage, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci.** 2, 266–270, 1999.
- Vance, J.E., Pan, D., Campenot, R.B., Bussi re, M., and Vance, D.E. Evidence that the major membrane lipids, except cholesterol, are made in axons of cultured rat sympathetic neurons. **J. Neurochem.** 62, 329–337, 1994.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.** 36, 131–149, 2003.
- Vinuesa, A., Pomilio, C., Menafr , M., Bonaventura, M.M., Garay, L., Mercogliano, M.F., Schillaci, R., Lux Lantos, V., Brites, F., Beauquis, J., et al. Juvenile exposure to a high fat diet promotes behavioral and limbic alterations in the absence of obesity. **Psychoneuroendocrinology** 72, 22–33, 2016.
- Vural, M., Satirođlu, O., Akbař, B., G ksel, I., and Karabay, O. Association between depression and anxiety symptoms and major atherosclerosis risk factors in patients with chest pain. **Tohoku J. Exp. Med.** 212, 169–175, 2007.
- Vural, M., Satirođlu, O., Akbas, B., Goksel, I., and Karabay, O. Coronary artery disease in association with depression or anxiety among patients undergoing angiography to investigate chest pain. **Tex. Heart Inst. J.** 36, 17–23, 2009.
- Walker, T.L., and Kempermann, G. One mouse, two cultures: isolation and culture of adult neural stem cells from the two neurogenic zones of individual mice. **J. Vis. Exp.** e51225, 2014.

- Walsh, B., and Henderson, D. Microarrays and beyond: what potential do current and future genomics tools have for breeders? **J. Anim. Sci.** 82 E-Suppl, E292-299, 2004.
- Wang, H., Yuan, L., Ma, W., Han, J., Lu, Y., Feng, L., and Xiao, R. The cytotoxicity of 27-hydroxycholesterol in co-cultured SH-SY5Y cells and C6 cells. **Neurosci. Lett.** 632, 209–217, 2016a.
- Wang, H.-L., Wang, Y.-Y., Liu, X.-G., Kuo, S.-H., Liu, N., Song, Q.-Y., and Wang, M.-W. Cholesterol, 24-Hydroxycholesterol, and 27-Hydroxycholesterol as Surrogate Biomarkers in Cerebrospinal Fluid in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. **J. Alzheimers Dis.** 51, 45–55, 2016b.
- Wasan, K.M., Brocks, D.R., Lee, S.D., Sachs-Barrable, K., and Thornton, S.J. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.** 7, 84–99, 2008.
- Watts, G.F., Gidding, S., Wierzbicki, A.S., Toth, P.P., Alonso, R., Brown, W.V., Bruckert, E., Defesche, J., Lin, K.K., Livingston, M., et al. Integrated guidance on the care of familial hypercholesterolemia from the International FH Foundation. **J. Clin. Lipidol.** 8, 148–172, 2014.
- WHO. Depression: a global public health concern. 2012.
- Yadid, G., Nakash, R., Deri, I., Tamar, G., Kinor, N., Gispan, I., and Zangen, A. Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model. **Prog. Neurobiol.** 62, 353–378, 2000.
- Yang, C.-P., Gilley, J.A., Zhang, G., and Kernie, S.G. ApoE is required for maintenance of the dentate gyrus neural progenitor pool. **Development** 138, 4351–4362, 2011.
- Yang, W.-N., Ma, K.-G., Qian, Y.-H., Zhang, J.-S., Feng, G.-F., Shi, L.-L., Zhang, Z.-C., and Liu, Z.-H. Mitogen-activated protein kinase signaling pathways promote low-density lipoprotein receptor-related protein 1-mediated internalization of beta-amyloid protein in primary cortical neurons. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 64, 252–264, 2015.
- Yeagle, P.L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochim. Biophys. Acta** 822, 267–287, 1985.
- Youdim, M.B.H., and Bakhle, Y.S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **Br. J. Pharmacol.** 147 Suppl 1, S287-296, 2006.
- Youdim, M.B.H., and Tipton, K.F. Rat striatal monoamine oxidase-B inhibition by l-deprenyl and rasagiline: its relationship to 2-

- phenylethylamine-induced stereotypy and Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.** 8, 247–253, 2002.
- Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., de Vries-Van der Weij, J., van der Hoorn, J., Princen, H.M., and Kooistra, T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 27, 1706–1721, 2007.
- Zambón, D., Quintana, M., Mata, P., Alonso, R., Benavent, J., Cruz-Sánchez, F., Gich, J., Pocoví, M., Civeira, F., Capurro, S., et al. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **Am. J. Med.** 123, 267–274, 2010.
- Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell** 132, 645–660, 2008.
- Zilles, K. Neuronal plasticity as an adaptive property of the central nervous system. **Ann. Anat.** 174, 383–391, 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Lista de genes com expressão relativa reduzida pelo tratamento com LDL (100 µg/mL)

| Gene | logFC | p ajustado (FDR) |
|-------------|--------------|-------------------------|
| Ldlr | -2,42 | 0,062 |
| Hmgcs1 | -2,13 | 0,006 |
| Dhcr24 | -2,12 | 0,008 |
| Idi1 | -2,10 | 0,017 |
| Msmo1 | -1,92 | 0,017 |
| Fdps | -1,90 | 0,005 |
| Insig1 | -1,85 | 0,020 |
| Cyp51 | -1,78 | 0,008 |
| Tm7sf2 | -1,78 | 0,008 |
| Scd1 | -1,50 | 0,032 |
| Stard4 | -1,47 | 0,017 |
| Psg16 | -1,45 | 0,017 |
| Lss | -1,43 | 0,018 |
| Fdft1 | -1,41 | 0,095 |
| Nsdhl | -1,34 | 0,008 |
| Pla2g3 | -1,34 | 0,039 |
| Srebfl | -1,24 | 0,050 |
| Elovl6 | -1,13 | 0,017 |
| Hmgcr | -1,12 | 0,048 |
| Mvd | -1,05 | 0,055 |
| Sc5d | -0,96 | 0,062 |
| Mvk | -0,92 | 0,055 |
| Pcyt2 | -0,82 | 0,058 |

APÊNDICE B – Lista de termos associados aos genes com expressão relativa reduzida pelo tratamento com LDL, resultantes da análise de ontologia.

| Termo associado (<i>Gene ontology analysis</i>) | p ajustado (FDR) |
|--|-------------------------|
| <i>sterol biosynthetic process</i> | 1.27E-30 |
| <i>steroid metabolic process</i> | 3.25E-29 |
| <i>cholesterol biosynthetic process</i> | 2.78E-29 |
| <i>secondary alcohol biosynthetic process</i> | 3.6E-29 |
| <i>sterol metabolic process</i> | 3.97E-29 |
| <i>cholesterol metabolic process</i> | 5.04E-27 |
| <i>secondary alcohol metabolic process</i> | 8.18E-27 |
| <i>steroid biosynthetic process</i> | 1.55E-25 |
| <i>alcohol biosynthetic process</i> | 5.02E-25 |
| <i>lipid biosynthetic process</i> | 2.03E-24 |
| <i>organic hydroxy compound biosynthetic process</i> | 6.18E-24 |
| <i>lipid metabolic process</i> | 2.52E-23 |
| <i>alcohol metabolic process</i> | 1.78E-22 |
| <i>organic hydroxy compound metabolic process</i> | 4.2E-22 |
| <i>small molecule biosynthetic process</i> | 1.02E-21 |
| <i>single-organism biosynthetic process</i> | 7.38E-19 |
| <i>small molecule metabolic process</i> | 9.96E-17 |
| <i>single-organism metabolic process</i> | 1.24E-14 |
| <i>cellular lipid metabolic process</i> | 2.65E-12 |
| <i>isoprenoid biosynthetic process</i> | 1.42E-10 |
| <i>organic substance biosynthetic process</i> | 2.2E-8 |
| <i>biosynthetic process</i> | 3.15E-8 |
| <i>isoprenoid metabolic process</i> | 5.71E-8 |
| <i>organic cyclic compound metabolic process</i> | 2.65E-7 |
| <i>organic cyclic compound biosynthetic process</i> | 3.83E-7 |
| <i>primary metabolic process</i> | 4.66E-6 |

| | |
|---|---------|
| <i>organic substance metabolic process</i> | 1.41E-5 |
| <i>regulation of steroid metabolic process</i> | 2.27E-5 |
| <i>positive regulation of steroid metabolic process</i> | 2.21E-5 |
| <i>metabolic process</i> | 4.01E-5 |
| <i>oxidation-reduction process</i> | 4.19E-5 |
| <i>phospholipid metabolic process</i> | 1.18E-4 |
| <i>positive regulation of lipid metabolic process</i> | 1.67E-4 |
| <i>regulation of lipid biosynthetic process</i> | 1.8E-4 |
| <i>regulation of lipid metabolic process</i> | 2.4E-4 |
| <i>regulation of steroid biosynthetic process</i> | 3.07E-4 |
| <i>farnesyl diphosphate metabolic process</i> | 4.51E-4 |
| <i>positive regulation of lipid biosynthetic process</i> | 5.41E-4 |
| <i>positive regulation of steroid biosynthetic process</i> | 9.73E-4 |
| <i>isopentenyl diphosphate biosynthetic process, mevalonate pathway</i> | 1.25E-3 |
| <i>isopentenyl diphosphate biosynthetic process</i> | 1.22E-3 |
| <i>organophosphate metabolic process</i> | 1.27E-3 |
| <i>fatty acid biosynthetic process</i> | 1.36E-3 |
| <i>single-organism process</i> | 1.49E-3 |
| <i>isopentenyl diphosphate metabolic process</i> | 2.22E-3 |
| <i>phospholipid biosynthetic process</i> | 3.09E-3 |
| <i>monocarboxylic acid biosynthetic process</i> | 3.32E-3 |
| <i>steroid esterification</i> | 3.47E-3 |
| <i>sterol esterification</i> | 3.4E-3 |
| <i>cholesterol esterification</i> | 3.33E-3 |
| <i>fatty acid metabolic process</i> | 4.38E-3 |
| <i>cholesterol import</i> | 4.8E-3 |
| <i>sterol import</i> | 4.71E-3 |
| <i>positive regulation of cholesterol biosynthetic process</i> | 6.47E-3 |
| <i>positive regulation of cholesterol metabolic process</i> | 6.35E-3 |

| | |
|---|----------|
| <i>cellular biosynthetic process</i> | 8.03E-3 |
| <i>positive regulation of cholesterol esterification</i> | 1.05E-2 |
| <i>carboxylic acid biosynthetic process</i> | 1.17E-2 |
| <i>regulation of cholesterol esterification</i> | 1.55E-2 |
| <i>organic acid biosynthetic process</i> | 1.53E-2 |
| <i>monocarboxylic acid metabolic process</i> | 2.01E-2 |
| <i>long-chain fatty acid biosynthetic process</i> | 2.43E-2 |
| <i>regulation of cholesterol biosynthetic process</i> | 3.15E-2 |
| <i>positive regulation of triglyceride biosynthetic process</i> | 3.51E-2 |
| <i>regulation of cellular ketone metabolic process</i> | 4.01E-2 |
| <i>response to fatty acid</i> | 4.75E-2 |
| <i>positive regulation of alcohol biosynthetic process</i> | 5.17E-2 |
| <i>regulation of triglyceride biosynthetic process</i> | 5.09E-2 |
| <i>regulation of cholesterol metabolic process</i> | 6.58E-2 |
| <i>organophosphate biosynthetic process</i> | 7.09E-2 |
| <i>acetyl-CoA metabolic process</i> | 7.52E-2 |
| <i>positive regulation of triglyceride metabolic process</i> | 8,00E-02 |
| <i>regulation of fatty acid biosynthetic process</i> | 1.11E-1 |
| <i>carboxylic acid metabolic process</i> | 1.17E-1 |
| <i>oxoacid metabolic process</i> | 1.2E-1 |
| <i>regulation of alcohol biosynthetic process</i> | 1.43E-1 |
| <i>phosphate-containing compound metabolic process</i> | 1.69E-1 |
| <i>phosphorus metabolic process</i> | 1.7E-1 |
| <i>cholesterol transport</i> | 1.77E-1 |
| <i>organic acid metabolic process</i> | 1.8E-1 |

APÊNDICE C – Lista de genes com expressão relativa aumentada pelo tratamento com LDL (100 µg/mL)

| Gene | logFC | p ajustado (FDR) |
|-------------|--------------|-------------------------|
| Mgst2 | 1,04 | 0,075 |
| Cldn2 | 1,08 | 0,083 |
| Ftl1 | 1,09 | 0,099 |
| Gfap | 1,25 | 0,018 |
| Slc25a34 | 1,38 | 0,032 |
| C4b | 1,63 | 0,071 |
| Ugt1a6b | 1,75 | 0,002 |
| Syt13 | 2,96 | 0,017 |

APÊNDICE D – Lista de termos associados aos genes com expressão relativa aumentada pelo tratamento com LDL, resultantes da análise de ontologia.

| Termo associado (<i>Gene ontology analysis</i>) | p ajustado (FDR) |
|--|-------------------------|
| <i>positive regulation of Schwann cell proliferation</i> | 1,00 |

APÊNDICE E – Lista de genes com expressão relativa aumentada pelo tratamento com LDLR siRNA (100 primeiros genes com maior valor de FC).

| Gene | logFC | <i>p</i> ajustado (FDR) |
|-------------|--------------|--------------------------------|
| Esm1 | 2,34 | 0,039 |
| Casp4 | 2,17 | 0,039 |
| Lmo2 | 2,06 | 0,039 |
| Pygl | 1,74 | 0,039 |
| Myl1 | 1,65 | 0,039 |
| Gpr156 | 1,65 | 0,051 |
| Sgip1 | 1,65 | 0,039 |
| Cd36 | 1,47 | 0,039 |
| Igfbp1 | 1,42 | 0,076 |
| Nav2 | 1,39 | 0,039 |
| Chrm3 | 1,33 | 0,049 |
| Apoa2 | 1,29 | 0,039 |
| Pde4dip | 1,29 | 0,039 |
| Adssl1 | 1,28 | 0,051 |
| Spred1 | 1,28 | 0,046 |
| Cers3 | 1,26 | 0,043 |
| Pde4dip | 1,23 | 0,050 |
| Sepp1 | 1,22 | 0,047 |
| Calcr1 | 1,20 | 0,039 |
| Gm5544 | 1,20 | 0,046 |
| Syt12 | 1,19 | 0,046 |
| Spp1 | 1,18 | 0,039 |
| Ebf1 | 1,18 | 0,039 |
| Meig1 | 1,16 | 0,039 |
| Dhrs7c | 1,16 | 0,049 |
| Zdhhc2 | 1,11 | 0,062 |

| | | |
|-----------|------|-------|
| Pcp4 | 1,10 | 0,047 |
| Rsad2 | 1,10 | 0,039 |
| Npl | 1,10 | 0,039 |
| Rasgef1b | 1,10 | 0,051 |
| Fam19a4 | 1,09 | 0,044 |
| Gm1631 | 1,09 | 0,040 |
| Esrrb | 1,09 | 0,039 |
| Uba7 | 1,09 | 0,039 |
| Egln3 | 1,08 | 0,039 |
| Slc17a9 | 1,08 | 0,039 |
| Gm38710 | 1,08 | 0,049 |
| Tlcd2 | 1,07 | 0,070 |
| Aspa | 1,07 | 0,039 |
| Lbh | 1,05 | 0,039 |
| Mitf | 1,05 | 0,039 |
| Rgs8 | 1,05 | 0,040 |
| Ldhb | 1,05 | 0,039 |
| Lrrn3 | 1,04 | 0,067 |
| Rgs16 | 1,03 | 0,048 |
| Gadd45g | 1,03 | 0,039 |
| Fgf9 | 1,02 | 0,039 |
| Pdk1 | 1,01 | 0,039 |
| Drc1 | 1,01 | 0,047 |
| Lix1 | 0,99 | 0,039 |
| Spata9 | 0,99 | 0,064 |
| Spats1 | 0,99 | 0,046 |
| Fgd4 | 0,98 | 0,043 |
| Ankrd52 | 0,98 | 0,046 |
| Epb4.114b | 0,98 | 0,049 |
| Mcf2 | 0,97 | 0,039 |

| | | |
|---------|------|-------|
| Bend6 | 0,97 | 0,046 |
| Ddc | 0,95 | 0,062 |
| Sdcbp2 | 0,95 | 0,044 |
| Pmfbp1 | 0,95 | 0,051 |
| Col20a1 | 0,95 | 0,089 |
| Pcp4l1 | 0,95 | 0,046 |
| Dlx2 | 0,95 | 0,040 |
| Gm11213 | 0,94 | 0,067 |
| Ccl6 | 0,94 | 0,094 |
| Morn1 | 0,94 | 0,059 |
| Mitf | 0,93 | 0,073 |
| Opn3 | 0,93 | 0,044 |
| Ccdc30 | 0,93 | 0,057 |
| Fabp3 | 0,92 | 0,060 |
| Crebl2 | 0,92 | 0,046 |
| Chml | 0,92 | 0,049 |
| Pon3 | 0,92 | 0,050 |
| Egln3 | 0,92 | 0,050 |
| Gm1631 | 0,91 | 0,060 |
| Klhl28 | 0,91 | 0,046 |
| Morn5 | 0,91 | 0,085 |
| Trim47 | 0,91 | 0,052 |
| Gch1 | 0,91 | 0,043 |
| Narf | 0,91 | 0,040 |
| Dcaf7 | 0,90 | 0,040 |
| Cyfp2 | 0,90 | 0,043 |
| Drp2 | 0,90 | 0,046 |
| Tmcc1 | 0,90 | 0,043 |
| Ccl25 | 0,89 | 0,046 |
| Pla1a | 0,89 | 0,092 |

| | | |
|--------|------|-------|
| Fbxo36 | 0,89 | 0,060 |
| Pf4 | 0,88 | 0,080 |
| Nrtn | 0,88 | 0,055 |
| Kcnn2 | 0,88 | 0,050 |
| Dnah10 | 0,87 | 0,050 |
| Cadm1 | 0,87 | 0,078 |
| Zfp207 | 0,87 | 0,067 |
| Fabp3 | 0,87 | 0,073 |
| Id4 | 0,86 | 0,047 |
| Sucnr1 | 0,86 | 0,051 |
| Cspg5 | 0,86 | 0,050 |
| Fam84a | 0,86 | 0,064 |
| Anxa1 | 0,85 | 0,051 |
| Meig1 | 0,85 | 0,052 |

APÊNDICE F – Lista de termos associados aos genes com expressão relativa aumentada pelo tratamento com LDLr siRNA, resultantes da análise de ontologia.

| Termo associado (<i>Gene ontology analysis</i>) | <i>p</i> ajustado (FDR) |
|---|--------------------------------|
| <i>single-organism process</i> | 5.48E-1 |
| <i>N-acetylneuraminate catabolic process</i> | 4.68E-1 |
| <i>single-multicellular organism process</i> | 4.59E-1 |
| <i>positive regulation of phospholipid biosynthetic process</i> | 4.05E-1 |
| <i>positive regulation of bone resorption</i> | 4.66E-1 |
| <i>positive regulation of bone remodeling</i> | 3.89E-1 |
| <i>leukocyte migration</i> | 3.6E-1 |
| <i>activation of MAPKKK activity</i> | 3.2E-1 |
| <i>regulation of homeostatic process</i> | 2.88E-1 |
| <i>regulation of cell communication</i> | 2.61E-1 |
| <i>regulation of signaling</i> | 2.77E-1 |
| <i>regulation of signal transduction</i> | 2.57E-1 |
| <i>regulation of response to stimulus</i> | 3.27E-1 |
| <i>regulation of bone resorption</i> | 3.26E-1 |
| <i>regulation of molecular function</i> | 3.51E-1 |
| <i>N-acetylneuraminate metabolic process</i> | 3.35E-1 |
| <i>positive regulation of MAPK cascade</i> | 3.17E-1 |
| <i>embryonic hemopoiesis</i> | 3.35E-1 |
| <i>positive regulation of phosphorus metabolic process</i> | 3.37E-1 |
| <i>positive regulation of phosphate metabolic process</i> | 3.2E-1 |
| <i>regulation of intracellular signal transduction</i> | 3.3E-1 |
| <i>regulation of superoxide metabolic process</i> | 3.22E-1 |
| <i>regulation of multicellular organismal process</i> | 3.47E-1 |
| <i>regulation of tissue remodeling</i> | 3.84E-1 |
| <i>animal organ development</i> | 3.82E-1 |

| | |
|---|---------|
| <i>regulation of phospholipid biosynthetic process</i> | 3.7E-1 |
| <i>positive regulation of neutrophil apoptotic process</i> | 3.57E-1 |
| <i>positive regulation of tissue remodeling</i> | 3.96E-1 |
| <i>positive regulation of intracellular signal transduction</i> | 4.18E-1 |
| <i>carboxylic acid metabolic process</i> | 4.14E-1 |
| <i>regulation of bone remodeling</i> | 4.19E-1 |
| <i>oxoacid metabolic process</i> | 4.35E-1 |

APÊNDICE G – Lista de genes com expressão relativa reduzida pelo tratamento com LDLR siRNA (100 primeiros genes com maior valor de FC).

| Gene | logFC | <i>p</i> ajustado (FDR) |
|-------------|--------------|--------------------------------|
| Atg5 | -2,14 | 0,039 |
| Cfl2 | -2,11 | 0,039 |
| Vamp7 | -1,96 | 0,039 |
| Gnpda1 | -1,87 | 0,039 |
| Lmo1 | -1,78 | 0,051 |
| Sybu | -1,77 | 0,039 |
| Tub | -1,77 | 0,039 |
| Abcb9 | -1,77 | 0,039 |
| Tomm70a | -1,76 | 0,050 |
| Alg2 | -1,69 | 0,039 |
| Dctn3 | -1,69 | 0,039 |
| Cfl2 | -1,68 | 0,039 |
| Stmn3 | -1,66 | 0,039 |
| Atxn713b | -1,59 | 0,039 |
| Lipa | -1,58 | 0,039 |
| Crtap | -1,51 | 0,039 |
| Tomm70a | -1,50 | 0,039 |
| Arrdc4 | -1,49 | 0,039 |
| Atxn713b | -1,48 | 0,039 |
| Slc16a4 | -1,46 | 0,064 |
| Ap3b2 | -1,45 | 0,039 |
| Itgb8 | -1,42 | 0,040 |
| Timm10 | -1,42 | 0,039 |
| Plekha4 | -1,40 | 0,039 |
| Timm10 | -1,39 | 0,039 |
| Dhcr24 | -1,38 | 0,039 |

| | | |
|----------|-------|-------|
| Sin3b | -1,38 | 0,050 |
| Ednra | -1,37 | 0,039 |
| Ldlr | -1,36 | 0,039 |
| Ppap2a | -1,35 | 0,042 |
| Wbscr22 | -1,35 | 0,039 |
| Pnmal1 | -1,34 | 0,050 |
| Mcph1 | -1,34 | 0,044 |
| Irx3 | -1,32 | 0,049 |
| Tnfrsf18 | -1,30 | 0,064 |
| Fntb | -1,29 | 0,049 |
| Ccnf | -1,28 | 0,039 |
| Crlf2 | -1,28 | 0,039 |
| Rab11b | -1,28 | 0,039 |
| Rbpms2 | -1,27 | 0,047 |
| Fis1 | -1,27 | 0,039 |
| Dnajc21 | -1,26 | 0,039 |
| Ivd | -1,26 | 0,039 |
| Sel1l | -1,25 | 0,039 |
| Hs3st2 | -1,25 | 0,051 |
| Slc6a9 | -1,25 | 0,039 |
| Smpd3 | -1,24 | 0,039 |
| Adgrg6 | -1,21 | 0,039 |
| Zwint | -1,20 | 0,046 |
| Gpr137b | -1,20 | 0,039 |
| Timp3 | -1,19 | 0,043 |
| Crmp1 | -1,19 | 0,039 |
| Lztfl1 | -1,19 | 0,048 |
| Capns1 | -1,19 | 0,042 |
| Dctn4 | -1,18 | 0,050 |
| Slc7a1 | -1,18 | 0,039 |

| | | |
|----------|-------|-------|
| Ebna1bp2 | -1,18 | 0,055 |
| Chac1 | -1,18 | 0,095 |
| Ppap2a | -1,17 | 0,039 |
| Prr18 | -1,16 | 0,039 |
| Slc6a9 | -1,16 | 0,039 |
| Slc13a4 | -1,16 | 0,039 |
| Mfsd2a | -1,16 | 0,039 |
| Chga | -1,16 | 0,039 |
| S1pr2 | -1,15 | 0,046 |
| Pbx3 | -1,14 | 0,042 |
| Duoxa1 | -1,13 | 0,056 |
| Esx1 | -1,13 | 0,039 |
| Klrb1c | -1,13 | 0,041 |
| Hn1l | -1,12 | 0,039 |
| Ero11b | -1,12 | 0,039 |
| Ppp1r3d | -1,11 | 0,077 |
| Srsf12 | -1,11 | 0,063 |
| Gprin1 | -1,11 | 0,039 |
| Capns1 | -1,10 | 0,046 |
| Ncl | -1,10 | 0,059 |
| Uggt1 | -1,10 | 0,039 |
| Pbx3 | -1,10 | 0,039 |
| Capza1 | -1,09 | 0,039 |
| Ap4b1 | -1,09 | 0,040 |
| Synpo | -1,09 | 0,039 |
| Zmat5 | -1,09 | 0,060 |
| Sgcb | -1,08 | 0,068 |
| Sfxn4 | -1,08 | 0,039 |
| Cnih1 | -1,08 | 0,039 |
| Zfp334 | -1,08 | 0,039 |

| | | |
|---------|-------|-------|
| Celsr3 | -1,08 | 0,051 |
| Carns1 | -1,07 | 0,086 |
| Rpl22 | -1,07 | 0,046 |
| Resp18 | -1,07 | 0,087 |
| Spin4 | -1,07 | 0,040 |
| Lamb3 | -1,06 | 0,050 |
| Trip10 | -1,06 | 0,043 |
| Arhgdia | -1,06 | 0,043 |
| Plekhb1 | -1,06 | 0,039 |
| Mybl2 | -1,06 | 0,040 |
| Egr4 | -1,05 | 0,050 |
| Itpr12 | -1,05 | 0,050 |
| Sid2 | -1,04 | 0,055 |

APÊNDICE H – Lista de termos associados aos genes com expressão relativa reduzida pelo tratamento com LDLr siRNA, resultantes da análise de ontologia.

| Termo associado (<i>Gene ontology analysis</i>) | <i>p</i> ajustado (FDR) |
|--|--------------------------------|
| <i>establishment of localization</i> | 6.93E-7 |
| <i>localization</i> | 1.12E-6 |
| <i>transport</i> | 1.7E-6 |
| <i>regulation of localization</i> | 3.23E-5 |
| <i>single-organism process</i> | 5.44E-5 |
| <i>cellular process</i> | 5.15E-5 |
| <i>regulation of response to stimulus</i> | 5.97E-5 |
| <i>regulation of signaling</i> | 2.85E-4 |
| <i>cellular component organization</i> | 7.62E-4 |
| <i>negative regulation of cellular process</i> | 8.17E-4 |
| <i>regulation of transport</i> | 8.16E-4 |
| <i>regulation of cell communication</i> | 8.18E-4 |
| <i>negative regulation of biological process</i> | 9.07E-4 |
| <i>cellular component organization or biogenesis</i> | 9.07E-4 |
| <i>positive regulation of cellular process</i> | 1.09E-3 |
| <i>biological regulation</i> | 1.31E-3 |
| <i>regulation of biological process</i> | 1.6E-3 |
| <i>positive regulation of biological process</i> | 2.05E-3 |
| <i>regulation of cell death</i> | 2.05E-3 |
| <i>vacuolar transport</i> | 2.73E-3 |
| <i>endosomal transport</i> | 3.02E-3 |
| <i>regulation of cellular component organization</i> | 3.3E-3 |
| <i>regulation of neuron death</i> | 3.33E-3 |
| <i>mitochondrial DNA repair</i> | 4.68E-3 |
| <i>cellular protein modification process</i> | 5.29E-3 |

| | |
|---|---------|
| <i>protein modification process</i> | 5.08E-3 |
| <i>negative regulation of cellular component organization</i> | 5.09E-3 |
| <i>single-organism cellular process</i> | 5.45E-3 |
| <i>regulation of macromolecule metabolic process</i> | 7.36E-3 |
| <i>regulation of cellular process</i> | 7.35E-3 |
| <i>establishment of protein localization</i> | 7.49E-3 |
| <i>regulation of metabolic process</i> | 7.64E-3 |
| <i>single-organism transport</i> | 7.59E-3 |
| <i>establishment of localization in cell</i> | 8.19E-3 |
| <i>single-organism organelle organization</i> | 8.32E-3 |
| <i>intracellular transport</i> | 8.25E-3 |
| <i>regulation of apoptotic process</i> | 8.45E-3 |
| <i>organic substance transport</i> | 8.23E-3 |
| <i>single-organism localization</i> | 9.37E-3 |
| <i>regulation of signal transduction</i> | 9.8E-3 |
| <i>regulation of programmed cell death</i> | 1.09E-2 |
| <i>vesicle-mediated transport</i> | 1.27E-2 |
| <i>stress-activated protein kinase signaling cascade</i> | 1.39E-2 |
| <i>regulation of cellular localization</i> | 1.54E-2 |
| <i>regulation of cellular metabolic process</i> | 1.66E-2 |
| <i>macromolecule localization</i> | 1.7E-2 |
| <i>regulation of multicellular organismal development</i> | 1.91E-2 |
| <i>cellular response to ionizing radiation</i> | 2.25E-2 |
| <i>regulation of cytoskeleton organization</i> | 2.47E-2 |
| <i>negative regulation of cell death</i> | 2.44E-2 |
| <i>cellular response to stress</i> | 2.49E-2 |
| <i>protein localization</i> | 2.59E-2 |
| <i>regulation of microtubule-based process</i> | 2.79E-2 |
| <i>biological adhesion</i> | 2.77E-2 |

| | |
|--|---------|
| <i>macromolecule modification</i> | 2.79E-2 |
| <i>regulation of protein modification process</i> | 2.77E-2 |
| <i>stress-activated MAPK cascade</i> | 3.17E-2 |
| <i>cell surface receptor signaling pathway</i> | 3.3E-2 |
| <i>regulation of developmental process</i> | 3.44E-2 |
| <i>negative regulation of transport</i> | 3.39E-2 |
| <i>mitotic cell cycle phase transition</i> | 3.49E-2 |
| <i>negative regulation of response to stimulus</i> | 3.44E-2 |
| <i>cell adhesion</i> | 3.61E-2 |
| <i>cellular response to gamma radiation</i> | 3.65E-2 |
| <i>regulation of protein localization</i> | 3.65E-2 |
| <i>cell-substrate adhesion</i> | 3.72E-2 |
| <i>positive regulation of developmental process</i> | 3.82E-2 |
| <i>negative regulation of apoptotic process</i> | 3.91E-2 |
| <i>cellular protein metabolic process</i> | 4.09E-2 |
| <i>regulation of vesicle-mediated transport</i> | 4.07E-2 |
| <i>regulation of nervous system development</i> | 4.48E-2 |
| <i>regulation of microtubule cytoskeleton organization</i> | 4.58E-2 |
| <i>cellular localization</i> | 4.58E-2 |
| <i>positive regulation of neuron death</i> | 4.66E-2 |
| <i>regulation of organelle organization</i> | 4.6E-2 |
| <i>regulation of neuron apoptotic process</i> | 4.86E-2 |
| <i>cell cycle phase transition</i> | 4.88E-2 |
| <i>negative regulation of programmed cell death</i> | 4.98E-2 |
| <i>regulation of primary metabolic process</i> | 4.98E-2 |
| <i>secretion</i> | 5.4E-2 |
| <i>cellular response to abiotic stimulus</i> | 5.39E-2 |
| <i>cytosolic transport</i> | 5.44E-2 |
| <i>protein folding</i> | 6.08E-2 |
| <i>nitrogen compound transport</i> | 6.52E-2 |

